

MILENA FONTES LUIZETE

Aplicações de MALDI-MS na análise de peptídeos produzidos por cianobactérias.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção de Título de Doutora em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

ARARAQUARA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

L952a Luizete, Milena Fontes
Aplicações de MALDI-MS na análise de peptídeos
produzidos por cianobactérias / Milena Fontes Luizete. –
Araraquara : [s.n.], 2017
140 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Cianobactéria. 2. Microcistinas. 3. Espectrometria de
massa. 4. Desorção-ionização por laser assistida por matriz.
5. Peptídeos. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

MILENA FONTES LUIZETE

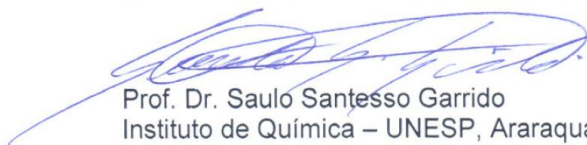
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 30 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



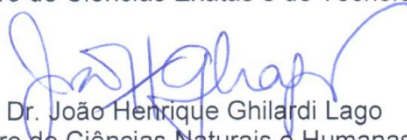
Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof. Dr. Moacir Rossi Forin
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos – SP



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC, Santo André – SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Milena Fontes Luizete

Data de nascimento: 27/10/1988

Formação Acadêmica: Bacharela em Química com Atribuições Tecnológicas

Instituição: Instituto de Química – UNESP Araraquara

Título: Mestre em Química

Instituição: Instituto de Química – UNESP Araraquara

Produção Científica

Sandonato, B. B., Santos, V. G., Luizete, M. F., Bronzel Jr, J. L., Eberlin, M. N., Milagre, H. M. S. **MALDI Imaging Mass Spectrometry of Fresh Water Cyanobacteria: Spatial Distribution of Toxins and Other Metabolites**, J. Braz. Chem. Soc., Vol. 28, No. 4, 521-528, 2017.

Resumos apresentados em Eventos Científicos

- (1) Apresentação de resumo na forma de pôster sob o título: 'Non-ribosomal cyanopeptides founded in Brazilian Cyanobacteria Bloom: Identification and characterization by MALDI-TOF-MS.' 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Criar e Empreender. 2016.
- (2) Apresentação de resumo na forma de pôster sob o título: 'Peptides Quantification: Improved Performance by the Binary Matrices System for MALDI-TOF-MS.' 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2015.
- (3) Apresentação de resumo na forma de pôster sob o título: 'Metabolomic profiling of cyanobacteria by mass spectrometry' 38ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015.
- (4) Apresentação de resumo na forma de pôster sob o título: 'MALDI-TOF-MS for the differentiation of Strains of Cyanobacteria by their secondary metabolites profile.' 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2015.
- (5) Apresentação de resumo na forma de pôster sob o título: 'A Binary Matrix for Improvement of Quantitative Analysis of Microcystins by MALDI-TOF-MS.' na 62nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2014.
- (6) Apresentação de resumo na forma de poster: 'Otimização experimental da derivação de parabenos para análise via CG-EM.' 5 Congresso Ibero Americano de Química Analítica, 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais Luis e Marilaine, à minha irmã Marina, ao meu companheiro de jornada e marido Érico, e aos meus avós Vanda, Lico (in memorian), Tonho e Cida (in memorian).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre, pela constante orientação, amizade e incentivo, serei eternamente grata por todos seus ensinamentos nos aspectos profissionais e pessoais.

À Prof. Dra. Cíntia D. F. Milagre, juntamente com todo Milagre Research Group, pelas nossas reuniões e discussões amplamente proveitosas para minha formação.

Ao Instituto de Química e o Programa de Pós-Graduação pelo apoio e infraestrutura.

À FAPESP e CNPq, por fomentarem as pesquisas dispostas neste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida e manutenção do Portal de Periódicos.

Ao Instituto Pasteur e ao Laboratório ThoMSon, pela parceria e colaboração.

Sou imensamente grata à Deus, à Maria, mãe das mães e aos meus protetores espirituais.

Gratidão aos meus pais pela minha vida, e por passarem a vida deles se esforçando para que eu trilhasse o caminho dos estudos desde o pré-primário até este momento.

À minha irmã Marina, pelos sorrisos e apoio constante.

Ao meu marido e companheiro de jornada Érico, que a todo momento esteve do meu lado, me dando apoio em todos os aspectos.

Aos meus avós, Vanda e Lico (*in memorian*), Tonho e Cida (*in memorian*), que me acompanham desde o nascimento e são exemplos em minha vida.

Sou imensamente grata às minhas amigas irmãs Vanessa e Mi Murad, que há dois anos estão ao meu lado todos os dias desta caminhada.

Gratidão ao Núcleo Ju Marconato, por ser meu refúgio e o bálsamo dos meus dias.

Gratidão à Lu, Naira e Paulinha, pelos abraços sinceros.

Gratidão aos amigos de laboratório, Luna, Maraylla, Iris, Carol, Raquel, Bruno, João, que me acompanharam no dia a dia.

Não poderia deixar de agradecer também, os porteiros do Instituto de Química: Raquel, Joel e Seu Haliaben, pelos primeiros sorrisos que eu via quando aqui chegava. Em especial a Raquel pela sincera amizade.

Agradeço também toda turma de manutenção, em especial ao Senhor Abraão, ao Rogério e o Carlos, que prontamente atendiam aos meus pedidos, quando o ar condicionado da sala do equipamento chorava, entre tantas outras manutenções que realizaram com profissionalismo.

Meu sincero sentimento de GRATIDÃO a todos vocês.

“A experiência mais bela que podemos ter é a do mistério. Ela é a emoção fundamental que está na origem da arte e da ciência verdadeiras. Quem não a conhece e não consegue maravilhar-se com ela está praticamente morto e seus olhos estão obscurecidos.” Albert Einstein

Resumo

Neste trabalho, a técnica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry (MALDI-MS)* foi utilizada em diferentes aplicações para a análise de peptídeos produzidos por cianobactérias. Esta técnica é extremamente rápida, possui alta resolução, requer pouquíssimo preparo de amostra e não permite que possíveis contaminantes presentes na amostra interfiram na análise. Por estes motivos MALDI-MS tem sido amplamente utilizada não somente na detecção de diferentes variantes de cianopeptídeos, mas também para quantificação das cianotoxinas. Este trabalho utilizou um sistema binário de matriz para a quantificação de microcistinas, utilizando as matrizes ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o ácido sinapínico (50/50, v/v) para obter uma mistura homogênea de matriz/analito, superando a baixa reprodutibilidade inerente da técnica MALDI-MS.

Paralelamente, foi realizado o imageamento de espécies de cianobactérias de água doce cultivadas em meio sólido por MALDI-TOF-MS. Os resultados obtidos apresentaram novas perspectivas com relação à distribuição espacial dos peptídeos produzidos pelas espécies de cianobactérias estudadas, como a nodularina-R (m/z 825) e nodularina-[Har] (m/z 839) produzida pela espécie *Nodularia harveyana* PCC 7804, os peptídeos MC-LR (m/z 995) produzidos pela espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, e o sideróforo anaquelina (m/z 761.3) produzidos pela espécie *Anabaena cylindrica* PCC 7122.

Além disto, amostras da floração de cianobactérias, que ocorre na Represa Salto Grande, localizada na cidade de Americana – SP, foram analisadas e nelas foram identificados onze cianopeptídeos de quatro classes diferentes, sendo quatro microcistinas (MC-LR, MC-YR, MC-Hil e MC-RR), quatro aeruginosinas (602, 298 A, 644 e 646), duas cianopeptolinas (972 e 986), e uma variante de microviridina (1707).

Palavras Chaves: MALDI-MS. Espectrometria de Massas. Cianobactérias. Microcistinas. Cianopeptídeos.

Abstract

In this work, the technique *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry* (MALDI-MS) were used in different application for analysis of peptides produced by cyanobacteria. This technique is extremely fast, has high resolution, requires very little sample preparation and does not allow any contaminants present in the sample to interfere with the analysis. For these reasons, MALDI-MS has been widely used not only in the detection of different variants of cyanopeptides, but also for the quantification of cyanotoxins. This work utilized a matrix binary system for the quantification of microcystins, using the α -cyano-4-hydroxynamic matrix and sinapinic acid (50/20, v/v) to obtain a homogeneous matrix/analyte mixture, overcoming the low reproducibility inherent to the MALDI-MS technique.

Simultaneously, we performed the imaging of freshwater cyanobacteria cultivated in solid medium by MALDI-TOF-MS. The results obtained presented new perspectives regarding the spatial distribution of the peptides produced by the studied cyanobacteria species, for example the nodularin-R (m/z 825), nodularin-[Har] (m/z 839) for the species *Nodularia harveyana* PCC 7804, MC-LR peptides (m/z 995) for the species *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, and the siderophore anaquelin (m/z 761.3) for the species *Anabaena cylindrica* PCC 7122.

In addition, samples of cyanobacteria's bloom, present in Salto Grande Lagoon, located in Americana-SP, were analyzed and were identified some peptides, being four microcystins (MC-YR, MC-YR, MC-Hil and MC-RR), four aeruginosins (602, 298 A, 644 and 968), two cyanopeptolins (972 and 986), and one variant of microviridin(1707).

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Estromatólito encontrado no Lago Innes - Sul da Austrália. Fonte: Falconer, I. R. Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies (FALCONER, 2003a) .	22
FIGURA 2 - Estrutura celular básica de uma cianobactéria. Fonte: http://reasonandscience.heavenforum.org/t1551-cyanobacteria (adaptado)	23
FIGURA 3 – Microscopia ótica para visualização da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820. A) Visualização das colônias (aumento 40x), B) Visualização das células (aumento de 100x).	24
FIGURA 4 – Microscopia ótica (aumento 100x) das espécies A) <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122, célula em destaque heterocisto e B) <i>Nostoc</i> sp. PCC 9237, célula em destaque acinete.	25
Figura 5 - Imagens de cianobactérias em A) Fonte Termal (Yellowstone National Park) e B) Deserto. Fonte: A) http://www.webexhibits.org/causesofcolor/5D.html , B) http://www.kavlifoundation.org/science-spotlights/microbiome-astrobiology-how-search-life-other-worlds#.WL1UcPnyUk .	28
FIGURA 6 - Imagens de Florações de Cianobactérias obtidas por satélites. Lago Eire (EUA), Mar de Bering (Alasca), Golfo do México e Costa da Argentina. Fonte: NASA Goddard Space Flight Center/Flickr	29
FIGURA 7 - Estrutura química das neurotoxinas Anatoxina, Anatoxina-a (s) e Saxitoxina.	30
FIGURA 8 - Estrutura química de um lipossacarídeo (LPS)	31
FIGURA 9 - Estrutura química da cilindrospermopsina	32
FIGURA 10 - Hepatócitos isolados incubados na ausência ou presença de microcistina: (a) hepatócito controle; (b) hepatócito incubado por 30 minutos na presença de microcistina. Fonte: Microcystin Toxicity - Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies.	33
FIGURA 11 - Estrutura da microcistina-LR (MC-LR). Em azul: L-aminoácidos, posição 2, L e posição 4 R. Em vermelho: Adda, em preto: os quatro D-aminoácidos, posição 1, 3, 6 e 7.	33
FIGURA 12 - Estruturas de algumas microcistinas e sua nomenclatura.	34
FIGURA 13 - Estruturas e nomenclatura da nodularins- R e nodularina-Har.	35
FIGURA 14 - Representação da fonte de ionização MALDI-MS. Fonte: Milagre, H.M.S.	38
FIGURA 15 - Principais matrizes utilizadas em UV-MALDI.	40
FIGURA 16 - Mecanismo Unificado de ionização do analito por MALDI-MS.	42
FIGURA 17 - Representação da formação de 'hot-spots' e a variabilidade dos espectros obtidos, dependendo do local onde o laser incide. Fonte: Bronzel, 2015 - adaptado.	44
FIGURA 18 - Espectro MALDI-(+)-TOF/MS obtido pela análise de MC-RR (2.50 µmol/L) e da Angiotensina I (2.50 µmol/L).	52
FIGURA 19 - Filamento de <i>Spirulina</i> . Fonte: Jerine, P. S, Kadar, B. S, Giridharan, R., Udhaya, L. B, Sabina, E. P. (2017).	63
FIGURA 20 - Estruturas químicas da Scytonemina e Mycosporina-2-glicina.	64

FIGURA 21 – Metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias classificados de acordo com a classe estrutural. Fonte: Chipala, G. E., Mo, S., Orjala, J., 2011 (adaptado).	65
FIGURA 22 - Exemplos de diferentes classes de cianopeptídeos.	67
FIGURA 23 - Amino ácidos e resíduos de aminoácidos não usuais presentes nas estruturas dos cianopeptídeos.	68
FIGURA 24 – Esquema da biossíntese da Nodularina-R. Fonte: Moffitt, M. C., Neilan, B. J. (2004) (RANTALA et al., 2004).	69
FIGURA 25 – Estrutura química da Aeruginosina 298A.	70
FIGURA 26 - Estrutura química da Cianopeptolina 1083.	71
FIGURA 27 - Estrutura de uma microviridina. As ligações em destaque podem ocorrer após a tradução da sequência primária de aminoácidos.	72
FIGURA 28 – Etapas realizadas para realização do imageamento por IMS. a) Amostra inserida na placa de MALDI-MS, b) análise por MALDI-TOF-MS (varredura de toda área por pixels), c) cada pixel possui um espectro de massas, d) associação dos sinais selecionados, com suas respectivas coordenadas no espaço, formando a imagem.	75
FIGURA 29 - Método de análise de cianobactérias por MALDI-TOF-MS.	80
FIGURA 30 - Passo a passo para o imageamento das culturas de cianobactérias. Fonte: Sandonato, B. B. et al, 2017 (adaptado) (SANDONATO et al., 2017).	82
FIGURA 31 - Imagem por microscopia óptica (aumento 100X) das espécies: <i>Micocystis aeruginosa</i> PCC 7820, <i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804 e <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122.	83
FIGURA 32 – Estrutura dos cianopeptídeos identificados pelas análises de MALDI-TOF-MS.	85
FIGURA 33 – Espectro de MALDI-(+)-TOF-MS obtido pela análise da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7820.	86
FIGURA 34 - Espectro de MALDI-(+)-TOF-MS obtido pela análise da espécie <i>Nodularia harveyana</i> PCC7804.	87
FIGURA 35 - Espectro de MALDI-(+)-TOF-MS obtido pela análise da espécie <i>Anabaena cylindrica</i> PCC7122.	88
FIGURA 36 - MALDI-IMS slide com colônias de <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820 com a área scaneada delimitada pelo retângulo em vermelho. Imagem MALDI-IMS gerada para: (b) íon m/z 603.3 correspondente a aeruginosina 602 e m/z 995.6 correspondente a molécula protonada de MC-LR.	90
FIGURA 37 - a) MALDI-IMS slide com as colônias de cianobactérias <i>N. harveyana</i> PCC 7804, no lado direito do slide e <i>A. Cylindrica</i> PCC 7122 do lado esquerdo, b) imagem gerada por MALDI-IMS da distribuição do sideróforo anaquelina (m/z 761), c e d) imagens geradas por MALDI-IMS dos peptídeos cíclicos nodularina-R (m/z 825), nodularina-[Har] (m/z 839).	91
FIGURA 38 - MALDI-IMS imagem para as três espécies de cianobactérias <i>N. harveyana</i> PCC 7804, <i>M. aeruginosa</i> PCC 7820 e <i>A. cylindrica</i> PCC 7122. Imagem (a) para os biomarcadores nodularina Nod-[Har] (m/z 839.5), microcistinas MC-LR (m/z 995.6) e anaquelina (m/z 761.3). Imagens (b) a (g) para os íons desconhecidos m/z 619.1, 638.5, 989.4, 1276.3, 1643.6 e 1971.5.	92
FIGURA 39 - Imagens de Floração de Cianobactérias, Americana -SP. Fonte: arquivo pessoal do autor.	96

FIGURA 40 – Mapa de Hidrografia da cidade de Americana -SP. Fonte: http://www.americana.sp.gov.br/v6/images/perfil_municipio/perfil_2011_mapa_hidrografico.jpg	97
FIGURA 41 – Espécies de cianobactérias encontradas na floração da Represa Salto Grande. A) <i>Microcystis</i> sp. CENA120, B) <i>Cyanobium</i> sp. CENA122, C) <i>Romeria victoriae</i> CENA123. Fonte: adaptado de Genuário, D. B., 2016.....	98
FIGURA 42 - Esquema básico da Fonte de ionização por eletronspray.	100
FIGURA 43 - A) Esquema de um experimento Full scan B) Esquema de um experimento de MS/MS.....	102
FIGURA 44 – a) Imagem da floração de cianobactérias presente em Americana-SP, Brasil vista por satélite. Fonte: Google Maps. b) Imagem do Ponto de Coleta 1: 22°42.350' S 047°16.058' W. c) Imagem do ponto da margem da Represa na Associação Barco Escola. Fonte: Arquivo pessoal do autor.	104
FIGURA 45 – Fluxograma do procedimento experimental realizado para identificação dos cianopeptídeos encontrados na floração de cianobactérias da Represa Salto Grande.	106
FIGURA 46 - Imagem das cianobactérias vistas ao microscópio óptico, zoom de 100x. A) Células em forma filamentosas, B e C) Células em forma de cocos de diferentes tamanhos, tais como <i>Microcistis</i> sp.	108
FIGURA 47 - Espectros MALDI-(+)-TOF/MS das amostras coletadas em diferentes pontos: a) Ponto de coleta 1; b) Ponto de coleta 2; c) Ponto de coleta 3.....	109
FIGURA 48- Espectros MALDI-(+)-TOF/MS das análises das células referentes as extrações realizadas utilizando metanol, a) análise referente às células restantes da extração 1, b) análise referente às células restantes da extração 2,c) análise referente às células restantes da extração 3, d) análise referente às células restantes da extração 4.....	111
FIGURA 49 - Espectros MALDI-(+)-TOF/MS das análises dos solventes das extrações realizadas utilizando metanol. a) análise referente ao solvente de extração 1, b) análise referente ao solvente de extração 2, c) análise referente ao solvente de extração 3, d) análise referente ao solvente de extração 4.....	112
FIGURA 50 - Espectros MALDI-(+)-TOF/MS obtidos das análises das frações; a) espectro referente a análise da fração 20% MeOH, b) espectro referente a análise da fração 40% MeOH, c) espectro referente a análise da fração 60% MeOH, d) espectro referente a análise da fração 80% MeOH, e) espectro referente a análise da fração 100% MeOH.....	113
FIGURA 51 - Estrutura das aeruginosinas identificadas na floração de Americana.	114
FIGURA 52 - Estruturas das cianopeptolinas identificadas na floração de Americana.	116
FIGURA 53 - Estrutura das MC's encontradas na floração de Americana.....	117
FIGURA 54 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 603.	122
FIGURA 55 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 605.	123
FIGURA 56 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 645.	124
FIGURA 57 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 647.	125
FIGURA 58 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 987.	126
FIGURA 59 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 973.	127
FIGURA 60 - Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 959.	128

FIGURA 61 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1072.	129
FIGURA 62 - Espectro de MS/MS do íon m/z 995.	130
FIGURA 63 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1009.	131
FIGURA 64 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1045.	132
FIGURA 65 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1707.	133

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação de Ordens de cianobactérias de acordo com a classificação botânica e suas subseções correspondentes pela classificação bacteriológica. Fonte: Chemical and Biological Investigations of Vietnamese Cyanobacteria.	26
Tabela 2 - Parâmetros utilizados para as análises por MALDI-TOF.	47
Tabela 3 - Estruturas das matrizes de MALDI-MS utilizadas neste trabalho.....	51
Tabela 4 - Imagens de microscopia ótica (aumento 40x) da cristalização para as diferentes matrizes utilizadas, e seus respectivos coeficientes de variação na análise de MC-RR (2,5 µmol/L) e Angiotensina I (2,5 µmol/L).....	53
Tabela 5 - Resultados de CV, limite de detecção (MDL), limite de quantificação (LDQ), obtidos utilizando o sistema binário ácido sinapínico: ácido α-ciano-4-hidróxi-cinâmico (50:50, v/v).	55
Tabela 6 - Imagens de microscopia ótica (aumento 40x) da cristalização para as diferentes matrizes binárias, e seus respectivos coeficientes de variação na análise de MC-RR (2,5 µmol/L) e Angiotensina I (2,5 µmol/L).....	57
Tabela 7 - Resultados de CV, limite de detecção (MDL), limite de quantificação (LDQ), obtidos utilizando o sistema binário ácido sinapínico: ácido α-ciano-4-hidróxi-cinâmico (50:50, v/v).	58
Tabela 8 - Dados obtidos por Puddick, 2007 utilizando ácido α-ciano-4-hidróxi-cinâmico como matriz.....	58
Tabela 9 - Resultados de CV, limite de detecção (MDL), limite de quantificação (LDQ), obtidos utilizando o sistema binário ácido sinapínico: ácido α-ciano-4-hidróxi-cinâmico (50:50, v/v).	59
Tabela 10- Espécies de cianobactérias e seus respectivos meios de cultivo.	78
Tabela 11- Meios de cultivo BG-11 ₀ + NaNO ₃ (2mM) + NaHCO ₃ (10mM).	79
Tabela 12- Meios de cultivo BG-11 ₀ e solução de metais traços.	79
Tabela 13 - Espécies de cianobactérias e os respectivos m/z relativos aos cianopeptídeos identificados.	84
Tabela 14 - Parâmetros utilizados para as análises por MALDI-TOF.	105
Tabela 15- m/z referentes aos peptídeos identificados na floração por MALDI-TOF-MS. *Valores descritos na literatura.	110
Tabela 16 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-MS/MS das aeruginosinas detectadas e identificadas nesta floração.	115
Tabela 17 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-HRMS/MS das cianopeptolinas detectadas e identificadas nesta floração.	117
Tabela 18 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-HRMS/MS das MC's detectadas e identificadas nesta floração....	118

Lista de Abreviaturas

ACN: acetonitrila
Adda: ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metóxi-2,6-trimetil-8,10-deca-4,6-dienóico
Asp: asparagina
A: alanina
BG: *Blue-Green Medium*
CENA: Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CHCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
Choi: 2-carboxi-6-hidroxi-octahidroindol
CV: coeficiente de variação
DHB: ácido diidroxibenzóico
DNA: ácido desoxirribonucleico
ESI: *Electrospray Ionization*
ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
Har: homoarginina
Hil: homoisoleucina
Hpla: ácido hidroxi-fenilático
HPLC: *High performance liquid chromatography*
IMS: *imaging mass spectrometry*
Ileu: isoleucina
IR: infravermelho
L: leucina
LD₅₀: dose letal mediana
LDQ: lower limit of detection
LPS: lipopolissacarídeos
MC: microcistina
MC's: microcistinas
m/z: razão massa/carga
MALDI: *Matrix Assisted Laser/Dessorption Ionization*
MCP: *micro-channel plate*
MDL: *minimum detection limit*
MMA's: micosporinas
MS: *Mass Spectrometry*
MS/MS ou MS²: *Tandem Mass Spectrometry*
PEG: Polietilenoglicol
PCC: Pasteur Collection of Cyanobacteria
PCP's: Produtos de cuidado pessoal
PP1: *protein phosphatase 1*
PP2: *protein phosphatase 2*
Q: quadrupolo
R: arginina
SA: ácido sinapínico
TFA: ácido trifluoroacético
TOF: analisador por tempo de voo
UPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV: ultravioleta
(v/v): volume/volume
Y: tirosina

Sumário

Prefácio	19
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento de método de quantificação por MALDI-TOF-MS, utilizando matrizes binárias.	22
1. Introdução	22
1.1. Cianobactérias: fósseis vivos	22
1.2. Estrutura celular das cianobactérias	23
1.3. Nomenclatura e Classificação das Cianobactérias	25
1.4. A ecologia das cianobactérias	28
1.5. Cianotoxinas.....	30
1.5.1. Neurotoxinas	30
1.5.2. Dermatotoxinas	31
1.5.3. Citotoxinas.....	31
1.5.4. Peptídeos Hepatotóxicos.....	32
1.6. Quantificação de Microcistinas: a importância, métodos utilizados e seus desafios.....	36
1.6.1. Matrix Laser Assisted Desorption/Ionization (MALDI)	38
1.6.1.1. Principais componentes da fonte de ionização MALDI: o comprimento de onda do laser.....	39
1.6.1.2. Principais componentes de MALDI – Matrizes, suas estruturas e funções ..	39
1.6.1.4. Metodologias de preparo de amostra para análise por MALDI-MS.	42
1.6.2. A aplicação de MALDI-MS como ferramenta para a quantificação de microcistinas.....	45
2. Objetivos	46
3. Materiais e Métodos.....	47
3.1. Padrões químicos, solventes e matrizes.....	47
3.2. Parâmetros utilizados pelo Equipamento.....	47
3.3. A energia do laser utilizada.....	48
3.4. Preparo das soluções de matriz.....	48
3.5. Sistemas de Matrizes Binárias.....	48
3.6. Soluções Padrão.....	48
3.7. Preparo de amostra	49
3.8. Tratamento estatístico dos dados obtidos.....	49
4. Resultados e Discussões	51
5. Conclusões	60

CAPÍTULO 2: Imageamento de Cianobactérias de água doce por MALDI Imaging Mass Spectrometry: Distribuição de toxinas e outros metabólitos.	62
1. Introdução	62
1.1. Cianopeptídeos	65
1.1.1. Aeruginosinas.....	70
1.1.2. Cianopeptolinas.....	70
1.1.3. Microviridinas	71
1.1.4. Nodularinas e Microcistinas.....	72
1.1.5. Cianopeptídeos como fontes de novos fármacos.....	72
1.2. MALDI-IMS.....	73
2. Objetivos	77
3. Materiais e Métodos	78
3.1. Esterilização dos materiais.....	78
3.2. Cultivo das espécies de cianobactérias.....	78
3.3. Preparo de amostra para as análises de cianobactérias cultivadas no laboratório e amostras ambientais por MALDI-TOF-MS.	80
3.4. Imageamento das culturas de cianobactérias <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820, <i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804 e <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122.	81
4. Resultados e Discussão.....	83
4.1. Identificação dos cianopeptídeos produzidos pelas espécies <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820, <i>Nostoc sp.</i> PCC 9237, <i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804 e <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 por MALDI-TOF-MS.....	83
4.2. Imageamento das espécies <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820, <i>Nostoc sp.</i> PCC 9237, <i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804 e <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 por MALDI-TOF-IMS.....	89
5. Conclusões.....	93
CAPÍTULO 3: Identificação de cianopeptídeos presentes na floração de cianobactérias presente na Represa Salto Grande.....	95
1. Introdução	95
1.1. Floração de Cianobactérias presente na Represa Salto Grande (Americana – SP)95	
1.2. Eletrospray.....	99
1.3. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS ou MS ²).....	101
2. Objetivos	103
3. Materiais e Métodos.....	104
3.1. Coleta de amostras ambientais de floração tóxica de cianobactérias.....	104
3.2. Análise das amostras ambientais por MALDI-TOF-MS	105

3.3. Análise das amostras ambientais de floração tóxica de cianobactérias por ESI-qQ-TOF-MS/MS.	106
4. Resultados e Discussões	108
5. Conclusões.....	120
Apêndice: Espectros de MS/MS dos cianopeptídeos identificados na floração de cianobactérias.	122
Referências	134

Prefácio

Cianobactérias são consideradas fósseis vivos, com origem a aproximadamente 3.5 bilhões de anos, habitando diversos ecossistemas, principalmente ecossistemas aquáticos. A facilidade de adaptação das cianobactérias deve-se a produção de uma enorme variabilidade de metabólitos secundários, que são em sua maioria oligopeptídeos com uma grande diversidade estrutural. Estes peptídeos podem ser agrupados de acordo com suas características estruturais como aeruginosinas, cianopeptolinas, nodularinas, microviridinas e microcistinas. A população de células de cianobactérias em corpos de água varia sazonalmente podendo alcançar um crescimento exacerbado aumentando sua densidade celular em até 500%. Este fenômeno é denominado de floração de cianobactérias, sendo uma preocupação mundial recorrente, pois geram custos socioeconômicos e ecológicos. Algumas espécies de cianobactérias presentes nestas florações produzem metabólitos tóxicos que causam efeitos agudos ou crônicos na saúde humana e de outros organismos vivos. Tais toxinas são denominadas de cianotoxinas e a classe das microcistinas é a mais tóxica e recorrente nas florações de cianobactérias presentes em todo mundo.

Neste contexto, torna-se necessário o monitoramento de microcistinas e suas concentrações em reservatórios de água para abastecimento público. Além disto, a detecção e o estudo das diferentes classes de peptídeos produzidos pelas cianobactérias presentes nestas florações são de interesse econômico e ecológico, já que estes peptídeos podem apresentar diferentes bioatividades.

Uma técnica eficiente para a análise de cianopeptídeos presentes nas florações, é a Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry (MALDI-MS). Esta técnica é extremamente rápida, possui alta resolução, requer pouquíssimo preparo de amostra e não permite que possíveis contaminantes presentes na amostra interfiram na análise. Por estes motivos MALDI-MS foi utilizada neste trabalho não somente na detecção de diferentes variantes de cianopeptídeos, mas também para quantificação de diferentes variantes de microcistinas. Sendo os objetivos gerais desta tese aplicar a técnica MALDI-MS no desenvolvimento de um método de quantificação de microcistinas avaliando o uso de diferentes matrizes e misturas binárias das mesmas; a aplicação de MALDI-IMS para o imageamento de cianobactérias de água doce, afim de verificar a dispersão espacial das cianotoxinas

produzidas pelas mesmas, e por fim, a análise de cianopeptídeos presentes em uma floração de cianobactérias da Represa Salto Grande (Americana-SP).

Capítulo 1

Desenvolvimento de método de quantificação de microcistinas por MALDI-TOF-MS, utilizando matrizes binárias.

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento de método de quantificação por MALDI-TOF-MS, utilizando matrizes binárias.

1. Introdução

1.1. Cianobactérias: fósseis vivos

As Cianobactérias, descritas como uma das formas mais antigas de vida presentes no planeta Terra, são consideradas como fósseis vivos e foram encontradas em rochas do Período Cambriano, com idade de aproximadamente 3,5 bilhões de anos (PERISSINOTTO et al., 2014). Estas rochas, denominadas de estromatólitos são formadas pela deposição laminar de carbonato de cálcio e outros sedimentos, que foram aprisionados durante os processos metabólicos e de crescimento das cianobactérias (RISHWORTH et al., 2017). Assim, a estrutura de um estromatólito apresenta camadas alternadas de células e sedimento (FIGURA 1).

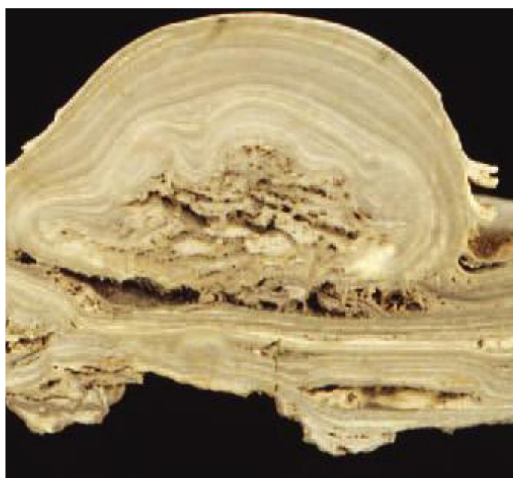


FIGURA 1 - Estromatólito encontrado no Lago Innes - Sul da Austrália. Fonte: Falconer, I. R. Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies (FALCONER, 2003a) .

1.2. Estrutura celular das cianobactérias

Cianobactérias são micro-organismos procariontes fotossintetizantes (SANT'ANNA et al., 2006). A FIGURA 2 apresenta a estrutura básica de uma célula de cianobactéria e seus componentes principais.

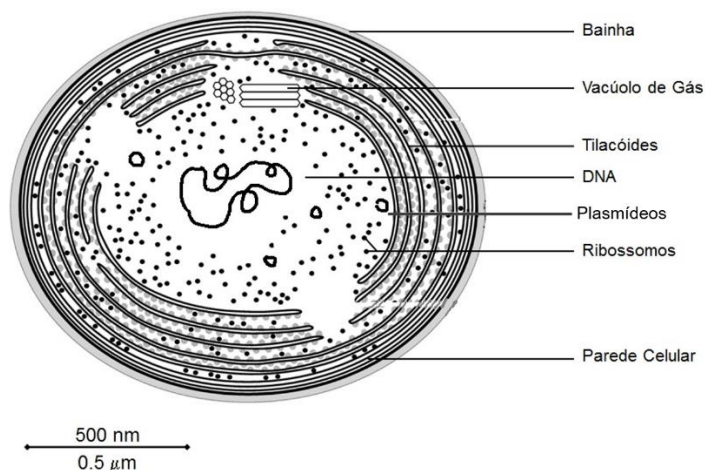


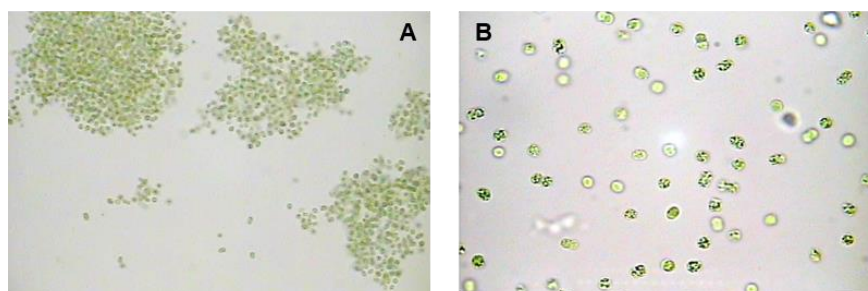
FIGURA 2 - Estrutura celular básica de uma cianobactéria. Fonte: <http://reasonandscience.heavenforum.org/t1551-cyanobacteria> (adaptado)

As células de cianobactérias possuem apenas um único cromossomo circular. No entanto, além deste cromossomo, algumas espécies possuem plasmídeos, pequenos filamentos de DNA circulares, espalhados em seu citoplasma (SCHWABE et al., 1988). As Cianobactérias possuem parede celular e sucessivas camadas de membranas fotossintetizantes, paralelas umas às outras, denominadas de tilacóides. Nestas membranas estão presentes os pigmentos: clorofila-*a* e a ficocianina, que são responsáveis pela fotossíntese e pela coloração verde que a maioria das espécies possuem (WHITTON; POTTS, 2000). Outros pigmentos, tais como carotenoides e ficoeritrinas podem estar presentes, no entanto estes oferecem uma forte coloração vermelha às cianobactérias (FALCONER, 2003a).

Algumas espécies de cianobactérias possuem vacúolos de gás, que permitem as células controlar sua posição vertical dentro da coluna de água, facilitando a locomoção das mesmas quando estão em busca de luminosidade e nutrientes necessários para sua sobrevivência (GANF; OLIVER, 1982).

Quanto a sua morfologia, as cianobactérias são encontradas na forma de cocos unicelulares como, por exemplo, a espécie *Microcystis aeruginosa*, ou na forma de filamentos como as espécies *Nostoc sp.* e *Anabaena cillindrica*.

As Cianobactérias unicelulares possuem uma bainha ou envoltório mucilaginoso, evidenciando a individualidade metabólica de cada célula quando as mesmas estão em suas colônias (FABBRO, 2002). A FIGURA 3 apresenta colônias e células da espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820.



Microcystis aeruginosa PCC7820

FIGURA 3 – Microscopia ótica para visualização da espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820. A) Visualização das colônias (aumento 40x), B) Visualização das células (aumento de 100x).

As espécies de cianobactérias filamentosas podem possuir células diferenciadas, com funções específicas (FALCONER, 2003a). Estas células possuem parede celular, no entanto não possuem tilacóides. Por exemplo, os heterocistos, células especializadas na fixação de nitrogênio, são maiores que as células comuns e podem estar presentes entre as células fotossintetizantes, no meio do filamento, ou até mesmo no final do mesmo (FIGURA 4) (FALCONER, 2003a).

Outro tipo de célula diferenciada é o acinete, com formato de uma grande esfera é geralmente encontrado no final do filamento. O acinete tem a finalidade de armazenar nutrientes e material genético, pois, uma vez que a célula morre, ele é a célula que fica em estado vegetativo, sendo responsável por regenerar um novo filamento quando as condições de vida se tornarem novamente favoráveis (FALCONER, 2003a). A FIGURA 4 apresenta as imagens de microscopia ótica das espécies A) *Anabaena cylindrica* PCC7122 e B) *Nostoc sp.* PCC9237, sendo destacados o heterocisto e o acinete, respectivamente.

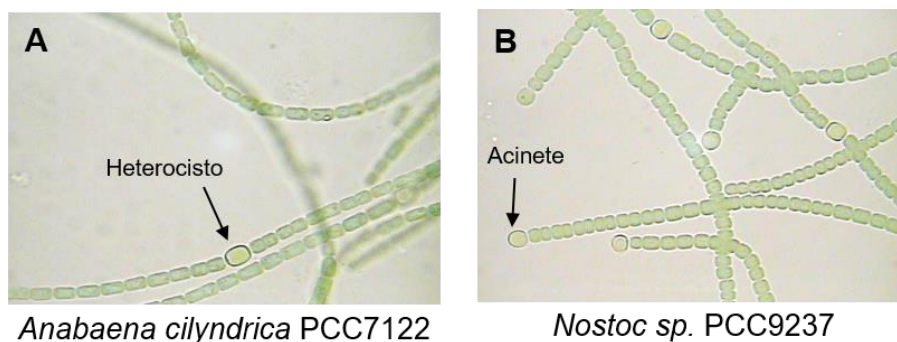


FIGURA 4 – Microscopia ótica (aumento 100x) das espécies A) *Anabaena cylindrica* PCC 7122, célula em destaque heterocisto e B) *Nostoc* sp. PCC 9237, célula em destaque acinete.

1.3. Nomenclatura e Classificação das Cianobactérias

As Cianobactérias são pertencentes ao Reino Monera e ao Filo Cyanobacteria. A classificação taxonômica quanto a Ordem destas espécies são realizadas de diferentes maneiras, sendo que as duas principais são: a classificação Botânica (KORMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1999), e a classificação bacteriológica (CASTENHOLZ, 1988).

Desta maneira, segundo a classificação botânica, as espécies de cianobactérias estão divididas em quatro Ordens diferentes: *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* e *Stigonematales* (FESSER, 2010). Segundo a classificação bacteriológica, cada uma destas ordens está dividida e representada em subseções.

Tanto a classificação botânica quanto a classificação bacteriológica são realizadas de acordo com a morfologia e reprodução das espécies de cianobactérias. A Tabela 1 apresenta as principais características de cada uma destas Ordens (Classificação Botânica), e sua subseção correspondente na classificação bacteriológica (FESSER, 2010).

Tabela 1 - Classificação de Ordens de cianobactérias de acordo com a classificação botânica e suas subseções correspondentes pela classificação bacteriológica. *Fonte: Chemical and Biological Investigations of Vietnamese Cyanobacteria.*

Classificação Botânica	Classificação bacteriológica	Características morfológicas e ocorrência no ambiente	Exemplos de Gêneros
Ordem Croococcales	Subseção I	Cianobactérias unicelulares. Sua reprodução ocorre em um ou mais planos, ou por brotamento. Suas colônias se mantem unidas por uma bainha de mucelagem. Suas espécies podem possuir vacúolo de gás. Vivem em água doce ou em água salgada.	<i>Microcystis</i>
	Subseção II	Cianobactérias unicelulares, suas colônias mantem-se unidas por <i>gel-like matrix</i> . As células se reproduzem por múltiplas divisões da célula mãe. Geralmente vivem em ambientes aquáticos.	<i>Pleurocapsa</i>
Ordem Oscillatoriales	Subseção III	Cianobactérias existentes na forma de tricomas. Não possuem células diferenciadas. Seus tricomas não possuem	<i>Oscillatoria</i> <i>Planktothrix</i> <i>Spirulina</i>

		ramificações. Algumas espécies possuem vacúolos de gás. A divisão celular ocorre sempre no plano perpendicular ao eixo longitudinal do tricoma. Suas espécies vivem em ambientes aquáticos diversos.	
Ordem Nostocles	Subseção IV	Cianobactérias filamentosas, possuem células diferenciadas, como acinetes e heterocistos. A reprodução celular ocorre por divisão binária. Suas espécies vivem desde ambientes aquáticos até ambientes terrestres.	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Nodularia</i>
Ordem Stigonematles	Subseção V	Cianobactérias na forma de tricomas, possuem ou não ramificações verdadeiras. Se reproduzem por divisão binária, que geralmente ocorre em mais de um plano. Podem possuir células diferenciadas. Ocorrem em ambientes aquáticos ou terrestres.	<i>Fischerella</i>

1.4. A ecologia das cianobactérias

No aspecto ecológico, as cianobactérias são consideradas uma das formas mais bem-sucedidas de vida (ROHRLACK; CHRISTIANSEN; KURMAYER, 2013), uma vez que, suas espécies podem ser encontradas em ecossistemas extremos, tais como as areias de desertos até rochas na Antártica. No entanto, a maior parte das espécies de cianobactérias habitam ecossistemas aquáticos, podendo também viver em condições extremas, como por exemplo em fontes termais, onde as temperaturas podem chegar até 77°C (WHITTON; POTTS, 2000). A FIGURA 5 apresenta imagens de cianobactérias encontradas em fontes termais e desertos.

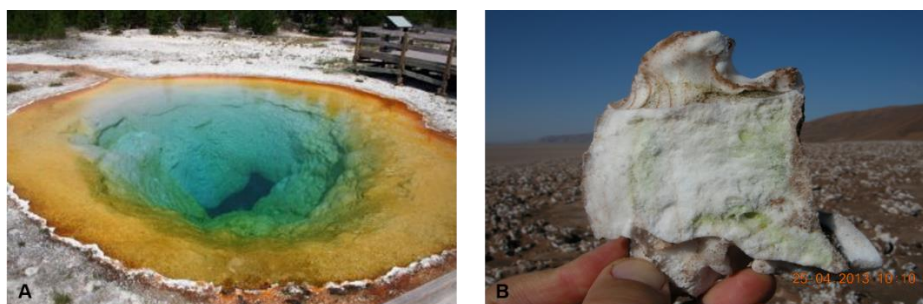


Figura 5 - Imagens de cianobactérias em A) Fonte Termal (Yellowstone National Park) e B) Deserto.

Fonte: A) <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/5D.html>, B) <http://www.kavlifoundation.org/science-spotlights/microbiome-astrobiology-how-search-life-other-worlds#.WL1UcPnyUk>

Além disto, as cianobactérias são encontradas em ambientes aquáticos com diferentes graus de salinidade, desde água doce, até ambientes com hipersalinidade com concentrações entre 3 e 4 mol/L (REED et al., 1984).

A população de células de cianobactérias em corpos de água varia sazonalmente de acordo com a temperatura da água, irradiação solar e com a concentração de nutrientes presentes no ecossistema aquático (FALCONER, 2003b). O pico de maior concentração celular ocorre do meio ao final do verão, quando a temperatura da água e a luminosidade que incide sobre sua superfície são maiores. Somado a estas condições, o crescimento celular das cianobactérias está intimamente ligado as concentrações de fósforo e nitrogênio presentes na água (DOLMAN et al., 2012), e quando estas chegam a alcançar números extremos induzem o crescimento exacerbado das cianobactérias, podendo aumentar a densidade celular em até 500% (SANT'ANNA et al., 2007), este fenômeno é denominado de floração de cianobactérias. A FIGURA 6 apresenta a extensão de uma

floração, mostrando algumas imagens de florações de cianobactérias obtidas por satélites da NASA.

O Lago Erie, localizado na Região dos Grandes Lagos, apresenta uma floração de cianobactérias recorrente, como nos mostra a figura abaixo. A Região dos Grandes Lagos, representa aproximadamente 20% da água doce superficial presente no mundo e 84% da água superficial que abastece cerca de 35 milhões de pessoas da América do Norte (CARMICHAEL; BOYER, 2016).

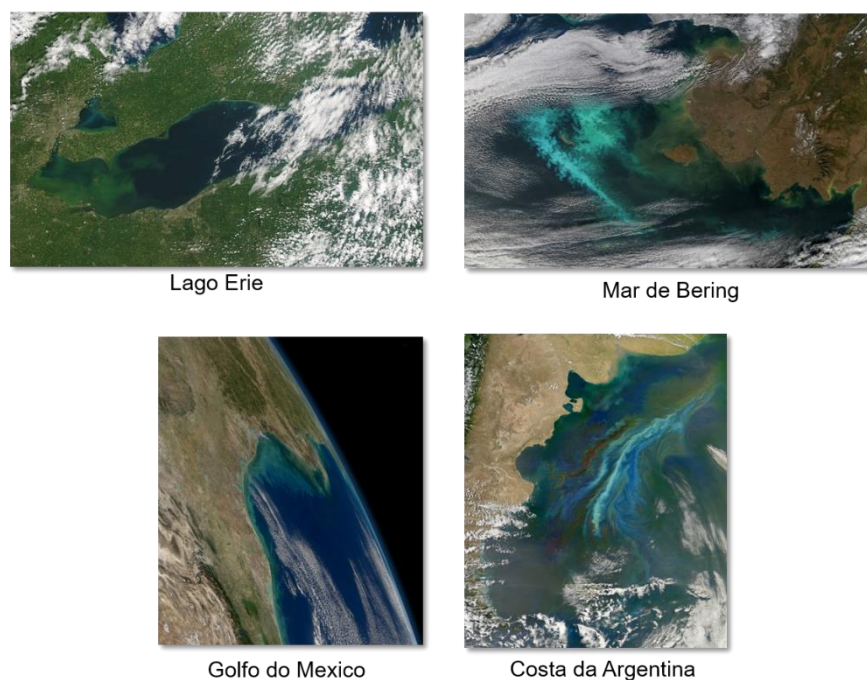


FIGURA 6 - Imagens de Florações de Cianobactérias obtidas por satélites. Lago Erie (EUA), Mar de Bering (Alasca), Golfo do México e Costa da Argentina. Fonte: NASA Goddard Space Flight Center/Flickr

Desta forma, a maioria das florações de cianobactérias é uma preocupação mundial recorrente, gerando custos socioeconômicos e ecológicos altíssimos (IBELINGS et al., 2016), uma vez que o abastecimento público de água, o turismo (em áreas de recreação) e a pesca são amplamente prejudicados. Além disto, estas florações causam o desequilíbrio da cadeia alimentar, pois o excesso de matéria orgânica contribui para a anoxia e morte dos peixes (IBELINGS et al., 2016). Ademais, um dos maiores perigos é que algumas espécies de cianobactérias, presentes na maioria destas florações, produzem metabólitos tóxicos, denominados cianotoxinas, que causam efeitos agudos ou crônicos na saúde humana e de outros organismos vivos (GUPTA et al., 2001).

1.5. Cianotoxinas

As cianotoxinas são mundialmente conhecidas por prejudicar a saúde humana. Estas toxinas podem causar irritações na pele através do contato com as mesmas, ou até intoxicações gastrointestinais crônicas e agudas, quando ingeridas, levando a morte dos indivíduos intoxicados. Além disto, as cianotoxinas são responsáveis por causarem adoecimento ou a morte de animais domésticos e selvagens (CARMICHAEL, 1997).

As cianotoxinas geralmente são agrupadas de acordo com seus principais efeitos toxicológicos, sendo classificadas em: neurotoxinas, dermatotoxinas, citotoxinas e peptídeos hepatotóxicos (MEREL et al., 2013).

1.5.1. Neurotoxinas

As neurotoxinas são alcaloides, que atuam como potentes bloqueadores neuromusculares que promovem a obstrução dos impulsos nervosos, causando a fasciculação muscular, diminuição da circulação sanguínea, cianose, paralisia e asfixia, provocando a morte do indivíduo em minutos ou horas, dependendo da quantidade de toxina ingerida (ARÁOZ; MOLGÓ; TANDEAU DE MARSAC, 2010).

Os principais gêneros de cianobactérias responsáveis pela produção das neurotoxinas são: *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Planktothrix sp.*, *Aphanizomenon*, entre outras (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013).

A FIGURA 7 apresenta estruturas das neurotoxinas anatoxina-a, anatoxina-a (s) e a saxitoxina.

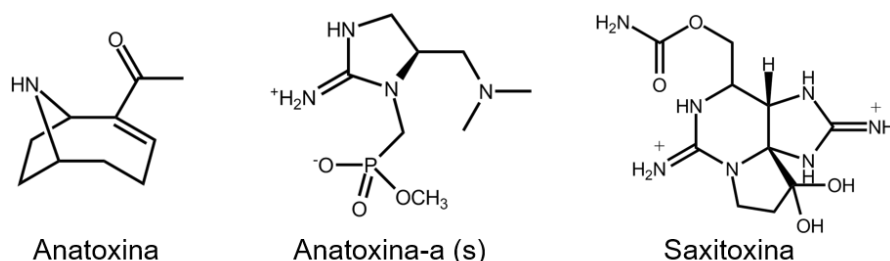


FIGURA 7 - Estrutura química das neurotoxinas Anatoxina, Anatoxina-a (s) e Saxitoxina.

1.5.2. Dermatotoxinas

As dermatotoxinas causam irritação e respostas alérgicas quando entram em contato com a pele de humanos ou animais. Se ingeridas, podem causar neutropenia, trombocitopenia e mudanças metabólicas como alcalose e acidose (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013).

As primeiras espécies estudadas quanto a produção destas cianotoxinas foram dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Anacystis* (RZYMSKI; PONIEDZIAŁEK, 2012).

As dermatotoxinas são lipossacarídeos (LPS), componentes da parede celular das cianobactérias. Essas moléculas possuem em sua estrutura carboidratos (geralmente hexoses) e lipídeos, com cadeias de 14 a 18 carbonos (FIGURA 8) (RZYMSKI; PONIEDZIAŁEK, 2012).

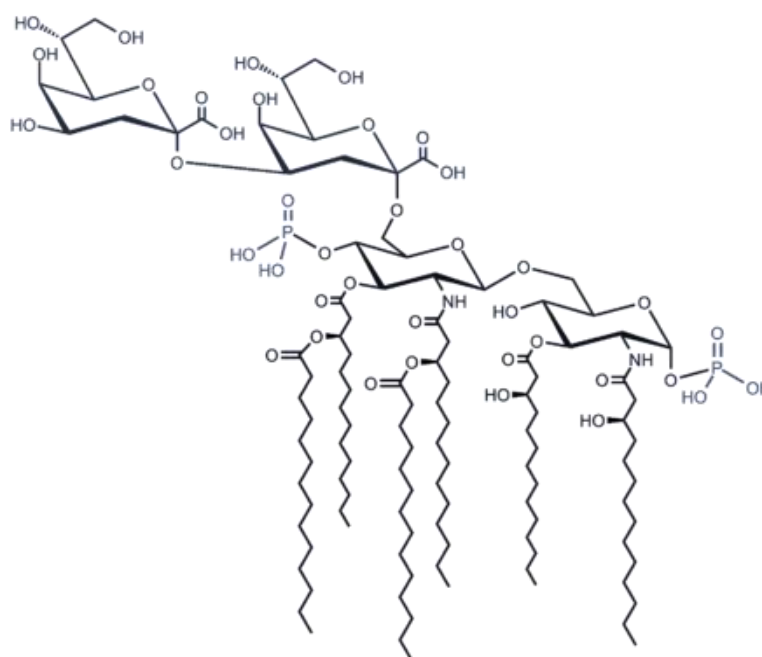


FIGURA 8 - Estrutura química de um lipossacarídeo (LPS)

1.5.3. Citotoxinas

As citotoxinas agem diretamente na síntese de proteínas, causando a inibição da produção proteica. Além disto, provocam a quebra das cadeias de DNA das células, acarretando problemas na divisão celular, o que pode levar a genotoxicidade, hepatotoxicidade e citotoxicidade das células do indivíduo intoxicado (WESTRICK et al., 2010).

Um exemplo de citotoxina é a cilindropermopsina (FIGURA 9). Esta citotoxina pode ser produzida pelas espécies: *Cylindropermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* e *Aphanizomenon ovalisporum* (ŽEGURA; ŠTRASER; FILIPIČ, 2011).

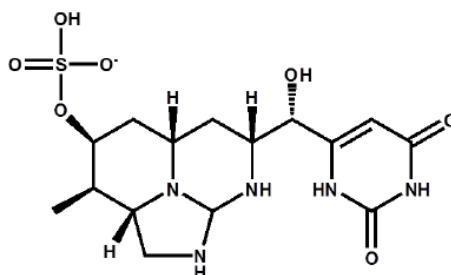


FIGURA 9 - Estrutura química da cilindropermopsina

1.5.4. Peptídeos Hepatotóxicos

As nodularinas e as microcistinas são as principais classes de peptídeos hepatotóxicos presentes nas florações de cianobactérias (RUNNEGAR; FALCONER; SILVER, 1981). Estas toxinas chegam ao fígado pelo transporte dos ácidos produzidos pela bile. Uma vez no citoplasma dos hepatócitos, os peptídeos hepatotóxicos inibem as atividades das enzimas serina/treonina fosfatases PP1 e PP2, induzindo a concentração de proteínas fosforiladas, resultando no descontrole da divisão celular, acarretando a promoção tumoral do fígado. A exposição aguda as microcistinas pode conduzir a necrose e a hemorragia intra-hepática, levando a morte dos indivíduos intoxicados, enquanto que a exposição crônica pode ocasionar neoplasia intestinal ou hepática (RUNNEGAR; FALCONER; SILVER, 1981).

A FIGURA 10 apresenta dois hepatócitos isolados, incubados por 30 minutos, em duas soluções sendo uma na ausência e na presença de microcistinas. Podemos observar, na FIGURA 10(a), que o hepatócito que não entrou em contato com a microcistina, apresenta-se normal. Já o hepatócito da FIGURA 10(b) que foi submetido à presença de microcistinas sofreu severa degeneração e necrose (RUNNEGAR; FALCONER; SILVER, 1981).

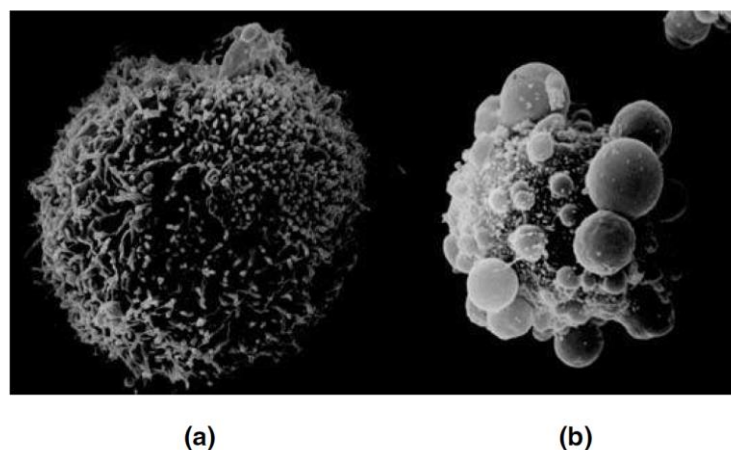


FIGURA 10 - Hepatócitos isolados incubados na ausência ou presença de microcistina: (a) hepatócito controle; (b) hepatócito incubado por 30 minutos na presença de microcistina. Fonte: *Microcystin Toxicity - Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies*.

1.5.4.1. Microcistinas

A classe das microcistinas (MC's) é a mais tóxica e mais recorrente toxina presente nas florações de cianobactérias (PUDDICK et al., 2013), sendo produzida por inúmeros gêneros, como: *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Plankthrix*, *Oscillatoria* (PRAKASH; LAWTON; EDWARDS, 2009)(YANG et al., 2014).

As MC's são heptapeptídeos cíclicos, que possuem em sua estrutura: quatro D-aminoácidos, dois L-aminoácidos variáveis (nas posições 2 e 4), e um amino ácido não usual, o Adda (ácido 2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metóxi-2,6-trimetil-8,10-deca-4,6-dienóico), apresentado na FIGURA 11.

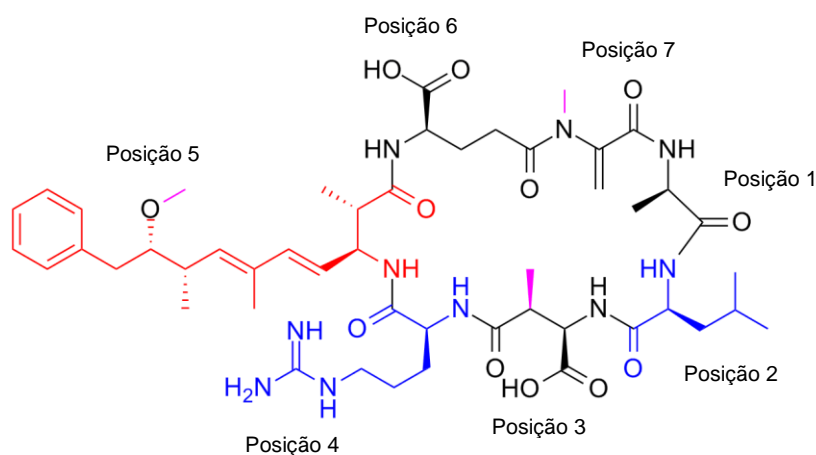


FIGURA 11 - Estrutura da microcistina-LR (MC-LR). Em azul: L-aminoácidos, posição 2, L e posição 4 R. Em vermelho: Adda, em preto: os quatro D-aminoácidos, posição 1, 3, 6 e 7.

A nomenclatura das MC's é baseada em suas principais variações estruturais. Os aminoácidos presentes na posição 2 e 4, definem parte de sua nomenclatura, por exemplo, a MC-LR possui o aminoácido leucina (L) na posição 2 e a arginina (R) na posição 4 (FERRANTI et al., 2013). Outros exemplos de estruturas de variantes de MC's e suas nomenclaturas estão apresentadas na FIGURA 12. Por exemplo, a [D-Asp³] Microcistina-LR, não possui a metila no aminoácido asparagina, na posição 3. Assim como a [D-Asp³, ADMAdda⁵] Microcistina-RR, que possui acetilação no aminoácido Adda, na posição 5. Dentre todas as modificações possíveis, atualmente, aproximadamente 100 variantes de MC's foram caracterizadas (CARMICHAEL; BOYER, 2016).

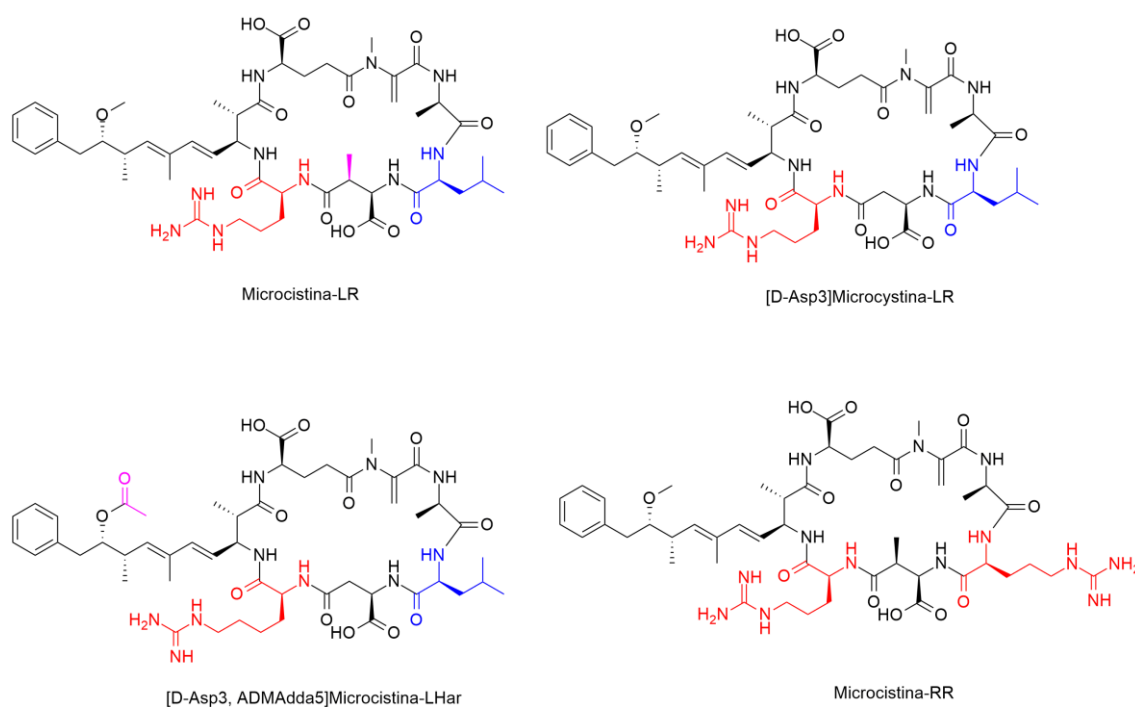


FIGURA 12 - Estruturas de algumas microcistinas e sua nomenclatura.

A toxicidade de cada microcistina varia de acordo com a sua estrutura. Por exemplo: a [(6Z)-Adda⁵] MC-LR, possui dose letal (LD₅₀) >1200 µg/kg. No entanto, a MC-LR, considerada a mais tóxica das MC's, possui LD₅₀=50µg/kg (HOWARD; BOYER, 2007). Devido à alta toxicidade desta MC, a Organização Mundial da saúde recomenda que a concentração de MC-LR em água potável não exceda 1,00 µg/L (EPA, 2015). Considerando tal fato, a informação de quais variáveis de MC's estão presentes nas florações de cianobactérias é de extrema importância, sendo então necessário o uso de técnicas capazes de realizar não somente a detecção das MC's,

mas também com a capacidade de identificá-las de acordo com suas variáveis estruturais.

1.5.4.2. Nodularinas

Assim como as microcistinas, as nodularinas também são peptídeos cíclicos, no entanto possuem cinco aminoácidos em sua estrutura (SARMA, 2013). Apresenta o aminoácido Adda, e apenas um aminoácido variável, na posição 4. A nomenclatura deste peptídeo também é baseada de acordo com este aminoácido variável e de acordo com os diferentes graus de metilação que a estrutura pode conter (PAERL; OTTEN, 2013). A FIGURA 13 apresenta duas estruturas diferentes de nodularinas e sua nomenclatura. A nodularina-R apresenta o aminoácido arginina (R) na posição 4, e a nodularina-Har possui o aminoácido homoarginina nesta mesma posição. Sete variantes desta classe de cianotoxinas foram caracterizadas até o momento (SANT'ANNA et al., 2007).

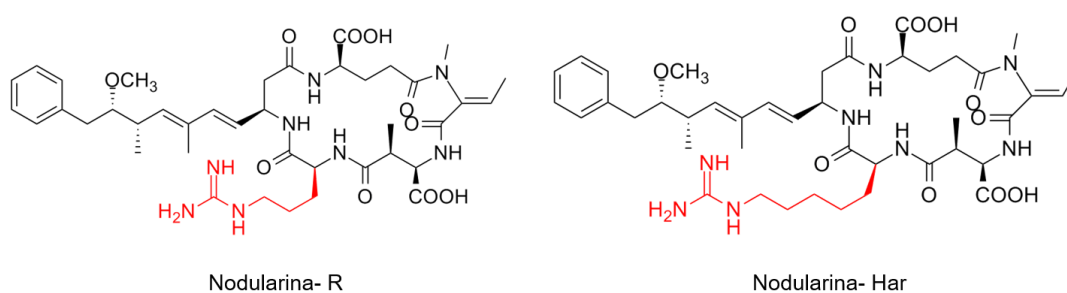


FIGURA 13 - Estruturas e nomenclatura da nodularins- R e nodularina-Har.

1.6. Quantificação de Microcistinas: a importância, métodos utilizados e seus desafios

O lançamento do esgoto das cidades em rios e lagos é um dos maiores responsáveis pela formação das florações de cianobactérias em todo o mundo. A falta de tratamento ou o tratamento inadequado do esgoto no Brasil carrega os nutrientes fósforo e nitrogênio para os corpos d'água, o que induz o crescimento exacerbado das cianobactérias (DOLMAN et al., 2012). Com o crescimento demográfico, o aumento da produção industrial e desenvolvimento da agricultura, onde o uso de agroquímicos é utilizado, a partir da década de 90 as florações de cianobactérias começaram a ser frequentes em algumas regiões do país (CARNEIRO et al., 2012).

No início de 1996, ocorreu um caso de extrema relevância no Estado de Pernambuco. Na cidade de Caruaru, 126 pacientes renais crônicos passaram a apresentar um quadro clínico de hepatotoxicose após terem sido submetidos às sessões de hemodiálise (CARVALHO et al., 2016)(LONE; KOIRI; BHIDE, 2015). Destes, 60 pacientes vieram a óbito. Com o conhecimento prévio da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água da região, foi conjecturada a hipótese dessas intoxicações terem sido causadas por hepatotoxinas presentes na água utilizada durante as sessões de hemodiálise (LONE; KOIRI; BHIDE, 2015). As análises confirmaram a presença de MC's na água utilizada na clínica, especificamente as MC-LR, MC-YR e MC-AR (POURIA et al., 1998), bem como em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados (CARMICHAEL et al., 2001).

Os níveis de MC's em amostras ambientais são geralmente monitorados através diferentes técnicas analíticas. Ensaio bioquímico, como testes imuno enzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) (QIAN et al., 2015) ou de inibição da proteína fosfatase (PPIA) (LAMBERT et al., 1994) são amplamente utilizados para detecção e quantificação de MC's, devido à alta sensibilidade que apresentam. No entanto estas técnicas podem obter resultados falso positivos, ou falso negativos, além disto, não são capazes de identificar as diferentes variáveis estruturais de cada MC. Atualmente, outras metodologias têm sido relatadas na literatura, tais como o desenvolvimento de imuno sensores eletroquímicos não-enzimáticos, que utiliza nanopartículas de Ag (ZHAO et al., 2016), ou também imuno ensaios colorimétricos,

baseado em contas magnéticas usando anti-corpos conjugados com nano partículas de ouro (NEUMANN et al., 2016).

Além disso, técnicas hífenadas, tais como eletroforese capilar (VASAS et al., 2006), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (CONG et al., 2006) ou ultra-cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC) (LI et al., 2011) também têm sido estudadas. No entanto, estas técnicas requerem muito tempo para manipulação das amostras, tais como extração e pré-concentração das mesmas. E os tempos das eluições cromatográficas para análises de MC, quando se utiliza a técnica HPLC, são demasiadamente longos, com tempo de aproximadamente de trinta minutos (RAMOS et al., 2000).

Alguns avanços foram obtidos usando UPLC, em que o tempo de execução da análise durou cerca de oito minutos para a quantificação de MC-LR em água de torneira (LI et al., 2011). Para a análise de MC's, HPLC ou UPLC comumente são acoplados a UV-vis, Espectrometria de Massas (MS) ou Tandem Mass Spectrometry (MS/MS ou MS²). Diferentes das análises por UV-vis, as análises realizadas por MS podem identificar diferentes variantes de MC's, fornecendo informações de MC já conhecidas, de acordo com os sinais de *m/z* característicos de cada uma delas, ou ainda pode auxiliar na elucidação de novas estruturas, utilizando análises de MS/MS como ferramenta.

Uma técnica eficiente para a análise de MS de MC's presentes em florações de cianobactérias, é a Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry (MALDI-MS) (QUESADA, 2014).

A técnica MALDI-MS é extremamente rápida, possui alta resolução e requer pouquíssimo preparo de amostra. Além disto, não permite que possíveis contaminantes presentes na amostra interfira na análise e possui baixo consumo de reagentes (QUESADA, 2014). Por estes motivos MALDI-MS tem sido amplamente utilizada não somente na detecção de diferentes variantes de MC's, mas também para quantificação das mesmas, pois possui alta detectibilidade e é capaz de identificar as MC's diretamente de amostras ambientais de florações, sem a necessidade da extração destas substâncias em laboratório (WEHR et al., 2015). Os detalhes dos princípios da técnica MALDI-MS serão descritos no próximo tópico desta tese.

1.6.1. Matrix Laser Assisted Desorption/Ionization (MALDI)

A fonte de ionização MALDI foi desenvolvida pelos pesquisadores Michel Karas e Franz Hillenkamp, na Universidade de Münster, Alemanha. Em 1987, foi publicado o artigo que descreveu por completo os princípios desta técnica que recebeu grande destaque, pois MALDI-MS tornou possível a ionização de moléculas com massa molecular acima de 10.000 Da, termo lábeis e não voláteis (KARAS; HILLENKAMP, 1988). Com o passar dos anos, os princípios que foram detalhados neste artigo tiveram nenhuma ou pouquíssimas adições e correções. No entanto, a configuração dos equipamentos e as aplicações da técnica aumentaram exponencialmente.

O processo de ionização por MALDI-MS, apresentado na FIGURA 14, ocorre pela incidência de um laser em uma mistura sólida, co-cristalizada de matriz/analito. Esta mistura é realizada sobre uma placa de metal (geralmente aço). Após a cristalização matriz/analito a placa de MALDI-MS é levada para dentro do espectrômetro de massas, onde a ionização ocorre em alto vácuo.

A ionização por MALDI-MS ocorre a partir da incidência do laser sobre a mistura matriz/analito. A matriz absorve a energia do laser no comprimento de onda utilizado, fazendo com que ocorra a dessorção e a ionização do analito (GREAVES; ROBOZ, 2014). Os detalhes dos princípios da técnica serão descritos a seguir.

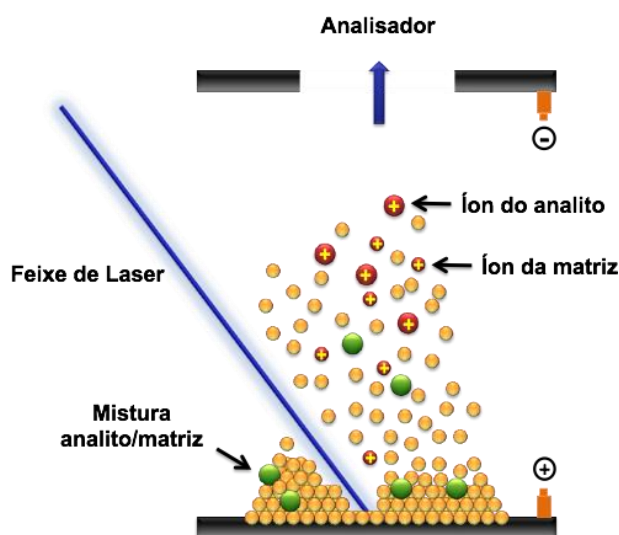


FIGURA 14 - Representação da fonte de ionização MALDI-MS. Fonte: Milagre, H.M.S.

1.6.1.1. Principais componentes da fonte de ionização MALDI: o comprimento de onda do laser

O comprimento de onda do laser utilizado é um importante parâmetro na técnica MALDI-MS. A escolha das matrizes de MALDI-MS que serão utilizadas está intimamente ligada ao tipo de laser que o equipamento possui.

Existem inúmeros tipos de laser, que variam sua natureza química e principalmente o comprimento de onda que emitem. A grande maioria dos equipamentos de MALDI-MS utilizam o laser de nitrogênio, com comprimento de onda utilizado de 337 nm. Neste caso consideramos a técnica como UV-MALDI, comumente utilizada com as matrizes α -ciano-4-hidroxicinâmico e o ácido 2,5-dihidroxibenzóico, compatíveis com a absorção de energia no comprimento de onda utilizado (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007).

No entanto, outros comprimentos de onda podem ser utilizados, como por exemplo 2,79 μm , referente ao laser Er:YSSG, considerados como IR-MALDI (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007).

1.6.1.2. Principais componentes de MALDI – Matrizes, suas estruturas e funções

A fonte de ionização MALDI, como o próprio nome define, utiliza uma matriz que assiste à ionização. A matriz possui o principal papel de absorver a energia do laser, para então, dessorver e ionizar o analito.

As matrizes de MALDI-MS geralmente são compostos orgânicos de baixa massa molecular, e possuem a capacidade máxima de absorção de energia no comprimento de onda do laser utilizado. Estas matrizes devem apresentar algumas características, tais como: ser estáveis nas condições de vácuo utilizadas pelo equipamento e não podem reagir com o analito (HOSSAIN; LIMBACH, 2010).

Apesar de toda versatilidade da técnica MALDI-MS ainda não foi possível o desenvolvimento de uma matriz universal que seja aplicável aos diferentes analitos e aos diversos propósitos analíticos designados para MALDI-MS. O que existem são matrizes distintas de primeira escolha para determinadas classes de compostos (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007). Como por exemplo, o ácido 3-hidroxipicolínico, utilizado nas análises de ácidos nucleicos, ou os ácidos α -ciano-4-hidroxicinâmico e o 2,5-diidroxibenzóico que geralmente são empregados nas

análises de peptídeos e proteínas. As estruturas destes compostos estão apresentadas na FIGURA 15.

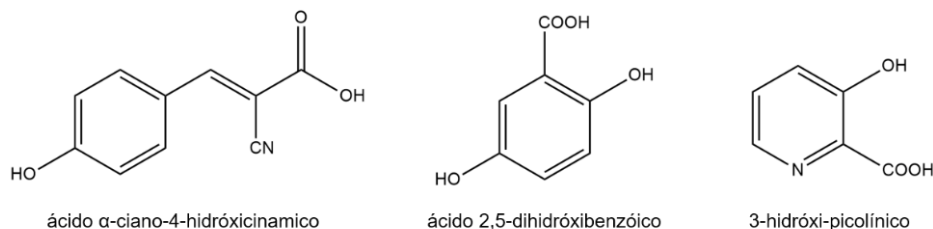


FIGURA 15 - Principais matrizes utilizadas em UV-MALDI.

1.6.1.3. Mecanismos de ionização por MALDI

Os mecanismos de dessorção/ionização são complexos e ainda não foram totalmente elucidados (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007). Portanto, inúmeros são os trabalhos que discutem tais processos.

Os espectros gerados por MALDI-MS apresentam preferencialmente íons monocarregados, com sinais de m/z de íons do analito carregados por prótons $[M+H]^+$, ou por adutos metálicos como, por exemplo, com sódio $[M+Na]^+$ ou potássio $[M+K]^+$. Para explicar o mecanismo de formação destes íons monocarregados, dois modelos diferentes foram propostos, 'lucky survivor' e 'Gas phase protonation', que serão detalhados abaixo.

a) 'Lucky survivors' (KARAS, 2000)

O modelo 'lucky survivors' explica a formação de íons monocarregados, $[M+H]^+$. M. Karas e colaboradores (2000) detalharam tal modelo, que é baseado desde o preparo da amostra, até a ionização dos analitos.

Neste modelo, considera-se que inicialmente, há uma mistura sólida de matriz/analito, na qual as moléculas do analito estão isoladas uma das outras. Isto ocorre devido à alta concentração da matriz, considerada muito maior que a concentração do analito.

Além disto, é considerado que as moléculas dos analitos mantêm o estado de carga que possuem quando as mesmas estão em solução. Então o pH é aproximadamente conservado dentro dos cristais da matriz. Desta maneira, o excesso

de carga positiva presente em torno do analito é contrabalanceada com contra-íons, sendo eles os ânions da matriz, ou contaminantes da mesma, tais como Cl⁻.

A incidência do pulso do laser, que ocorre sobre a mistura matriz/analito, faz com que ocorra a absorção da energia do laser pela matriz, possibilitando a ablação/dessorção de pequenos clusters de matriz/analito.

O excesso de energia absorvida pela matriz permite que ocorra uma série de reações de neutralização, que resultam em espécies mais estáveis. Ou então, tal energia gera a dessolvatação e a evaporação de moléculas neutras e espécies iônicas presentes nestes clusters, de tal forma que a maioria das moléculas são neutralizadas e, o estado de carga dos íons de analito pré-formados em solução são mantidos. Estes íons monocarregados, são denominados de 'lucky survivors'.

b) 'Gas phase protonation' (KARAS; KRU, 2003; KNOCHENMUSS; ZENOBI, 2003)

Diferentemente do 'Lucky survivors', o modelo 'Gas phase protonation' considera que as moléculas dos analitos estão neutras em solução sólida com a matriz.

Então, após a absorção da energia do laser pela matriz ocorre a ablação/dessorção destes compostos. O excesso de energia absorvida é dissipado provocando sucessivas colisões das moléculas de analito com as moléculas de matriz, resultando na transferência de próton da matriz para o analito, gerando assim, íons monocarregados.

Em 2011, os pesquisadores M.Karas e T. W. Jaskolla, publicaram um estudo mais aprofundado sobre como ocorre a formação de íons por MALDI-MS, neste trabalho conseguiram concluir que os dois modelos 'Lucky survivors' e 'Gas phase protonation' contribuem para o processo de ionização por MALDI-MS, então formularam o 'Mecanismo unificado de ionização do analito por MALDI-MS' (JASKOLLA; KARAS, 2011), apresentado na FIGURA 16.

Neste trabalho, os pesquisadores verificaram que alguns parâmetros, tais como a influência do laser, a afinidade por prótons tanto do analito quanto o da matriz; assim como a composição e o tamanho dos cristais formados no preparo de amostra, podem influenciar no mecanismo de ionização do analito. Por exemplo, o processo 'Gas phase protonation' preferencialmente ocorre quando matrizes com maior reatividade e menor afinidade por prótons são utilizadas, como por exemplo α -ciano-

4-clorocinâmico. Entretanto, peptídeos de maior massa molecular, analisados com CHCA como matriz, são 90% ionizados de acordo com o processo 'Lucky survivors' (JASKOLLA; KARAS, 2011).

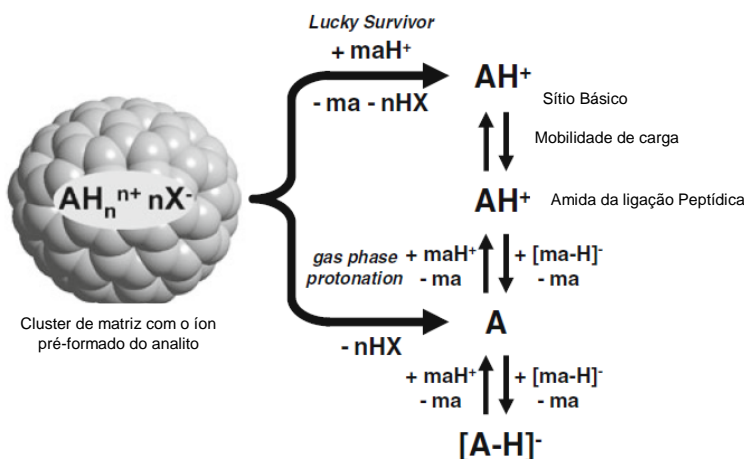


FIGURA 16 - Mecanismo Unificado de ionização do analito por MALDI-MS.

1.6.1.4. Metodologias de preparo de amostra para análise por MALDI-MS.

Para uma amostra ser analisada por MALDI-MS apenas um pequeno volume da solução de analito e matriz é necessário. A solução de analito, com concentração em torno de 10^{-6} mol/L, geralmente é misturada com a solução da matriz com concentração próxima a saturação, 0,10 mol/L (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007). Essa mistura pode ser realizada de diversas maneiras dependendo do modo de preparo escolhido.

O preparo de amostra, que envolve a homogeneização da mistura matriz/analito e a cristalização da mesma, é considerado a etapa mais importante em uma análise por MALDI-MS, pois a qualidade deste preparo terá influência direta na qualidade dos espectros obtidos (HOSSAIN; LIMBACH, 2012).

Os métodos de preparo de amostras para análise por MALDI-MS visam à redução da complexidade da mesma, minimizando ou eliminando sinais que podem interferir na análise a ser realizada. Tais métodos devem ser altamente reprodutíveis e não podem introduzir contaminantes na amostra, resultando em uma maior variabilidade nas intensidades dos sinais dos analitos (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008).

Devido a versatilidade da técnica MALDI-MS, existem inúmeros protocolos de preparo de amostra relatados na literatura que podem ser utilizados de acordo com o objetivo a ser atingido. Alguns exemplos destes protocolos serão descritos a seguir.

1) *Dried droplet*: este preparo de amostra foi originalmente publicado pelos pesquisadores Karas e Hillenkamp no ano de 1988.

Nesta técnica, a matriz e a amostra são preparadas em um mesmo sistema de solventes. Em seguida, 1,00 μL de cada uma destas soluções são misturadas, e adicionadas sobre a placa de MALDI e então, esta mistura é cristalizada a temperatura ambiente (KARAS; HILLENKAMP, 1988).

2) *Vacuum-drying*: este método de preparo de amostra é apenas uma variação do *Dried droplet*. A mistura matriz/amostra também ocorre antes da aplicação da mesma na placa de MALDI, no entanto, a gota é cristalizada dentro de um dessecador, sob vácuo. Isto ocorre com a finalidade de reduzir o tamanho dos cristais, e conseqüentemente aumentar a homogeneidade matriz/amostra (PAPAC; WONG; JONES, 1996).

3) *Vacuum-drying* adaptado: método adaptado no grupo *Milagre* de pesquisa. Nesta técnica o preparo de amostra é baseado no método *Vacuum-drying*. A diferença é que no *Vacuum-Drying* adaptado a amostra e a matriz são adicionadas na placa de MALDI em momentos distintos, de modo que 1,50 μL de amostra é depositada na placa, e é secada em um dessecador sob vácuo. Em seguida, a matriz é adicionada sobre a amostra, e a placa novamente é colocada sob vácuo, para que a mistura matriz/amostra cristalice (SANDONATO. B. B, 2013).

A cristalização e a homogeneização da mistura matriz/amostra são variáveis que devem ser observadas durante o preparo de amostra. Cristalizações rápidas geram cristais menores e uma incorporação mais homogênea do analito na estrutura cristalina da matriz, ao passo que uma cristalização demorada resulta em cristais maiores e a incorporação do analito na amostra pode ocorrer de forma altamente variável (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008).

O resultado da formação e deposição dos cristais sobre a placa de MALDI depende intimamente da matriz escolhida e da tensão superficial criada pelo sistema matriz/analito/solvente, que pode acarretar a distribuição não uniforme dos cristais formados sobre o spot (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007).

Os espectros obtidos com melhor qualidade, claramente são gerados onde a incidência do laser ocorre sobre os locais do spot onde há maior concentração de cristais. Então, quando não há homogeneidade na cristalização a qualidade das análises realizadas requer a interferência manual do analista que controla o experimento. Alguns equipamentos possuem um microscópio, que torna capaz a observação do sistema e auxilia na aquisição dos espectros. No entanto, em alguns casos, a aquisição ocorre de maneira subjetiva, pois não há meios de observar os locais que possuem maior concentração de cristais (HILLENKAMP; PETER-KATALINIC, 2007). A FIGURA 17 apresenta nitidamente as irregularidades que podem ocorrer na cristalização da mistura matriz/amostra e a variabilidade dos espectros obtidos.

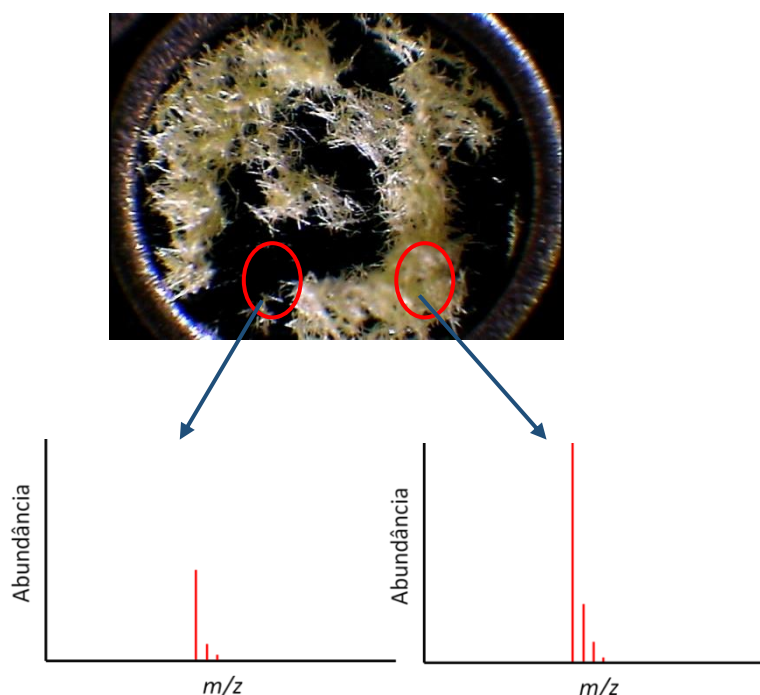


FIGURA 17 - Representação da formação de 'hot-spots' e a variabilidade dos espectros obtidos, dependendo do local onde o laser incide. Fonte: Bronzel, 2015 - adaptado.

A irregularidade na cristalização matriz/analito faz com que a baixa reprodutibilidade *shot-to-shot* (referentes aos pulsos do laser que incide sobre a mistura analito/matriz) e *spot-to-spot* (devido à dificuldade de obter cristalizações iguais para diferentes spots) sejam problemas inerentes da técnica MALDI-MS. Resultando num grande desafio que leva os pesquisadores da área buscar e criar novas metodologias para resolver estes problemas, desde criar e adaptar novos protocolos de preparo de amostra, até testar e desenvolver diferentes matrizes.

Estes inconvenientes foram solucionados, em parte, pelo uso de um padrão interno. Para a quantificação de microcistinas, o padrão interno utilizado pelos pesquisadores é a Angiotensina I ou a Bradicinina (PUDDICK et al., 2012). Para melhorar a homogeneidade na cristalização da matriz, este capítulo apresenta o desenvolvimento de um método de quantificação de MC's possibilitando uma melhor homogeneidade de cristais por todo o spot, assim como sua reprodutibilidade em outros spots, como mostram os resultados gerados.

1.6.2. A aplicação de MALDI-MS como ferramenta para a quantificação de microcistinas

A partir das informações relatadas na introdução deste capítulo, temos que a identificação e quantificação dos diferentes tipos de MC's são de extrema importância e de grande interesse. No entanto, a técnica MALDI-MS possui alguns inconvenientes quando utilizada para quantificação, devido à baixa reprodutibilidade *shot-to-shot* e *spot-to-spot*. Para solucionar esse problema, várias abordagens estão descritas na literatura, como por exemplo, procedimentos empíricos como a seleção matriz e otimização do protocolo de preparação de amostras (PUDDICK et al., 2012). Outra alternativa utilizada é a combinação de diferentes matrizes para aumentar a homogeneidade da distribuição da amostra ao longo da superfície do spot e aumentar a reprodutibilidade spot-to-spot (PAPAC; WONG; JONES, 1996). Neste contexto, este capítulo tem o objetivo de desenvolver um método para a quantificação de MC's e diferentes peptídeos por MALDI-TOF-MS, utilizando uma combinação de duas matrizes de MALDI.

2. Objetivos

Este capítulo tem como objetivo o desenvolvimento de um sistema de matrizes binárias para a quantificação de microcistinas por MALDI-MS. A metodologia desenvolvida visa a homogeneidade matriz/amostra ao longo de todo o spot, afim de reduzir ao máximo os desafios inerentes a esta técnica de ionização.

Além disto, este capítulo visa o desenvolvimento de um método extremamente rápido e eficiente para a quantificação de diferentes variantes de MC's e outros peptídeos utilizando MALDI-TOF-MS, testando diferentes matrizes e sistemas binário.

3. Materiais e Métodos

3.1. Padrões químicos, solventes e matrizes

As matrizes ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), ácido α -ciano-4-benziloxicinâmico, ácido α -ciano-4-fenilcinâmico, ácido cafeico, ácido cumarico, ácido ferúlico, ácido sinapínico (SA), ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DHB) e acetato de angiotensina I humana $\leq 90\%$, MC-LR, MC-RR, MC-YR, foram obtidas pela empresa Sigma-Aldrich. O ácido α -ciano-4-clorocinâmico foi obtido pela Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). Água ultrapura (com resistividade $>18\text{M}\Omega\text{-cm}$) e os solventes (HPLC grade) foram utilizados para o preparo de todas as soluções.

3.2. Parâmetros utilizados pelo Equipamento

As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF-MS Micromass-Waters (M@LDI-LR, Manchester, Reino Unido). Os espectros foram adquiridos no modo reflecton e positivo, com as voltagens do equipamento conforme descritas na Tabela 2. O laser utilizado foi o de nitrogênio ($\lambda = 337\text{ nm}$). O equipamento foi calibrado com polietilenoglicol (PEG) no intervalo entre m/z 600-1250, para resolução acima de 10000.

Para realizar as análises utilizou-se uma placa de MALDI de aço inoxidável de 96 spots (Micromass[®], Manchester, Reino Unido). Cada um dos *spots* possui a capacidade de 1.50 μL , e a placa possui 4.00x5.50 cm de dimensão.

Todos os espectros obtidos foram tratados no *software* Masslynx 4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido).

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para as análises por MALDI-TOF.

Parâmetros	Voltagens (V)
Tensão de pulso	2500
Tensão do reflecton	2000
Tensão da fonte	15000
Tensão do MCP (microchannel plate - detector)	18000

3.3. A energia do laser utilizada

Com o objetivo de obter os melhores e reprodutivos espectros possíveis, primeiramente a energia ótima do laser foi avaliada para cada matriz, e então fixada para todas as análises que foram realizadas posteriormente.

No equipamento utilizado existe três opções de níveis de energia de laser fornecidos para a análise: alta, média e baixa, e cada um destes níveis, possuem o ajuste fino representado em porcentagem (%), em um intervalo de 0-100% para cada um deles.

Então, para as matrizes: CHCA, ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico, ácido α -ciano-4-benziloxicinâmico, ácido α -ciano-4-fenil-cinâmico e ácido sinapínico o laser foi definida em baixa potência; para a matriz de ácido ferúlico e ácido cumárico, a potência do laser foi definida no médio, e para o ácido cafeico, em alta potência.

3.4. Preparo das soluções de matriz

Matriz individual: todas as soluções de matriz foram preparadas em 70% de acetonitrila, 30% de água deionizada e 0,10% de ácido trifluoroacético. Todas as soluções de matriz foram preparadas na concentração de 20,00 mg/mL.

3.5. Sistemas de Matrizes Binárias

Com o objetivo de otimizar o método de preparo de amostra para a análise quantitativa de MC's por MALDI-TOF-MS foram utilizados diversos sistemas de matrizes binárias combinando as matrizes α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), ácido gentísico (DHB), ácido α -ciano-4-clorocinâmico, ácido α -ciano-4-benziloxicinâmico e ácido sinapínico (SA).

3.6. Soluções Padrão

Todas as soluções padrão foram preparadas em metanol/água 40% (v/v). Cada uma delas foram misturadas na proporção 9:1 (v/v) com uma solução de contendo Angiotensina I (Padrão Interno) e $ZnSO_4$, de modo que a concentração final destes compostos eram de 2,50 μ mol/L e 5,00 mmol/L respectivamente.

Para medir a precisão das matrizes avaliadas, foi calculado o coeficiente de variação para cada uma delas, utilizando 2,50 µmol/L de MC-RR. A matriz individual e matriz binária que apresentaram melhores dados de precisão foram selecionadas para construir curvas de calibração para uma delas, utilizando como padrões as MC-RR, MC-LR e MC-YR, nas concentrações 10,00, 7,00, 5,00, 2,50, 1,00, 0,50, 0,10 µmol/L.

3.7. Preparo de amostra

O método de preparo de amostra utilizado foi o *Vacuum Drying* Modificado (SANDONATO. B. B, 2013). Inicialmente 1,00 µL de amostra foi aplicado sobre um spot da placa de MALDI, em seguida foi realizada a secagem da amostra em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo (Tecnal, modelo TE-058). Após a secagem da amostra, 1,50 µL de solução da matriz foi adicionado por cima da amostra seca, e então a placa foi novamente levada para a o vácuo, onde ocorreu a cristalização da mistura matriz/amostra.

3.8. Tratamento estatístico dos dados obtidos

Foram testados neste capítulo, dois métodos diferentes para a quantificação de microcistinas, o primeiro utilizando diferentes matrizes de MALDI-MS e o outro utilizando sistemas de matrizes binárias. Para avaliar a precisão destes métodos o coeficiente de variação (CV) foi calculado para cada deles. Os CVs foram calculados com base nas análises, realizadas em quadruplicata, a partir da relação entre o desvio padrão e a média, obtidos pela razão entre as intensidades dos sinais das análises de MC-RR (2,50 µmol/L) e do padrão interno, Angiotensina I (2,50 µmol/L), de acordo com a equação:

$$CV = (s/X) * 100$$

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a equação abaixo.

$$LD = \frac{(3,14*s) - b}{m}$$

Todos os fatores desta equação foram obtidos através de uma curva de calibração, construída no intervalo de x_0 à x_s , sendo x_0 o branco, e x_s uma amostra de concentração igual a $0,10 \mu\text{mol/L}$.

Os valores de m e b são os respectivos coeficientes angular e linear desta curva, e s é o valor obtido do desvio padrão de sete replicatas de x_s . 3,14 é o valor de *one-tailed-t-test* com 99% de confiança. O limite de quantificação do método (LQ) é calculado com estes mesmos valores, no entanto o fator de multiplicação é 10 ao em vez de 3,14.

4. Resultados e Discussões

Até o presente momento, os métodos de quantificação de microcistinas descritos na literatura foram desenvolvidos a partir de diferentes protocolos de preparo de amostra já descritos em estudos anteriores (PUDDICK et al., 2012). Entretanto, este é o primeiro trabalho no qual diferentes matrizes, e diferentes sistemas de matrizes binárias foram avaliadas, fixando o preparo de amostra.

Neste trabalho as matrizes foram selecionadas com base na estrutura da matriz de MALDI-MS do ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico, amplamente utilizada nas análises de peptídeos, sendo a principal matriz utilizada para análise de MC's (Tabela 3). Os ácidos α -ciano-4-fenil-cinâmico, ácido α -ciano-4-benziloxi-cinâmico, ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico, diferem pelo grupo ligado na posição R₂. Os ácidos ferúlico, cafeico e cumárico, não possuem o grupo ciano ligado na posição α à carboxila, e têm grupos diferentes ligados nas posições R₁, R₂ e R₃. A matriz DHB foi escolhida para ser testada neste trabalho por ser amplamente utilizada nas análises de peptídeos por MALDI-TOF-MS.

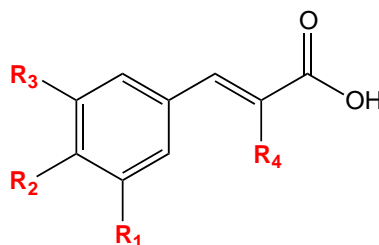


Tabela 3 - Estruturas das matrizes de MALDI-MS utilizadas neste trabalho.

Matriz	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico	H	OH	H	CN
Ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico	H	Cl	H	CN
Ácido α -ciano-4-benziloxi-cinâmico	H	Benziloxi	H	CN
Ácido α -ciano-4-fenil-cinâmico	H	Ph	H	CN
Ácido sinapínico	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	H
Ácido ferúlico	CH ₃ O	OH	H	H
Ácido cafeico	OH	OH	H	H
Ácido cumárico	H	OH	H	H

Para avaliar o desempenho de cada matriz testada, foram realizadas análises que utilizaram a MC-RR (m/z 1038.62), obtida comercialmente, como analito, e Angiotensina I (m/z 1296.71) como padrão interno. A FIGURA 18 apresenta um espectro obtido em uma destas análises. Neste espectro estão apresentados os sinais de m/z de cada padrão e abaixo, a respectiva intensidade obtida para cada um deles.

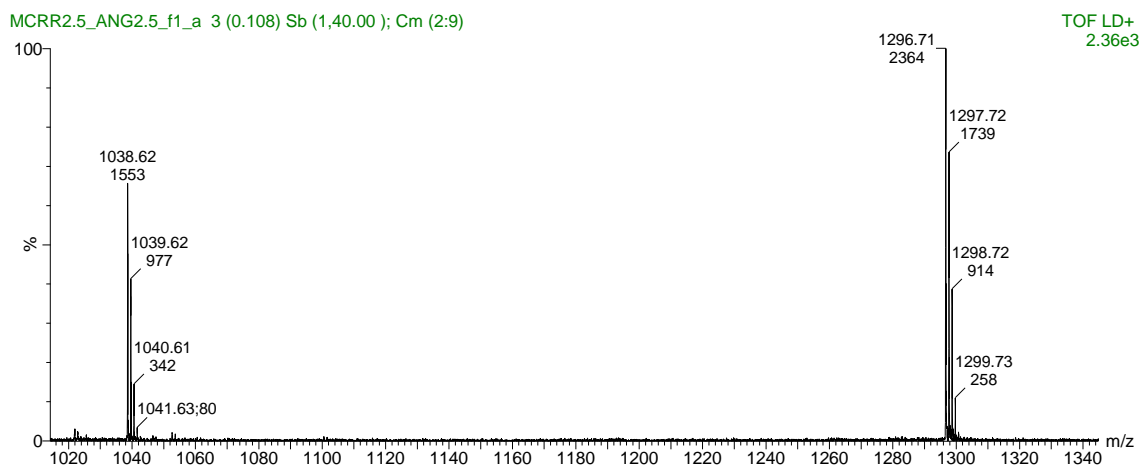

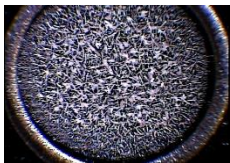
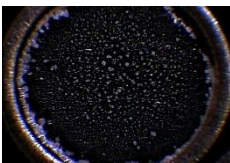
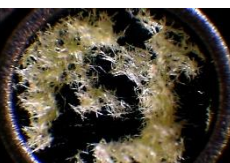

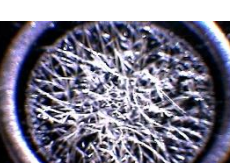




FIGURA 18 - Espectro MALDI-(+)-TOF/MS obtido pela análise de MC-RR (2.50 $\mu\text{mol/L}$) e da Angiotensina I (2.50 $\mu\text{mol/L}$).

A Tabela 4 apresenta as imagens de microscopia óptica das cristalizações obtidas para cada uma das matrizes utilizadas e os CV's obtidos para cada uma delas.

Tabela 4 - Imagens de microscopia óptica (aumento 40x) da cristalização para as diferentes matrizes utilizadas, e seus respectivos coeficientes de variação na análise de MC-RR (2,5 $\mu\text{mol/L}$) e Angiotensina I (2,5 $\mu\text{mol/L}$).

		Matriz	Coeficiente de variação (%)
1		Ácido ferúlico	10,50
2		Ácido sinapínico	4,90
3		Ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico	12,00
4		Ácido α -ciano-4-benziloxi-cinâmico	7,00
5		Ácido α -ciano-4-fenil-cinâmico	34,60
6		Ácido cafeico	19,30
7		Ácido cumárico	7,10
8		Ácido gentísico	10,00

Assim a homogeneidade matriz/amostra também é diferenciada, e diferentes valores de coeficientes de variação (CV's) são obtidos. Consequentemente, o uso de uma matriz distinta pode tornar um método mais preciso que o outro, podendo gerar maior homogeneidade dos dados, e menores valores de CV's.

Nas imagens dos *spots* apresentados na Tabela 4, fica clara a existência de irregularidades na cristalização das matrizes, o que provoca a formação dos conhecidos '*hot-spots*' (FIGURA 17), locais no *spot* onde há maior concentração de mistura analito/matriz resultando em grandes variações nas intensidades dos sinais obtidos do analito e do padrão interno. Isso pode ocorrer uma vez que o laser pode incidir onde há maior concentração de cristais de matriz/analito, o sinal obtido será de alta intensidade, diferentemente do que ocorre quando o laser incide em locais onde há baixa concentração ou nenhuma concentração de cristais, gerando sinais de baixa intensidade. Estes fatos aumentam consideravelmente os coeficientes de variação obtidos para cada matriz utilizada.

As cristalizações irregulares não são adequadas para métodos que tem como objetivo a quantificação, devido à baixa reprodutibilidade que apresentam. Exemplos disto são as matrizes: ácido ferúlico, ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico, ácido α -ciano-4-fenil-cinâmico, ácido cafeico e ácido gentísico, que obtiveram CV's entre 10,00-39,00%.

A matriz ideal para quantificação por análise MALDI-TOF-MS deve possuir uma cristalização uniforme e ter uma distribuição homogênea de matriz/amostra ao longo de todo *spot*. Assim serão gerados espectros reprodutivos, e baixos valores de CV's serão obtidos.

Ao observar os cristais de CHCA e SA pode-se constatar que os mesmos são pequenos e estão uniformemente distribuídos ao longo de todo o *spot*, portanto, essas matrizes são apropriadas para a quantificação de MC. As análises utilizando as matrizes CHCA e SA obtiveram valores de CV iguais a 4,80 e 4,90%; respectivamente. Apontando que o objetivo de obter uma co-cristalização de matriz/amostra homogênea, apresentando uma boa reprodutibilidade foi alcançado. Tais resultados comprovam que o uso de CHCA para a quantificação de MC's é eficiente e também demonstrou que o uso de SA é outra opção viável de matriz para quantificação de MC's.

Além disso, ao utilizar CHCA e SA como matrizes de MALDI-MS, aplicando o

'vacuum drying adapted' como protocolo de preparação da amostra, os CV obtidos foram menores do que os relatados na literatura onde o método '*thin layer*' foi utilizado com CHCA como matriz (PUDDICK et al., 2012).

Devido aos resultados satisfatórios de CV's obtidos pelo método que utiliza as matrizes CHCA e SA individualmente, curvas de calibração foram construídas para avaliação dos parâmetros de linearidade e do limite de detecção obtidos para cada uma destas matrizes. Os resultados alcançados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de CV (para o ponto de concentração de 2,5 $\mu\text{mol/L}$), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), obtidos utilizando o sistema binário ácido sinapínico: ácido α -ciano-4-hidróxi-cinâmico (50:50, v/v).

	CV (%)	MDL ($\mu\text{mol/L}$)	Curva de calibração	R ²
CHCA	4,80	0,011	$y = 0,281x + 0,083$	0,98
SA	4,90	0,070	$y = 0,073x + 0,015$	0,89

Ao analisar os valores apontados na Tabela 5, pode-se concluir que o valor de MDL foi menor do que o valor publicado na literatura, 0,031 $\mu\text{mol/L}$, quando o CHCA é utilizado como matriz. No entanto, o valor de R² é semelhante, 0,99, o que indica uma boa linearidade. Contudo, na literatura não há informações sobre qualquer avaliação do uso de SA como matriz que objetiva a quantificação de MC's, mas neste trabalho a curva de calibração para esta matriz foi construída e o valor de LD calculado foi promissor.

Uma estratégia que tem sido utilizada para aumentar a homogeneidade da cristalização é o uso da combinação de duas matrizes de MALDI-MS, que pode ser preparada de diferentes maneiras, empregando proporções de massa/massa ou volume/volume (LAŠTOVIČKOVÁ; CHMELIK; BOBALOVA, 2009; LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003). O uso desta combinação de matrizes aumenta a qualidade das análises realizadas por MALDI-MS com relação à reprodutibilidade dos espectros gerados, assim como a resolução dos sinais (JACKSON; ATTALLA, 2010). Então, com o objetivo de melhorar a homogeneidade da mistura matriz/amostra e otimizar nossos coeficientes de variação foram testadas diversas matrizes binárias, modificando as combinações de matrizes e a proporção volume/volume entre as mesmas.

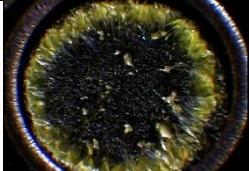
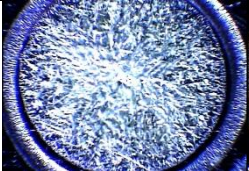

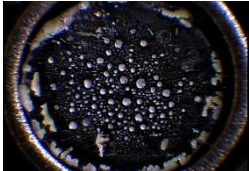
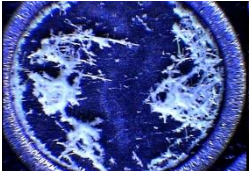
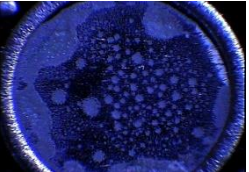

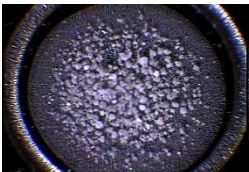

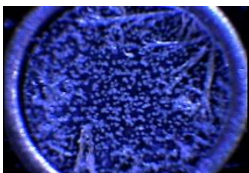
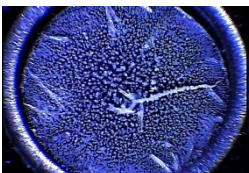
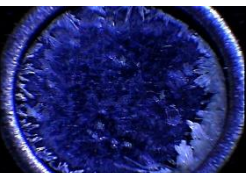
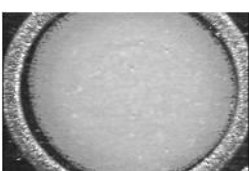


De acordo com a homogeneidade da mistura matriz/analito, e o coeficiente de

variação obtido pelas análises supracitadas na Tabela 4, as matrizes selecionadas para serem testadas em conjunto foram: ácido gentísico, ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico e ácido α -ciano-4-benziloxi-cinâmico, ácido sinapínico, ácido α -ciano-4-hidróxi-cinâmico.

Assim, todas as combinações de matrizes binárias ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico: ácido gentísico, ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico: ácido sinapínico, ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico: ácido α -ciano-4-benziloxi-cinâmico, ácido sinapínico: ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico, ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico: ácido α -ciano-4-cloro-cinâmico, foram preparadas em quadruplicata e analisadas para o cálculo de CV's.

A Tabela 6 apresenta as imagens das cristalizações obtidas para uma das matrizes utilizadas, assim como os valores de CV's obtidos para cada uma delas.

Tabela 6 - Imagens de microscopia ótica (aumento 40x) da cristalização para as diferentes matrizes binárias, e seus respectivos coeficientes de variação na análise de MC-RR (2,5 $\mu\text{mol/L}$) e Angiotensina I (2,5 $\mu\text{mol/L}$).

Matriz binária	50:50 (v/v)	75:25 (v/v)	25:75 (v/v)
1 ácido α -ciano-4- cloro-cinâmico: ácido sinapínico	 CV = 5,61%	 CV = 25,5%	 CV = 6,72%
2 ácido α -ciano-4- cloro-cinâmico: ácido α -ciano-4- benziloxi-cinâmico	 CV = 5,39%	 CV = 7,35%	 CV = 49,4%
3 ácido α -ciano-4- hidróxi-cinâmico: ácido α -ciano-4- cloro-cinâmico	 CV = 8,49%	 CV = 42,2%	 CV = 23,7%
4 ácido α -ciano-4- hidroxi-cinâmico: ácido gentísico	 CV = 11,1%	 CV = 10,8%	 CV = 30,6%
5 ácido sinapínico: ácido α -ciano-4- hidroxi-cinâmico	 CV = 4,66%	 CV = 17,2%	 CV = 13,8%

Para todas as combinações de matrizes binárias foram utilizados sistemas de proporções volume/volume de 25/75, 50/50 e 75/25. O sistema de proporção 50/50 (v/v) resultou nos melhores coeficientes de variação para todos os sistemas de matrizes binárias quando comparamos as análises utilizando apenas uma matriz, Tabela 4.

Além disto, ao observarmos a entrada 5 da Tabela 6, que apresenta as cristalizações obtidas utilizando a mistura de CHCA e SA como matrizes, tem-se que todos os *spots* possuem cristalização homogênea. No entanto, o que apresenta a

melhor homogeneidade matriz/analito ocorre quando utiliza-se o ácido sinapínico: ácido α -ciano-4-hidróxi-cinâmico (50/50, v/v), que gera um excelente valor de CV, 4,6%. Essa homogeneidade da matriz/analito em todo o *spot* evita formação de ‘*hot-spots*’, sendo que em qualquer local onde o laser incide a relação dos sinais entre a MC-RR e Angiotensina I é constante. Então, devido aos resultados obtidos, o método foi aplicado também para as MC-LR e MC-YR, e os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Para avaliar os resultados gerados neste trabalho, os mesmos foram comparados com os dados já relatados na literatura para a quantificação de MC's, que encontram-se na Tabela 8.

Tabela 7 - Resultados de CV (para o ponto de concentração de 2,5 $\mu\text{mol/L}$), limite de detecção (MDL), limite de quantificação (LDQ), obtidos utilizando o sistema binário ácido sinapínico: ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (50:50, v/v).

Peptídeos	CV (%)	LD ($\mu\text{mol/L}$)	LQ ($\mu\text{mol/L}$)	Curva de calibração	R ²
MC-LR	5,5	0,045	0,25-10,0	$y = 0,25x + 0,068$	0,99
MC-RR	4,6	0,010	0,13-10,0	$y = 0,34x + 0,16$	0,98
MC-YR	5,2	0,045	0,33-10,0	$y = 0,25x + 0,099$	0,98

Tabela 8 - Dados obtidos por Puddick, 2007 utilizando ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico como matriz.

	CV (%)	LD ($\mu\text{mol/L}$)	LQ ($\mu\text{mol/L}$)	Curva de calibração	R ²
MC-LR	9,5	0,087	0,28-10,0	$y = 0,129x + 0,015$	0,99
MC-RR	6,2	0,031	0,12-10,0	$y = 0,075x + 0,0034$	0,99
MC-YR	6,8	0,056	0,18-10,0	$y = 0,170x + 0,064$	0,98

Ao comparar os resultados apresentados nas TABELAS 7 e 8, pode-se concluir que os CVs obtidos quando o sistemas de matrizes binárias são utilizados para as análises de MC-LR (5,5%) e M-YR (5,2%) são próximos aos valores de CV's anteriormente publicados.

Entretanto, os valores de MDLs medidos foram melhores do que os resultados obtidos na literatura. Além disto, as curvas de calibração construídas para cada MC apresentaram boa linearidade no intervalo de concentração de 0,10 $\mu\text{mol/L}$ – 10,00 $\mu\text{mol/L}$, com valores de R² de 0,98 e 0,99.

Devido ao sucesso do método otimizado para a quantificação das MC-RR, MC-LR e MC-YR, que são peptídeos cíclicos com arginina nas suas estruturas, decidiu-se então, ampliar a aplicação deste método, aplicando o mesmo na quantificação de outros peptídeos, que também contêm arginina, contudo, que apresentam estruturas lineares e com diferentes m/z . Para tal finalidade foram escolhidos: a bradicinina (BRAD) (m/z 1061,21) e fibrilopeptídeo humano B (FIBRI) (m/z 1570,57), para avaliação dos parâmetros obtidos pelas curvas de calibração contruídas (Tabela 9).

Este método mostrou excelente reprodutibilidade para ambos os peptídeos, com valores de CV de 2,90% e 3,60%, para BRAD e FIBRI, respectivamente. Além disso, foram obtidos baixos valores de MDL, 0,039 $\mu\text{mol/L}$ para BRAD e 0,084 $\mu\text{mol/L}$ para FIBRI, apontando que este método é sensível para estes peptídeos.

A linearidade obtida também foi muito satisfatória para brad, com valor R^2 de 0,99, melhor que a obtida para FIBRI, com R^2 igual a 0,92 (Tabela 9). Estes resultados mostraram que o método desenvolvido por este grupo de pesquisa, pode ser utilizado tanto para quantificação de MCs quanto para outros peptídeos com diferentes estruturas.

Tabela 9 - Resultados de CV, limite de detecção (MDL), limite de quantificação (LDQ), obtidos utilizando o sistema binário ácido sinapínico: ácido α -ciano-4-hidróxi-cinâmico (50:50, v/v).

	CV (%)	MDL ($\mu\text{mol/L}$)	LDQ ($\mu\text{mol/L}$)	Curva de calibração	R^2
BRAD	2,9	0,039	0,31-10,0	$y = 0,29x + 0,027$	0,99
FIBRI	3,6	0,084	0,66-10,0	$y = 0,15x + 0,010$	0,92

5. Conclusões

O método para quantificação de microcistinas, desenvolvido neste capítulo, minimizou ao máximo os problemas de reprodutibilidade inerente à técnica MALDI-MS.

O uso da combinação das matrizes CHCA e SA (50/50, v/v), otimizou a cristalização e homogeneização matriz/amostra por todo o *spot*, tornando o método mais reprodutivo e mais sensível que os métodos já descritos na literatura.

Além disto, o método desenvolvido é um método rápido, de baixo custo, que utiliza muito pouco solvente, além de proporcionar a quantificação dos diversos congêneres de microcistinas que podem estar presentes em uma floração tóxica de cianobactérias.

Capítulo 2

Imageamento de Cianobactérias de água doce
por MALDI Imaging Mass Spectrometry:
Distribuição espacial de toxinas e outros
metabólitos.

CAPÍTULO 2: Imageamento de Cianobactérias de água doce por MALDI Imaging Mass Spectrometry: Distribuição de toxinas e outros metabólitos.

1. Introdução

Atualmente, a humanidade enfrenta desafios com relação ao meio ambiente, produção de alimentos e fontes de energia. O aumento da produção agrícola, assim como a produção massiva de alimentos para a população, entre outros produtos de consumo diário, leva-nos a preocupação sobre a capacidade da biosfera regenerar suas fontes primárias, assim como o equilíbrio ecológico dos ecossistemas. Para o auxílio destas questões, a biotecnologia conta com o grande potencial microbiológico para o fornecimento de aditivos alimentícios, tanto quanto na produção de alimentos e de energia. Neste contexto, as cianobactérias são de particular interesse para inúmeras aplicações biotecnológicas (JACKSON; ATTALLA, 2010).

Por um longo período, as cianobactérias foram utilizadas somente pela agricultura como bio-fertilizantes, devido sua capacidade de fixação de N₂ (JACKSON; ATTALLA, 2010). No entanto, com a evolução dos estudos científicos, as aplicações das cianobactérias passaram a ser inúmeras, podendo ser utilizadas em suplementos alimentares, fontes de protetores de raios ultra-violeta (UV), até como produtoras de biocombustíveis.

Por exemplo, a espécie *Spirulina fusiformis* (FIGURA 19) é amplamente utilizada como suplemento alimentar para animais e seres humanos. Além de ser considerada uma espécie não tóxica, a *Spirulina fusiformis* é um potente nutracêutico, sendo uma fonte de vitaminas, sais minerais e antioxidantes (NICOLETTI, 2016). Além disto, a *Spirulina* possui baixa caloria e gorduras, poucos carboidratos, e é uma fonte rica em proteínas e aminoácidos essenciais (BENT, 2008). O seu uso prolongado ajuda regular a gordura corpórea, a circulação sanguínea e a diminuir o colesterol ruim (LDL – lipoproteínas de baixa densidade) do organismo (JUÁREZ-OROPEZA et al., 2009). A *Spirulina* também mostrou-se ser eficaz no tratamento de diabetes, e doenças vasculares, sem provocar alterações fisiológicas, bioquímicas e patológicas. Outras propriedades desta espécie de cianobactérias é ter poder anti-inflamatório e anticâncer (VIDÉ et al., 2015).



FIGURA 19 - Filamento de Spirulina. Fonte: *Jerine, P. S, Kadar, B. S, Giridharan, R., Udhaya, L. B, Sabina, E. P. (2017).*

Outra aplicação das diferentes espécies de cianobactérias, é o seu uso como fonte de compostos de interesse para a produção de produtos de cuidado pessoal (PCP's). Atualmente, as indústrias de cosméticos depositam no mercado inúmeros PCP's, tais como hidratantes corporais, fotoprotetores, utilizados com grande frequência (DERIKVAND; LLEWELLYN; PURTON, 2017). Os resíduos destes produtos são carregados para o ecossistema aquático, causando danos ao meio ambiente, podendo atuar no sistema hormonal de organismos aquáticos e insetos (CHRISTEN; ZUCCHI; FENT, 2011). Devido à preocupação com a saúde do meio ambiente, os departamentos de Pesquisa e Desenvolvimento das empresas buscaram produtos naturais como alternativas para estes compostos sintéticos, pois os mesmos, além de ser uma alternativa segura, são produzidos de maneira sustentável, pois são uma fonte renovável destes compostos (MAHAJAN, U. & WASULE, 2008).

Estes produtos naturais foram buscados, primeiramente nas plantas. No entanto, sua produção possuem alguns obstáculos, tais como: crescimento demorado, cultivo sazonal, além da baixa concentração dos produtos produzidos, o que interfere diretamente nos custos da produção e do produto final (KOLE et al., 2005). Como alternativa interessante, as cianobactérias são produtoras de inúmeros compostos de interesse, com elevada taxa de reprodução e aumento de biomassa, quando comparado ao crescimento das plantas. Além disto, as cianobactérias necessitam apenas de nutrientes básicos para seu crescimento, podendo ser cultivadas em sistemas fechados. Sendo assim, seu cultivo não compete com o sistema agrícola convencional (QUINTANA et al., 2011).

Outra vantagem do uso das cianobactérias como fonte de produtos naturais, é que várias de suas espécies vivem em desertos hiper-áridos, produzindo assim metabolitos que lhes dão a capacidade de lidar com radiação UV elevada e

dessecação grave. Estas cianobactérias extremófilas têm, portanto, grande potencial como fonte de produtos cosméticos para serem utilizadas em protetores solares e hidratantes (QUESADA, 2014). Entre os compostos fotoprotetores estão as micosporinas (MMAs), e as scytoneminas (DERIKVAND; LLEWELLYN; PURTON, 2017).

As micosporinas (FIGURA 20) são um grupo de mais de 20 metabólitos solúveis em água, capazes de absorver luz UV, fornecendo alta proteção contra fótons no comprimento de onda UV-A. Cianobactérias da espécie terrestre *Nostoc comune* é um exemplo de produtores destes compostos (DERIKVAND; LLEWELLYN; PURTON, 2017).

Já as scytoneminas (FIGURA 20) possuem máximo de absorção em 380 nm, são encontradas nos polissacarídeos da bainha das cianobactérias, agindo como protetores de radiação UV de curto comprimento de onda. Este pigmento lipossolúvel é uma pequena molécula dimérica (544 Da), que é o único entre os produtos naturais que é composto de subunidades indólicas e fenólicas ligadas por um átomo de carbono olefínico. Esses compostos são produzidos, por exemplo, pela espécie *Chroococcidiopsis sp.* (DERIKVAND; LLEWELLYN; PURTON, 2017).

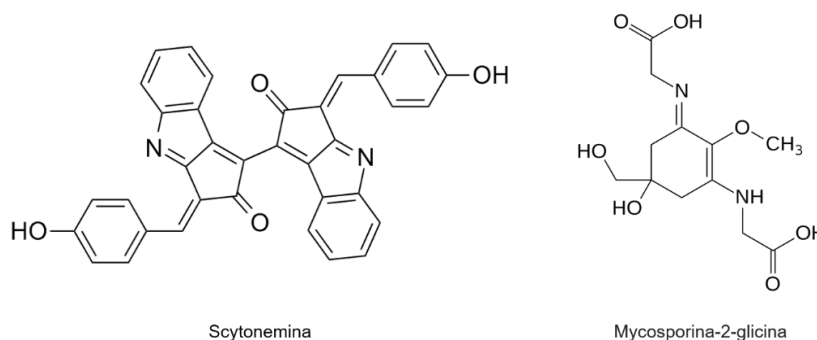


FIGURA 20 - Estruturas químicas da Scytonemina e Mycosporina-2-glicina.

Além das aplicações supracitadas, as cianobactérias têm sido utilizadas na produção de biocombustíveis por ser capazes de produzir hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia, entre outros combustíveis como: etanol, 2,3-butadienol, etileno etc. Pela primeira vez, o etanol foi produzido com sucesso pela cianobactéria *S. elongatus* PCC 7942, introduzindo os genes que codificam as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase II, codificados pela bactéria *Zymomonas mobilis*. Entretanto, a modificação genética da espécie *Synechocystis sp.*

PCC 6803, com a inserção dos mesmos genes, obtiveram melhores resultados na produção deste combustível (JOHNSON et al., 2016).

Dentre os inúmeros compostos produzidos pelas cianobactérias, encontram-se uma enorme variabilidade de oligopeptídeos, denominados de cianopeptídeos. Nos últimos vinte anos foram isolados e caracterizados aproximadamente 600 cianopeptídeos (QUESADA, 2014). Este admirável número de compostos despertou a curiosidade dos pesquisadores, o que gerou inúmeros estudos em diversos aspectos como, por exemplo, a bioatividade destas substâncias e suas possíveis aplicações farmacológicas, assim como os efeitos toxicológicos das cianotoxinas, e principalmente sobre importância ecológica da produção destes metabólitos (QUESADA, 2014).

1.1. Cianopeptídeos

Como já descrito no Capítulo 1, as cianobactérias são encontradas em uma vasta gama de ecossistemas do nosso Planeta Terra. A grande capacidade de adaptação de suas espécies é atribuída, em parte, pela enorme variabilidade de metabólitos secundários produzidos pelas mesmas (QUESADA, 2014). A FIGURA 21 apresenta as diferentes classes estruturais dos metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias.

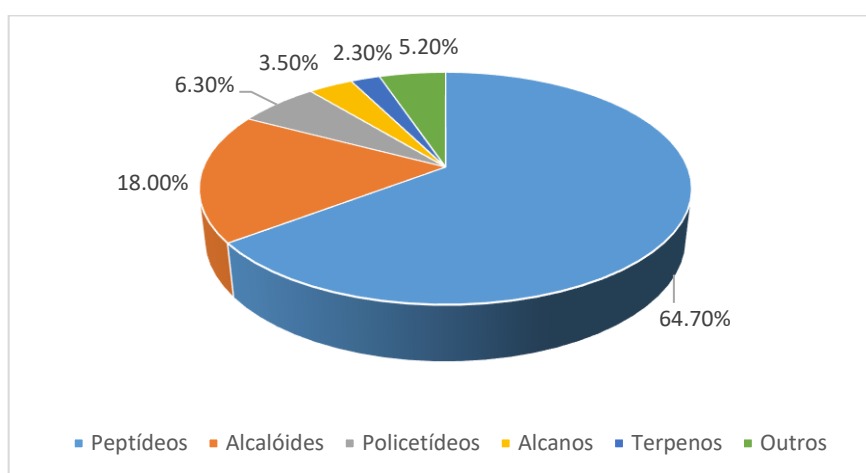
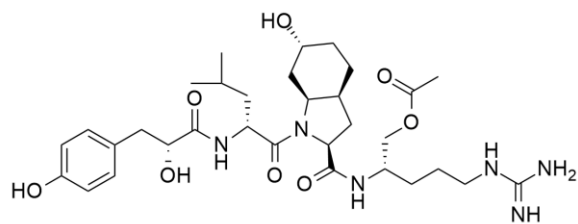
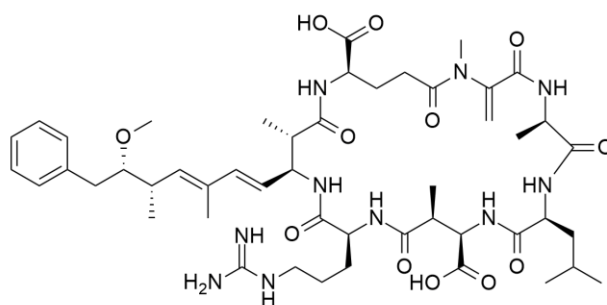


FIGURA 21 – Metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias classificados de acordo com a classe estrutural. Fonte: Chipala, G. E., Mo, S., Orjala, J., 2011 (adaptado).

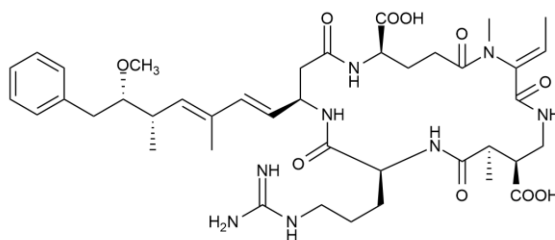
Nesta figura, pode-se observar que aproximadamente 65% dos metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias são peptídeos. Estes cianopeptídeos possuem uma enormidade de variantes estruturais. No entanto, a grande maioria mantém um padrão estrutural, que os caracterizam. Desta forma, são classificados entre: aeruginosinas, microcistinas (MC's), nodularinas, microviridinas, cianopeptolinas etc (FIGURA 22) (WELKER et al., 2006).



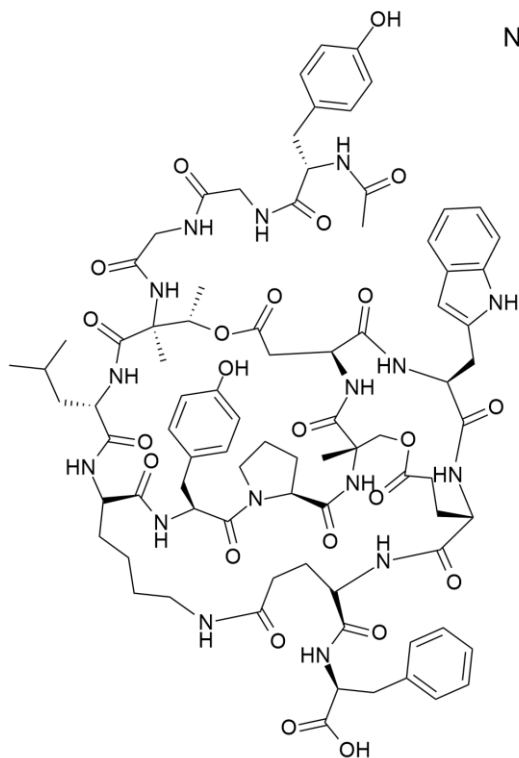
Aeruginosina 645



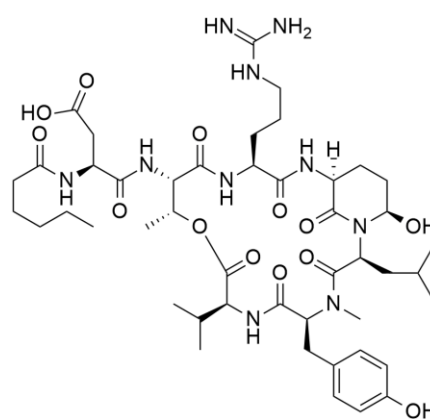
Microcistina-LR



Nodularina-R



Microviridina 1707



Cianopeptolina 973

FIGURA 22 - Exemplos de diferentes classes de cianopeptídeos.

Ao observar as classes de cianopeptídeos apresentados na FIGURA 22, pode-se verificar a presença de aminoácidos não proteinogênicos em suas estruturas, assim como alguns de seus resíduos. Isto se deve ao fato que a biossíntese dos cianopeptídeos ocorrerá predominantemente por vias não ribossomais, sendo que somente as microviridinas são sintetizadas pelas vias ribossomais (QUESADA, 2014).

Uma via ribossomal ocorre através dos ribossomos das células, que são capazes de traduzir milhares de proteínas e peptídeos, que possuem em sua estrutura aminoácidos proteinogênicos. No entanto, as vias não ribossomais ocorre através de complexos enzimáticos multifuncionais capazes de produzir apenas peptídeos com poucas unidades de aminoácidos (que podem ser proteinogênicos ou não (QUESADA, 2014)), assim como os apresentados na FIGURA 23.

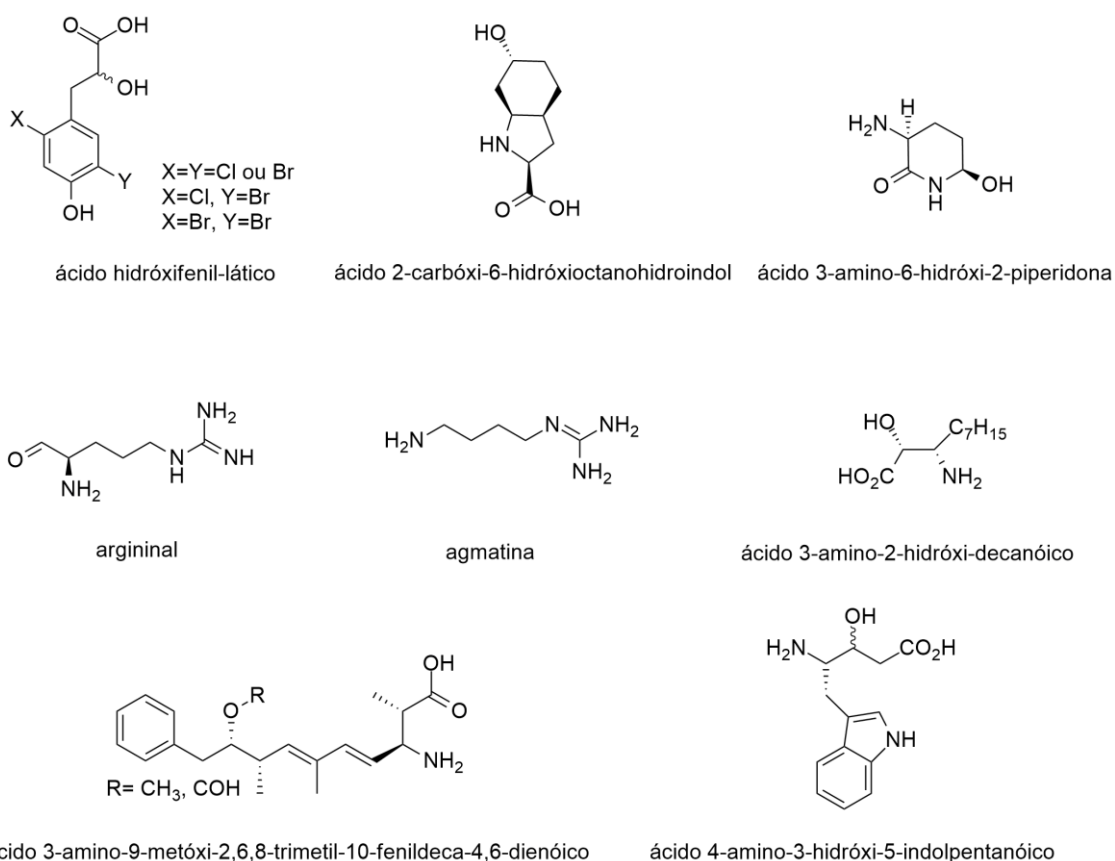


FIGURA 23 - Amino ácidos e derivados de aminoácidos não usuais presentes nas estruturas dos cianopeptídeos.

Os cianopeptídeos são sintetizados em sua maioria pelas Peptídeos Sintetases Não Ribossomais (NRPS - non-ribosomal peptide syntetases) (QUESADA, 2014), que consistem em um agrupamento de módulos, nos quais cada um deles são

responsáveis pela incorporação de apenas um aminoácido na cadeia de peptídeos final (RANTALA et al., 2004). A produção das NRPS são reguladas e organizadas através de uma arquitetura modular de genes, que é utilizada pelas cianobactérias para a produção novos metabólitos secundários com o mínimo de alterações genéticas possíveis. Um exemplo disto, é a biossíntese das nodularinas, na qual o clusters de genes que codificam a NRPS das nodularinas são os mesmos que codificam as NRPS das MC's com apenas dois módulos a menos (FIGURA 24) (RANTALA et al., 2004). Acredita-se que a produção dos oligopeptídeos pelas vias não ribossomais foram conservadas e exploradas pelas inúmeras linhagens de cianobactérias existentes (MOFFITT; NEILAN, 2004).

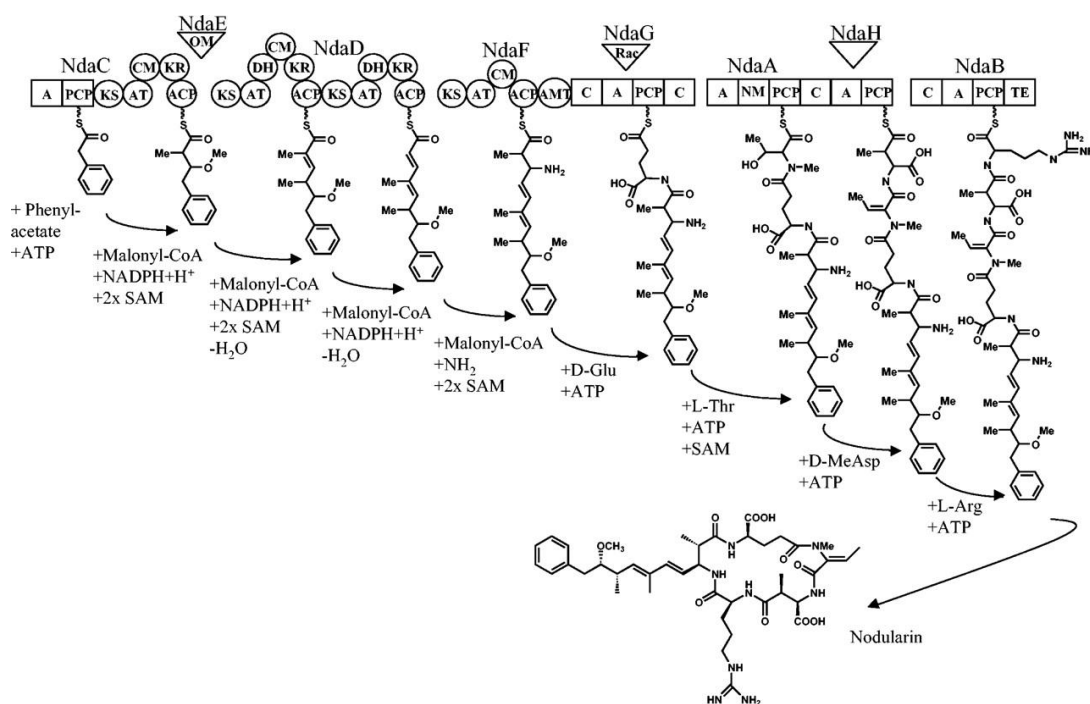


FIGURA 24 – Esquema da biossíntese da Nodularina-R. Fonte: Moffitt, M. C., Neilan, B. J. (2004) (RANTALA et al., 2004).

Um único *cluster* de genes pode ser responsável pela síntese de inúmeros compostos de uma mesma classe, sendo que um mesmo complexo enzimático pode sintetizar múltiplos oligopeptídeos. Além disto, as modificações pós-traducionais, como metilação, halogenação e sulfonação, resultam em centenas de congêneres da mesma classe de peptídeos, o que justifica a produção desta enorme variabilidade de cianopeptídeos (LIFSHITS; CARMELI, 2012). A seguir serão descritas as classes de cianopeptídeos estudadas neste trabalho.

1.1.1. Aeruginosinas

As aeruginosinas são tetrapeptídeos lineares caracterizadas pela presença do aminoácido 2-carboxi-6-hidroxi-octaidroindol (Choi), na posição 3 (FIGURA 25). Na posição 1, as estruturas das aeruginosinas possuem o ácido hidróxi-fenilático (Hpla), que pode conter Br ou Cl ligados ao anel benzênico, substituindo o grupo hidroxila (ISHIDA et al., 2009). Na segunda posição, o aminoácido é variável, podendo ser isoleucina (Ileu), pentleucina (*PentLeu*), metilhomotirosina (*mHty*) ou tirosina (Try) (FUKUTA et al., 2004). O terceiro aminoácido, Choi, pode ter seu grupo hidroxila modificado pela substituição de NH₂, Cl ou *Su*. Na quarta posição, as aeruginosinas possuem o aminoácido arginina ou derivados do mesmo, como agmatina, Aep, Argininol ou AcArginina.

As variantes de aeruginosinas têm sido isoladas das espécies *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria sp.*, *Microcystis viridis* e *Nodularia spumigena* entre outras. Atualmente, foram caracterizados mais de trinta e nove congêneres de aeruginosinas destas espécies (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

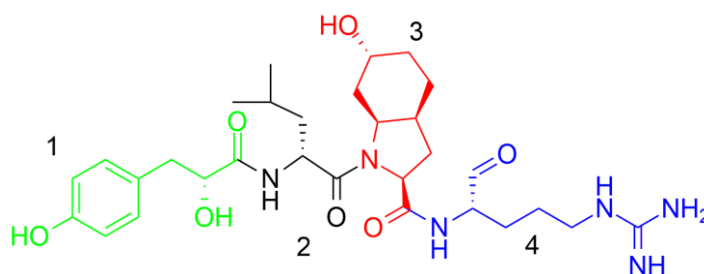


FIGURA 25 – Estrutura química da Aeruginosina 298A.

1.1.2. Cianopeptolinas

As cianopeptolinas são hexa-depsipeptídeos cíclicos, ou seja, são peptídeos ciclizados através de uma ligação éster (FIGURA 26) (FASTNER; ERHARD; VON DÖHREN, 2001). No caso das cianopeptolinas, a ciclização do anel ocorre com a formação da ligação éster entre os aminoácidos da posição 1 (Ser) e da posição 6. Na estrutura das cianopeptolinas existe a estrutura do aminoácido não proteínogênicos: 3-amino-6-hidróxi-2-piperidona (QUESADA, 2014) (posição 3 –

FIGURA 26). Na posição 1, as modificações são variáveis com a presença de outros aminoácidos. Além disto, na posição 3 pode ocorrer a adição de diferentes cadeias alifáticas (S1 e S2 – FIGURA 26).

As cianopeptolinas produzidas pelas espécies *Microcystis sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Nostoc sp.* e *Symploca sp.*, *Planktrotrix agardii*, entre outras. Atualmente foram isoladas mais de 120 variantes desta classe de cianopeptídeos (FASTNER; ERHARD; VON DÖHREN, 2001).

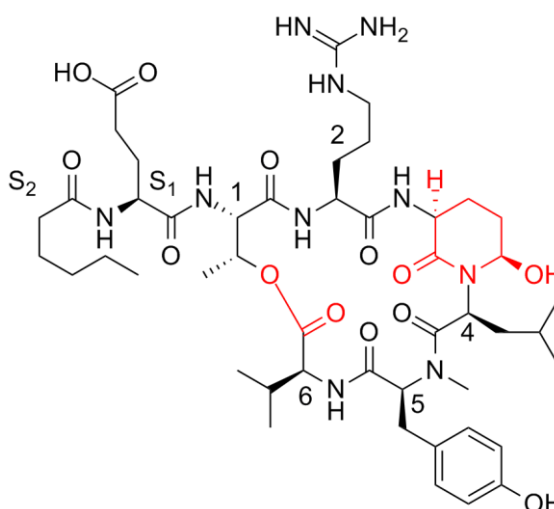


FIGURA 26 - Estrutura química da Cianopeptolina 1083.

1.1.3. Microviridinas

As microviridinas são peptídeos cíclicos, que possuem de treze a quatorze aminoácidos proteínogênicos em sua estrutura (FIGURA 27). A biossíntese da estrutura primária desta classe de peptídeos ocorre pelas vias ribossomais (WELKER; VON DÖHREN, 2006). No entanto, esta sequência pode passar por algumas modificações pós-traducionais, de modo que as microviridinas podem ser ciclizadas em até três pontos de sua estrutura. A formação de ligações ésteres podem ocorrer entre os aminoácidos treonina (posição 4) e ácido aspártico (posição 10), ou entre a serina (posição 9) e ácido glutâmico (posição 12). Outro ponto de ciclização possível é a formação de uma ligação amida, que ocorre entre a lisina (posição 6), e o ácido glutâmico ou ácido aspártico (posição 13). As microviridinas podem ser encontradas com diferentes pontos de ciclização, sendo tricíclicas ou bicíclicas.

Outras modificações pós traducionais caracterizadas até o momento, são as esterificações nos aminoácidos com cadeia lateral ácida, que são modificadas a ésteres de metila. Ou então, também ocorre a acetilação na cadeia lateral do aminoácido N-terminal (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

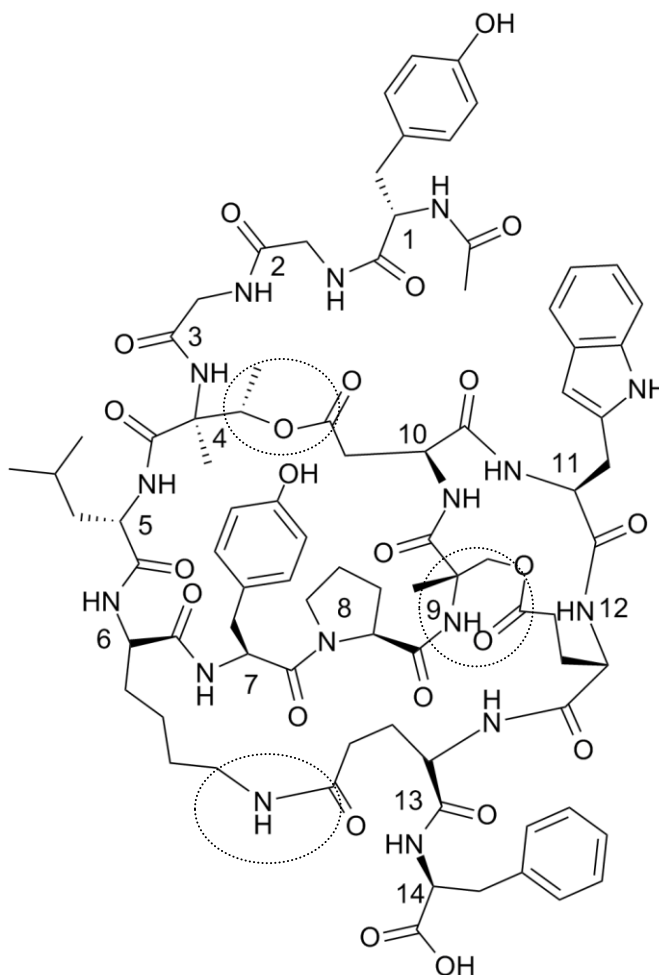


FIGURA 27 - Estrutura de uma microviridina. As ligações em destaque podem ocorrer após a tradução da sequência primária de aminoácidos.

1.1.4. Nodularinas e Microcistinas

As Nodularinas e Microcistinas, com suas estruturas já detalhadas no Capítulo 1, também são consideradas classes de cianopeptídeos. Ambas são cianopeptídeos cíclicos, no entanto, a classe das nodularinas possuem cinco aminoácidos, e as microcistinas são heptapeptídeos cíclicos.

1.1.5. Cianopeptídeos como fontes de novos fármacos

Inúmeros estudos apontam as classes de cianopeptídeos como fonte de novos fármacos. A maioria das classes de aeruginosinas, cianopeptolinas e microviridinas caracterizadas são inibidoras de proteases do tipo trombina, plasmina e serina. Desta maneira, estas substâncias podem agir como novos e potentes medicamentos utilizados nos tratamentos de trombose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, gerando assim maior valor agregado aos cianopeptídeos produzidos pelas cianobactérias (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Além das classes de cianopeptídeos acima descritas, as classes das microcistinas e nodularinas, foram detalhadas no Capítulo 1 desta tese.

Desta forma, com base na quantidade de variáveis estruturais destes cianopeptídeos, assim como a importância da bioatividade de cada um deles, somado ao fato que uma única espécie de cianobactéria pode produzir diferentes classes de cianopeptídeos, e diferentes cianopeptídeos de uma mesma classe, torna-se necessário o uso de uma técnica de análise capaz de caracterizar e identificar estes peptídeos de uma maneira rápida, fácil e eficiente. Assim, a técnica MALDI-MS tem sido amplamente utilizada em análises de *fingerprint* de metabólitos de microorganismos, pois além de possuir os requisitos acima citados, é uma técnica capaz de determinar constituintes intracelulares diretamente das células, sem a necessidade da prévia extração dos mesmos (WEHR et al., 2015).

Outra ferramenta complementar à MALDI-MS, é a técnica MALDI-IMS (Imaging Mass Spectrometry), que incorpora o poder de visualização da distribuição espacial dos diferentes íons sobre as culturas analisadas (SANDONATO et al., 2017).

1.2. MALDI-IMS

Como citado anteriormente, MALDI-MS é considerada uma técnica bastante versátil, podendo ser aplicada em diversas análises de amostras biológicas como, por exemplo, peptídeos, proteínas, lipídeos, dentre outros (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997). Esta técnica é capaz de analisar centenas de analitos de uma só vez, sem a necessidade do conhecimento prévio da existência dos mesmos (SHIH et al., 2014).

As análises de imageamento circundam toda a amostra a ser analisada, de modo que os compostos são rastreados em mais de 1000 pontos de coleta de dados, o que torna a técnica MALDI-IMS capaz detectar padrões de distribuição iônica e

fenótipos ocultos, que não podem ser detectados em análises morfológicas a olho nu (SHIH et al., 2014).

As etapas experimentais importantes para a visualização de compostos químicos ou biomoléculas diretamente de culturas de micro-organismos são: a cultivo das células em meio sólido e a fixação da amostra na placa que seguirá para dentro do equipamento, assim como a escolha e aplicação da matriz e a secagem da mesma. Todos estes procedimentos devem ser controlados cuidadosamente para a obtenção de dados científicos significativos (YOSHIMURA et al., 2016).

Em um experimento que utiliza IMS, a área total da amostra é subdividida em pixels (FIGURA 28b), que são individualmente escaneados por um espectrômetro de massas. Um único espectro de massas ou a média de vários espectros de massas são obtidos para cada pixel e combinados em conjunto com as suas respectivas coordenadas espaciais (FIGURA 28c). Após a varredura de toda a região de interesse, pode-se criar um espectro de massas médio de toda a amostra (FIGURA 28d). Então, a distribuição dos íons específicos pode ser organizada visualmente como uma imagem adicionando um gradiente de cores que representa a intensidade normalizada de íons particulares. A FIGURA 28 apresenta as etapas realizadas para a realização da imagem de uma cultura de micro-organismos.

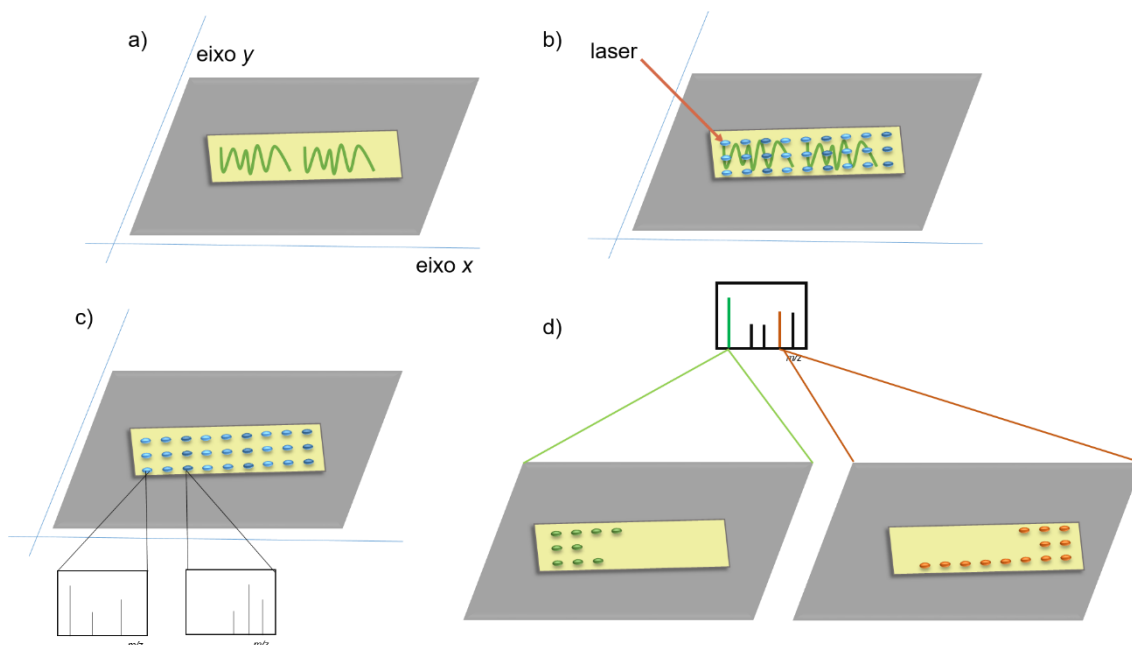


FIGURA 28 – Etapas realizadas para realização do imageamento por IMS. a) Amostra inserida na placa de MALDI-MS, b) análise por MALDI-TOF-MS (varredura de toda área por pixels), c) cada pixel possui um espectro de massas, d) associação dos sinais selecionados, com suas respectivas coordenadas no espaço, formando a imagem.

A capacidade de realizar o imageamento de uma amostra de modo a obter detalhes sobre a disposição espacial ordenada e detalhada dos compostos em diferentes tipos de amostras, pode ser de enorme valia em investigações biológicas. Um mapa de superfície de íons selecionados de tais amostras, podem fornecer detalhes de compartimentação de compostos, processos metabólicos específicos de locais específicos de cada tecido ou célula, e domínios de ligações seletivas para uma grande variedade de compostos naturais ou sintéticos (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997). Assim, em 1997 Caprioli *et al*, introduziram a técnica MALDI-IMS para a criação de imagens 2D, apresentando a distribuição de peptídeos e proteínas em superfícies intactas de tecidos biológicos. Desde então, esta técnica foi amplamente difundida, fornecendo a distribuição de biomoléculas em diferentes tecidos biológicos, com inúmeros objetivos (SANDONATO et al., 2017). Além disto, MALDI-IMS tem sido aplicada em análises de culturas de micro-organismos, sendo aplicada para este fim, pela primeira vez em 2008 para identificação e distribuição de produtos naturais (SHIH et al., 2014), assim como a análise de interações microbiológicas, e o perfil metabólico dos micro-organismos. Inúmeros artigos reportam a análise de peptídeos específicos em células intactas, através da análise de MALDI-MS (FASTNER; ERHARD; VON

DÖHREN, 2001). Desta maneira, neste capítulo foram realizadas imagens de diferentes espécies de cianobactérias por MALDI-IMS.

2. Objetivos

Este capítulo, teve como objetivo o imageamento das culturas de *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Nodularia hayerviana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122 cultivadas em meio sólido. O imageamento destas espécies, diretamente no meio em que foram cultivadas, foi realizado para melhor compreender a produção de cianotoxinas, e verificar a dispersão espacial dos cianopeptídeos produzidos por estas espécies. Verificando se estes metabólitos são mantidos dentro das células, ou se estes podem ser liberados através da membrana celular e difundidos pelo meio no qual as espécies estão cultivadas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Esterilização dos materiais

Os materiais utilizados para manipulação e crescimento dos micro-organismos foram esterilizados em autoclave vertical da marca Phoenix modelo AV-75, a 120°C e 1,0 Kgf/cm², por 15 min. Materiais não autoclavados foram esterilizados em uma capela de fluxo laminar, PACHANE modelo PA050 série 329/10, sob luz visível (400 nm).

3.2. Cultivo das espécies de cianobactérias

As espécies de cianobactérias utilizadas neste trabalho foram obtidas em colaboração com o Instituto Pasteur – França. Estas espécies foram cultivadas em 75,0 mL de meio líquido mineral (Tabela 10 e 11), de acordo com as instruções proporcionadas pelo Instituto Pasteur. As culturas são incubadas em uma câmara de germinação (Tecnal, TE-401) a 25°C com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 5 μmol de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por um foto período de 12h.

Tabela 10- Espécies de cianobactérias e seus respectivos meios de cultivo.

Cianobactéria	Meio de cultivo
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820	BG-11 ₀ + NaNO ₃ (2 mmol/L) + NaHCO ₃ (10 mmol/L)
<i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804	BG-11 ₀
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	BG-11 ₀

Tabela 11- Meios de cultivo BG-11₀+ NaNO₃ (2mM) + NaHCO₃ (10mM).

BG-11₀+ NaNO₃ (2mM) + NaHCO₃ (10mM)	
Água destilada	1000 mL
Na ₂ CO ₃	0,0400 g
NaNO ₃	1,7000 g
NaHCO ₃	0,8400 g
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0,0400 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,0750 g
Citric acid	0,0060 g
EDTA K ₂ Mg. 2H ₂ O	0,0010 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,0360 g
Citrato de ferro e amônio	0,0060 g
Solução metais traço	1,00 mL
pH	7,0

Tabela 12- Meios de cultivo BG-11₀ e solução de metais traços.

BG-11₀	
Água destilada	1000 mL
NaNO ₃	1,7000 g
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0,0400 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,0750 g
Citric acid	0,0060 g
EDTA K ₂ Mg. 2H ₂ O	0,0010 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,0360 g
Citrato de ferro e amônio	0,0060 g
Solução metal traço	1,00 mL
pH	7,0
Solução de metais traço A5+Co	
Água destilada	1000 mL
H ₃ BO ₃	2,8600 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,8100 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2220 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,3900 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0790 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0494 g

3.3. Preparo de amostra para as análises de cianobactérias cultivadas no laboratório e amostras ambientais por MALDI-TOF-MS.

Primeiramente, para a confirmação da produção dos cianopeptídeos produzidos para cada uma das espécies utilizadas neste trabalho, as cianobactérias cultivadas em meio líquido foram analisadas por MALDI-MS. Para isto, foi utilizado o método *Vaccum Drying Modificado*, já detalhado no Capítulo 1. Neste método, primeiramente a matriz é preparada com uma solução supersaturada de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0.10% de TFA aquoso. Aplica-se 1.00 μ L de amostra sobre um spot da placa de MALDI, em seguida é realizada a secagem da amostra em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal, modelo TE-058. Após a secagem da amostra, 1.00 μ L de solução supersaturada da matriz é adicionada por cima da amostra seca e a placa é novamente levada para o vácuo, onde é esperada a cristalização dessa mistura (FIGURA 29).

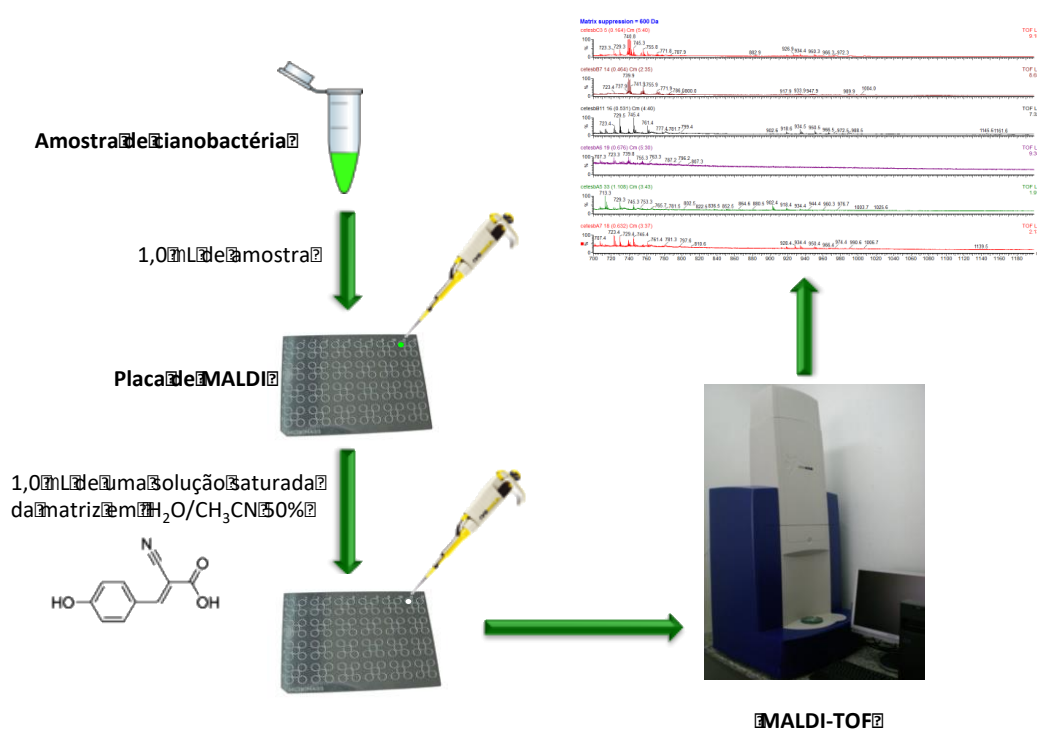


FIGURA 29 - Método de análise de cianobactérias por MALDI-TOF-MS.

3.4. Imageamento das culturas de cianobactérias *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122.

As análises para o imageamento das culturas de cianobactérias foram realizadas em colaboração com o Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas da Universidade de Campinas (UNICAMP).

As imagens foram obtidas utilizando o equipamento Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) com laser de N₂ (337 nm), no modo positivo. As imagens foram geradas pelo programa FlexImaging 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). O diâmetro do laser foi de ~ 50 µm e rastreou ao longo do eixo x e y, selecionando regiões de 150 µm de resolução. Cada espectro foi adquirido a partir de 500 laser *shots* em um único *spot*. A faixa de massa monitorada entre *m/z* 600 a 2500, e a potência do laser ajustada de 30 a 50% antes do experimento de imageamento para que os resultados fossem otimizados. MALDI Imaging foi operado utilizando as condições a seguir: ion source1 = 19.00 kV, ion source 2 = 16.72 kV, lens voltage = 8.30 kV, reflector voltage = 21.00 kV, reflector voltage 2 = 9.70 kV, pulsed ion extraction time = 10 ns, e suppression = 500 Da. As imagens foram criadas e normalizadas utilizando o software FlexImaging.

As cianobactérias foram cultivadas sobre a lâmina de vidro (própria para MALDI-IMS) que foi utilizada para realização das análises. Então, a mesma foi colocada dentro de uma placa de petri, e imersa sobre aproximadamente 10.00 mL de meio de cultura (Agar), este volume foi suficiente para formar um filme fino sobre lâmina. Em seguida, as colônias de cianobactérias foram inoculadas e cultivadas sobre a lâmina. Então, esta foi retirada da placa de petri, e sobre ela a matriz (ácido ciano-4-hidroxicinâmico) foi pulverizada através de um *spray* e a amostra foi seca sob vácuo. Em seguida, a mesma foi posicionada no equipamento para que as análises fossem realizadas (FIGURA 30) (SANDONATO et al., 2017).

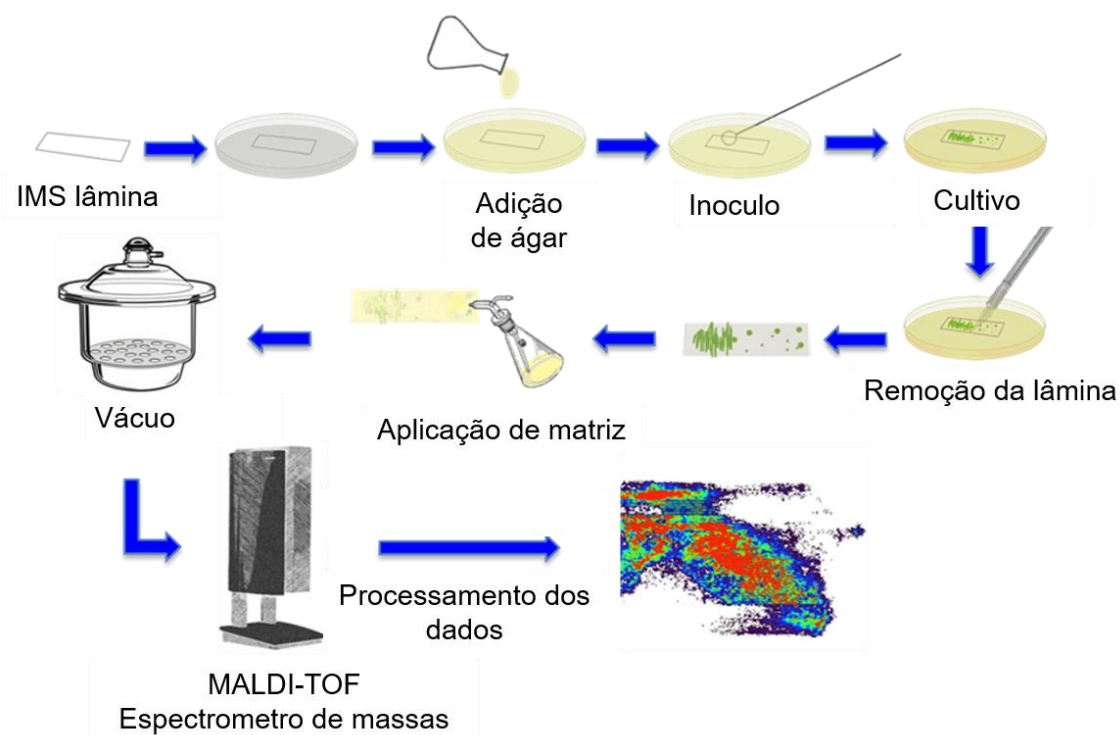


FIGURA 30 - Passo a passo para o imageamento das culturas de cianobactérias. Fonte: Sandonato, B. B. *et al*, 2017 (adaptado) (SANDONATO *et al.*, 2017).

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação dos cianopeptídeos produzidos pelas espécies *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Nostoc* sp. PCC 9237, *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122 por MALDI-TOF-MS

O nosso grupo de pesquisa adquiriu três espécies de cianobactérias em colaboração com Instituto Pasteur. Essas espécies são de ordens distintas, com morfologias diferentes, e caracterizadas por produzirem diferentes cianopeptídeos.

Na FIGURA 31 estão apresentadas as espécies investigadas neste trabalho. Podemos observar que a espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, pertencente a Ordem *Chroococcales*, é unicelular sendo a única encontrada na forma de cocos. As outras espécies: *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122, pertencentes a ordem *Nostocales*, sendo filamentosas.

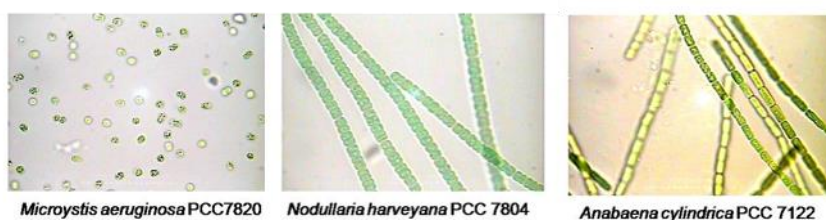


FIGURA 31 - Imagem por microscopia óptica (aumento 100X) das espécies: *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122

Estas espécies foram escolhidas com base nos peptídeos produzidos pelas mesmas. As espécies *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 foi escolhida para o estudo, pois produzem diferentes variantes de microcistinas. Além disto, esta espécie é capaz de produzir diferentes aeruginosinas e é a espécie de cianobactérias mais comum nas florações (SANDONATO et al., 2017).

A espécie *Nodularia harveyana* PCC 7804 foi selecionada por ser a única espécie do gênero *Nodularia* do tipo bentônica (LYRA et al., 2005), capaz de produzir nodularinas. A espécie *Anabaena cylindrica* PCC 7122, foi escolhida por produzir a anaquelina, um sideróforo, responsável por tornar os íons Fe^{3+} , presentes no meio em que vivem, disponível para as células. Desta maneira, as análises realizadas por

MALDI-TOF-MS tiveram como finalidade de confirmar a presença destes cianopeptídeos produzidos por estas espécies.

Os espectros obtidos estão apresentados nas FIGURAS 33, 34 e 35. Os cianopeptídeos identificados e seus respectivos sinais de m/z obtidos estão apresentados na TABELA 13, e suas estruturas estão apresentadas na FIGURA 32.

Tabela 13 - Espécies de cianobactérias e os respectivos m/z relativos aos cianopeptídeos identificados.

Espécie	m/z	Cianopeptídeo
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820	995,45	MC-LR
	981,45	[D-Asp ³]MC-LR
	603,12	Aeruginosina 602
<i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804	839,45	Nod-Har
	825,42	Nod-R
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	761,24	Anaquelina

Com base nos peptídeos produzidos pelas espécies *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122, estas espécies foram selecionadas para o experimento MALDI-IMS, com o objetivo de observar a distribuição espacial dos peptídeos produzidos por cada uma delas.

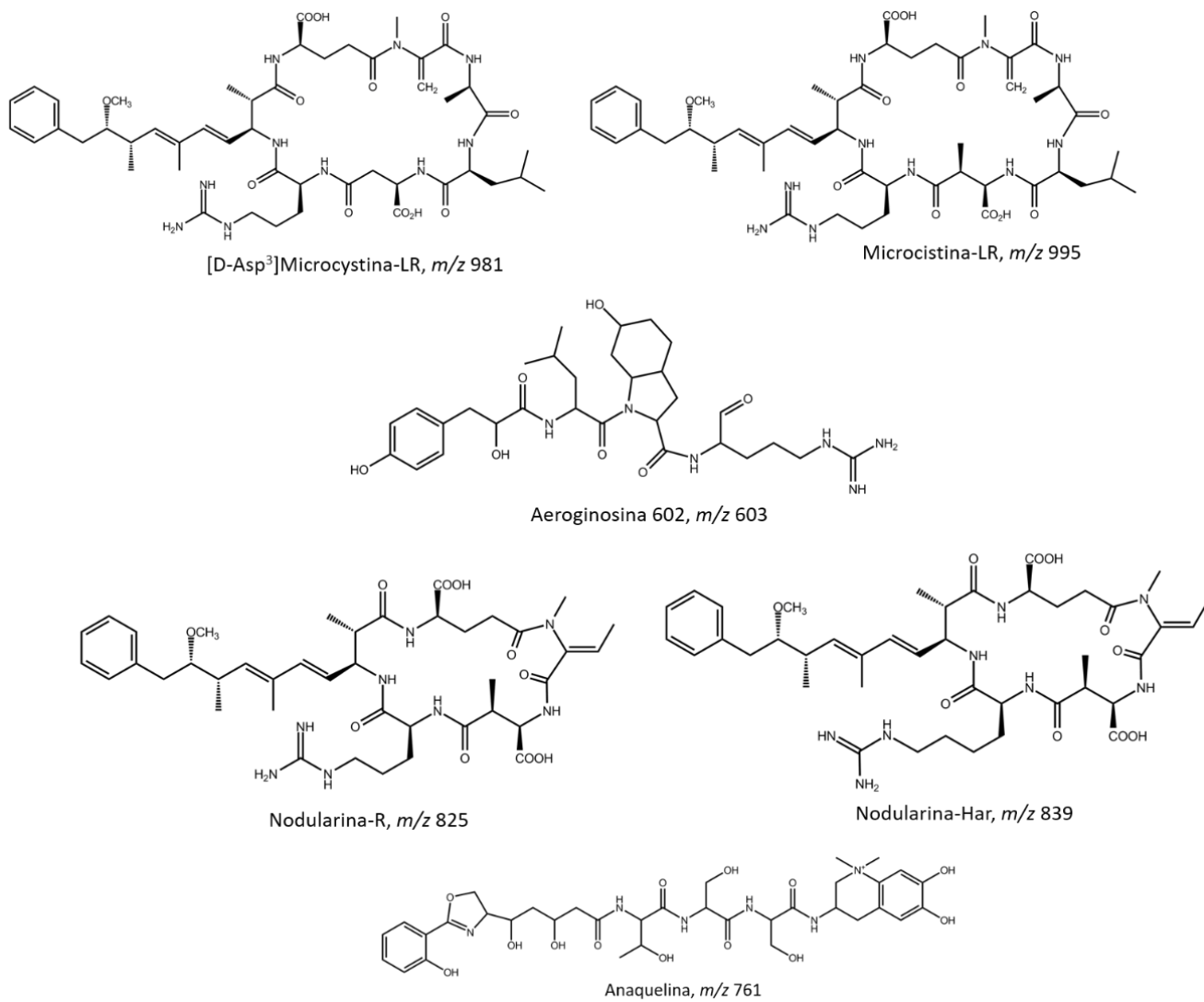


FIGURA 32 – Estrutura dos cianopeptídeos identificados pelas análises de MALDI-TOF-MS.

500-2000

PCC7820_a4 4 (0.136) Sb (1,40.00); Cm (3:4)

TOF LD+
1.13e3

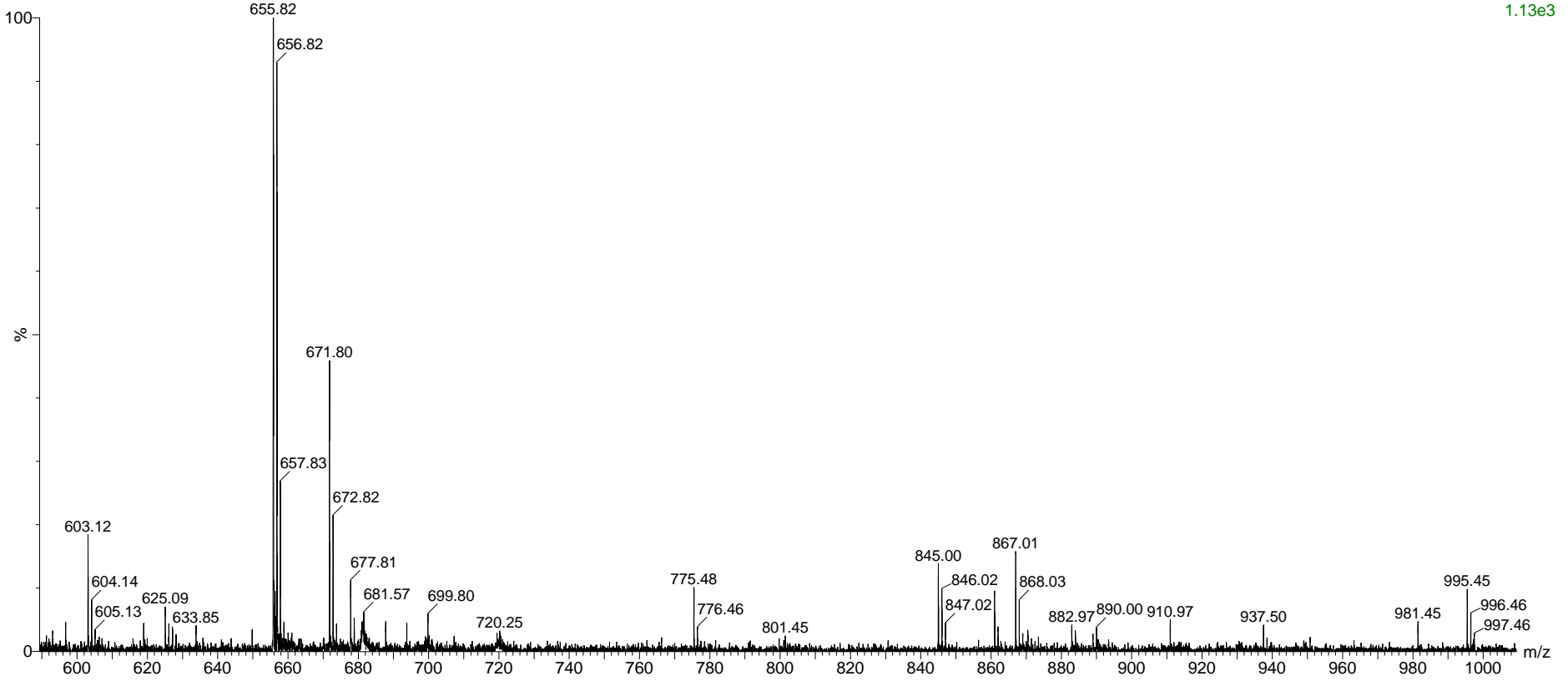


FIGURA 33 – Espectro de MALDI(+)-TOF-MS obtido pela análise da espécie *Microcystis aeruginosa* PCC7820.

PCC7804 nova B_b7 3 (0.103) Sb (1,40.00); Cm (1:5)

TOF LD+
2.85e3

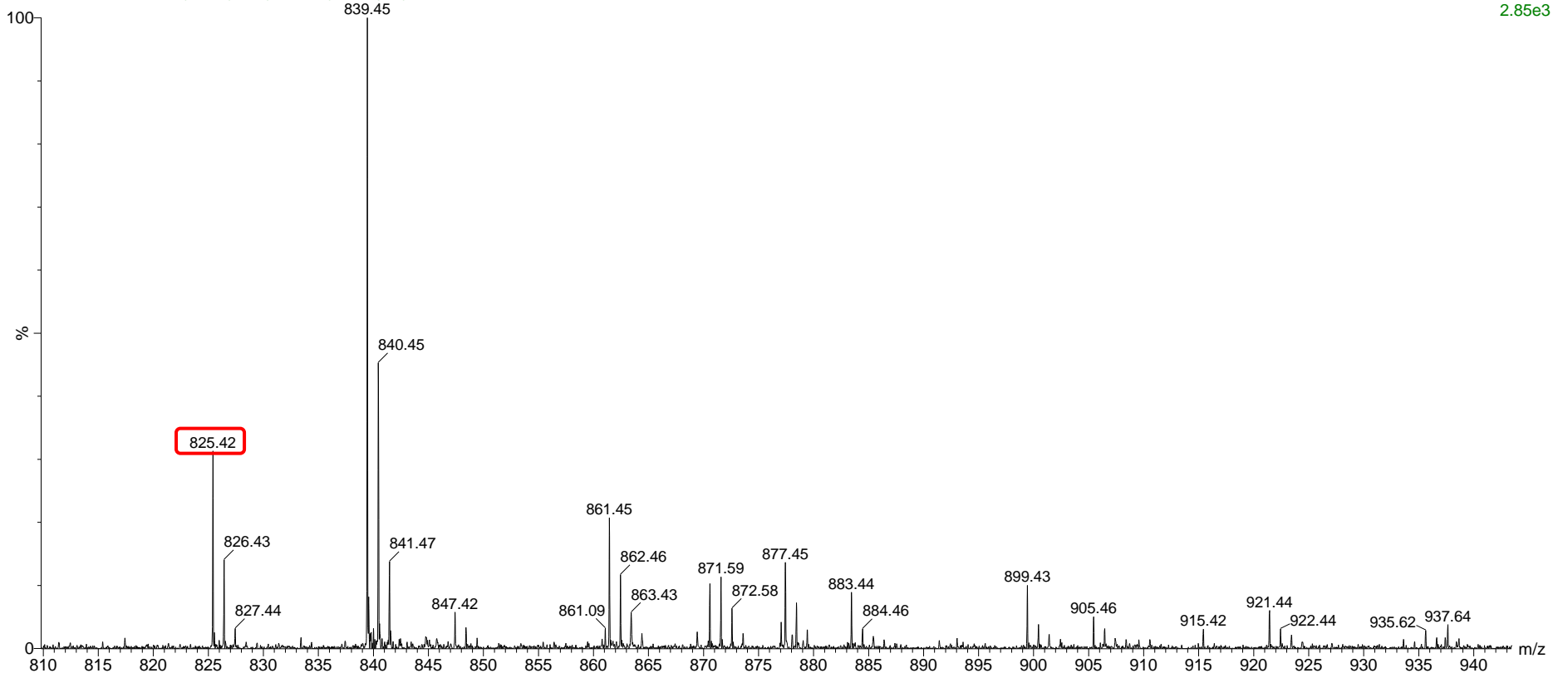


FIGURA 34 - Espectro de MALDI-(+)-TOF-MS obtido pela análise da espécie *Nodularia harveyana* PCC7804.

PCC7122 16.10_d1 5 (0.170) Sb (1,40.00); Cm (1:9)

TOF LD+
4.73e3

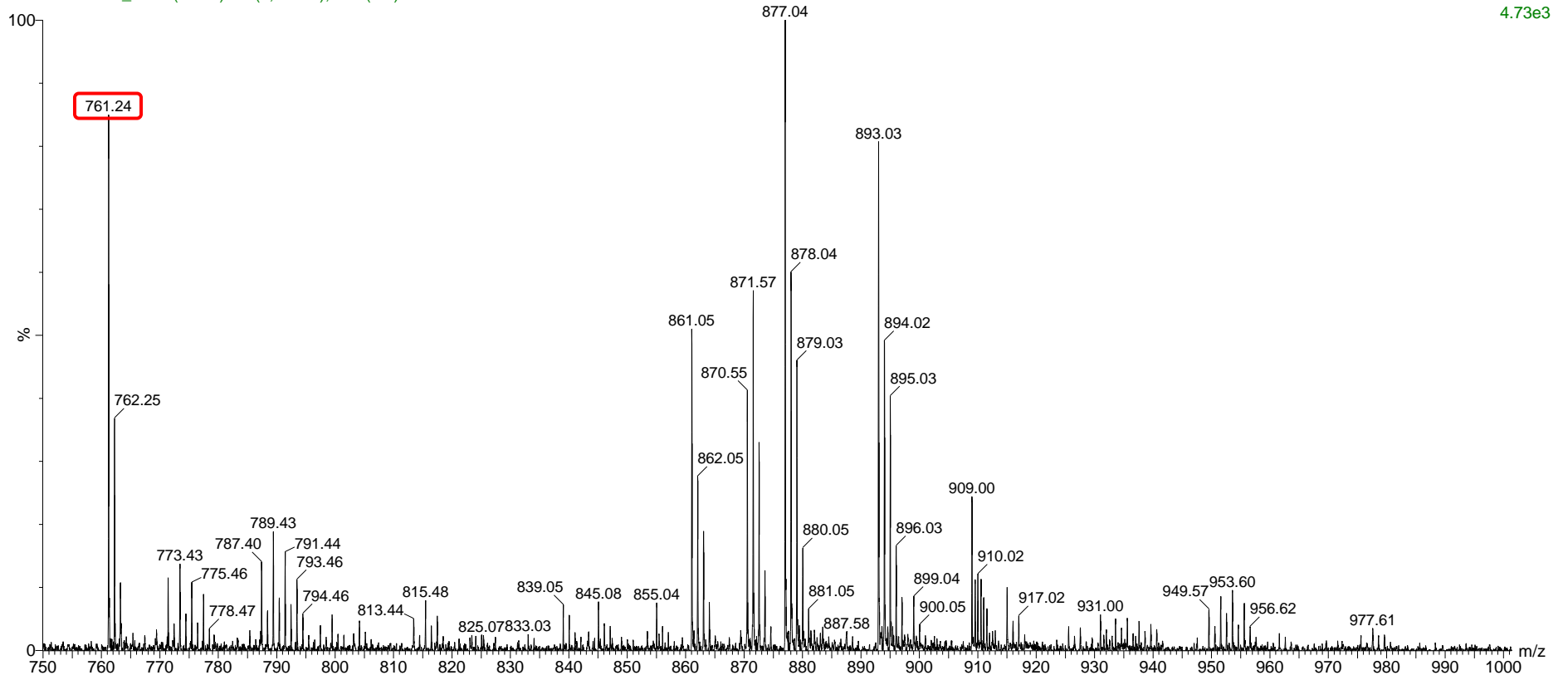


FIGURA 35 - Espectro de MALDI-(+)-TOF-MS obtido pela análise da espécie *Anabaena cylindrica* PCC7122.

4.2. Imageamento das espécies *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Nostoc sp.* PCC 9237, *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122 por MALDI-TOF-IMS

Neste trabalho foram realizadas diferentes imagens destas culturas. Primeiramente, foi realizado o imageamento das espécies cultivadas isoladamente, com objetivo de verificar a produção e distribuição dos metabólitos individuais e característicos das mesmas. Posteriormente as imagens do cultivo destas espécies em conjunto foram realizadas para observar a dinâmica da produção dos cianopeptídeos de interesse e a possível interação química que ocorre entre as colônias.

Como citado anteriormente, a espécie *Microcystis aeruginosa* foi selecionada pela sua importância ecológica, estando presente em grande parte das florações de cianobactérias que ocorrem por todo o mundo. Na FIGURA 36a, temos a imagem da lâmina de cultivo contendo a espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820. Nas FIGURAS 36b e 36c, estão apresentadas a distribuição dos íons de m/z 995.6, referente a hepatotoxina MC-LR, e do íon de m/z 603.3, referente ao peptídeo linear aeruginosina 602. Levando em consideração que a intensidade dos sinais de m/z é representada pela escala de cores, que vai das tonalidades de azul (sinal menos intenso) e de vermelho (sinal mais intenso). Podemos observar que os íons de m/z 995.6, estão localizados em sua grande maioria, sobre a cultura, possuindo maior intensidade também sobre as mesmas, condizente com os relatos da literatura, que afirmam que as microcistinas são produzidas, e mantidas dentro das células das cianobactérias, sendo liberadas somente quando há a senescência das mesmas.

Os íons de m/z 603.3, relativos a aeruginosina 602 encontram-se sobre as culturas e em torno das mesmas, possuindo menor intensidade aos redores da cultura, e maior intensidade sobre as mesmas, indicando que a aeruginosina é capaz de atravessar as paredes das células, saindo para o meio na qual elas vivem.

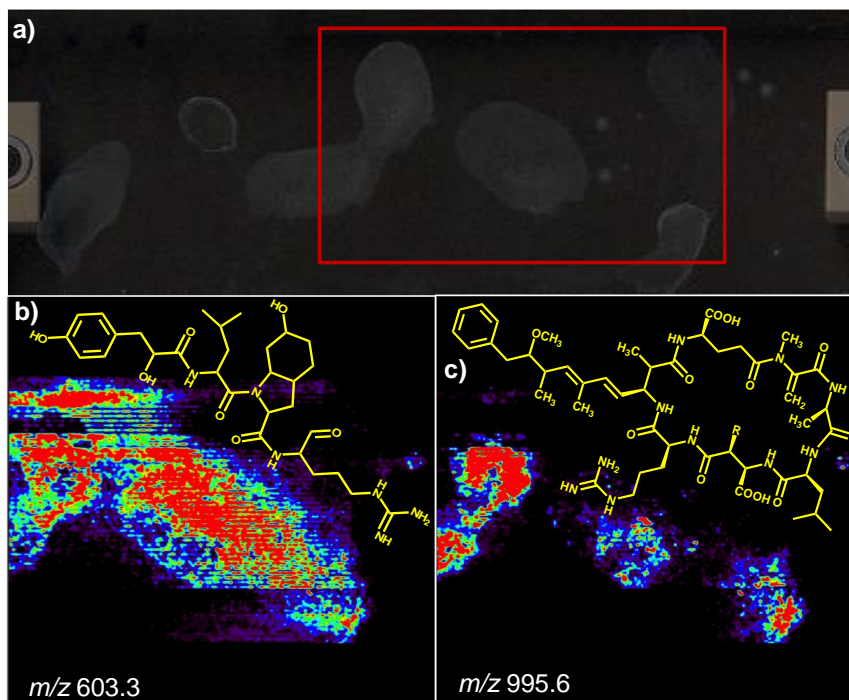


FIGURA 36 - MALDI-IMS slide com colônias de *Microcystis artuginosa* PCC 7820 com a área scaneada delimitada pelo retângulo em vermelho. Imagem MALDI-IMS gerada para: (b) íon m/z 603.3 correspondente a aeruginosina 602 e m/z 995.6 correspondente a molécula protonada de MC-LR.

Outro experimento realizado foi o co-cultivo das espécies *N. harveyana* PCC 7804 e *A. cylindrica* PCC 7122 em uma mesma lâmina, sendo que a cultura de *A. cylindrica* PCC 7122 se encontra do lado esquerdo e a *N. harveyana* PCC 7804 se encontra do lado direito da lâmina (FIGURA 37a).

Ao observarmos a FIGURA 37 que apresenta as imagens obtidas pela análise deste cultivo, temos que o íon de m/z 761.3 referente a anaquelina produzido pela *A. cylindrica* PCC 7122, este sideróforo se encontra totalmente distribuído pela lâmina, pois como citado anteriormente, este metabólito é capaz de atravessar a membrana celular, e migrar para o meio de cultura.

Já os peptídeos nodularina-R (m/z 825), nodularina-[Har] (m/z 839) encontram-se dentro das células da *N. harveyana* PCC 7804, assim como as MC's que são encontradas somente dentro das células de *M. aeruginosa* PCC 7820.

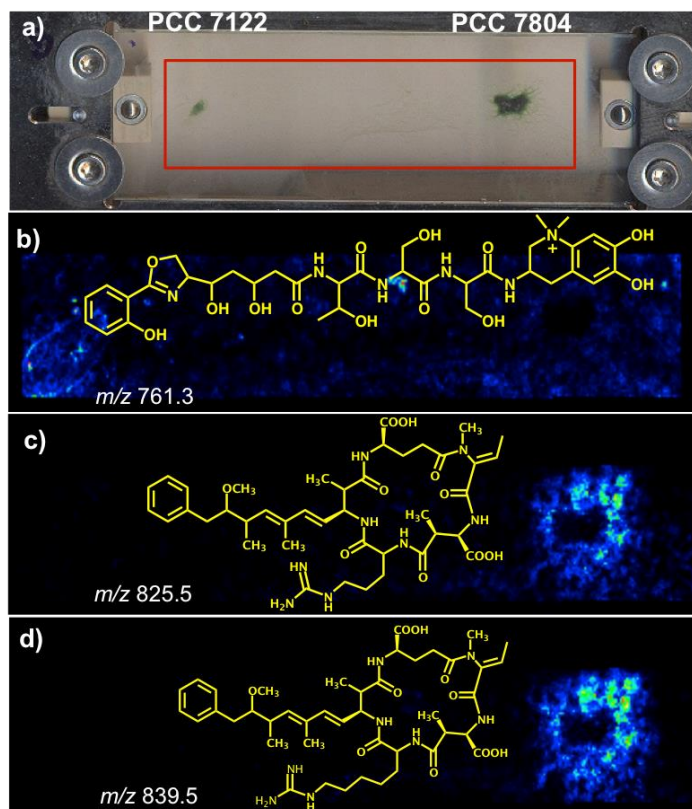


FIGURA 37 - a) MALDI-IMS slide com as colônias de cianobactérias *N. harveyana* PCC 7804, no lado direito do slide e *A. cylindrica* PCC 7122 do lado esquerdo, b) imagem gerada por MALDI-IMS da distribuição do sideróforo anaquelina (m/z 761), c e d) imagens geradas por MALDI-IMS dos peptídeos cíclicos nodularina-R (m/z 825), nodularina-[Har] (m/z 839).

As imagens obtidas reforçam a hipótese de que cada espécie de cianobactérias produz peptídeos característicos, que podem caracterizar as mesmas nestas imagens, sendo que os peptídeos nodularina-R (m/z 825), nodularina-[Har] (m/z 839) são produzidos somente pela *N. harveyana* PCC 7804, a MC-LR (m/z 995) é produzida pela *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, e a anaquelina (m/z 761.3) é produzido pela espécie *A. cylindrica* PCC 7122.

O terceiro experimento foi realizado em uma lâmina na qual foram cultivadas as três espécies simultaneamente, onde cada uma das espécies foi inoculada em diferentes pontos da mesma: a *N. harveyana* PCC 7804, foi inoculada do lado esquerdo, a *A. cylindrica* PCC 7122, no lado direito, e a *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 foi inoculada entre as duas espécies. Este experimento foi realizado para a confirmação dos resultados acima citados, e para a análise da produção de outros possíveis metabólitos, quando estas espécies estão em contato uma com as outras.

Desta maneira, na FIGURA 38 temos a imagem da lâmina com o co-cultivo das três cianobactérias, e podemos observar claramente o que foi relatado anteriormente, já

que o sinal de m/z 839.5 aparecem somente sobre as culturas de *N. harveyana* PCC 7804, o m/z 995.6, somente na espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, e a m/z 761.3, na espécie *A. cylindrica* PCC 7122.

Além destes íons característicos, outros íons são detectados, como o sinal de m/z 638.5 (FIGURA 38c), que é encontrado somente na cultura da *N. harveyana* PCC 7804, o íon m/z 619.1 (FIGURA 38c), detectado somente ao redor das colônias, assim como os íons m/z 989.4 (FIGURA 38d), e 1276.3 (FIGURA 38e), em destaque os íon 1643.6 (FIGURA 38f), e 1971 (FIGURA 38g), fortemente concentrado entre as colônias e podem estar correlacionadas com o processo de 'cross talking'.

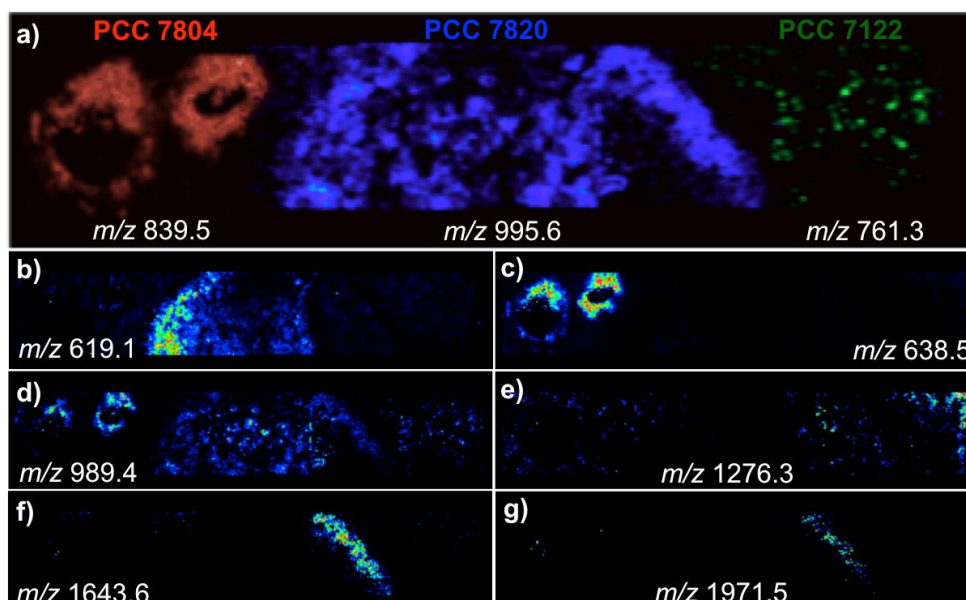


FIGURA 38 - MALDI-IMS imagem para as três espécies de cianobactérias *N. harveyana* PCC 7804, *M. aeruginosa* PCC 7820 e *A. cylindrica* PCC 7122. Imagem (a) para os biomarcadores nodularina Nod-[Har] (m/z 839.5), microcistinas MC-LR (m/z 995.6) e anaquelina (m/z 761.3). Imagens (b) a (g) para os íons desconhecidos m/z 619.1, 638.5, 989.4, 1276.3, 1643.6 e 1971.5.

5. Conclusões

Os experimentos de MALDI-MS foram capazes de identificar diferentes peptídeos das diferentes espécies analisadas. Estas análises foram base para a escolha das espécies utilizadas para o imageamento das culturas no meio sólido. Assim, este trabalho, apresenta pela primeira vez na literatura, imagens do perfil de distribuição de ciano-peptídeos produzidos pelas espécies estudadas.

Os resultados obtidos apresentaram novas perspectivas com relação à distribuição espacial dos peptídeos produzidos pelas espécies de cianobactérias estudadas, confirmando que os peptídeos nodularina-R (m/z 825), nodularina-[Har] (m/z 839) produzidos somente pela *N. harveyana* PCC 7804 e a MC-LR (m/z 995) é produzida pela *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 não são capazes de atravessar a membrana das células, no entanto a anaquelina (m/z 761.3) produzido pela espécie *A. Cylindrica* PCC 7122 atravessa a membrana celular e se encontra por toda lâmina de cultivo.

Além disto, foi observada a presença de outros sinais, que foram detectados somente entre as colônias, indicando que podem ser moléculas que participam como 'cross-talking'.

CAPÍTULO 3:

Identificação de cianopeptídeos presentes na floração de cianobactérias presente na Represa Salto Grande.

CAPÍTULO 3: Identificação de cianopeptídeos presentes na floração de cianobactérias presente na Represa Salto Grande.

1. Introdução

1.1. Floração de Cianobactérias presente na Represa Salto Grande (Americana – SP)

As florações de Cianobactérias ocorrem como consequência do carreamento de excesso de nutrientes para os corpos d'água, tornando a superfície dos mesmos uma 'densa sopa verde' (IBELINGS et al., 2016) (FIGURA 39). No entanto, estas florações acarretam em inúmeros problemas hidrológicos e ecológicos. Há registro de morte de animais por envenenamento através do consumo de águas contaminadas com cianobactérias, quando o Rio Murray, localizado na Austrália, passou por longa estiagem (FRANCIS, 1878). Contudo, o histórico das tentativas de controle destas florações iniciou-se um século depois, nas décadas de 70 e 80, quando as consequências negativas das florações não poderiam ser mais ignoradas, uma vez que o abastecimento de água começou a ser prejudicado (IBELINGS et al., 2016). Além disto, com o aumento da produção industrial e desenvolvimento da agricultura, e, como consequência, o amplo crescimento demográfico urbano, a partir da década de 90 os relatos de florações de cianobactérias passaram a ser mais frequentes no mundo todo (SANT'ANNA et al., 2007).

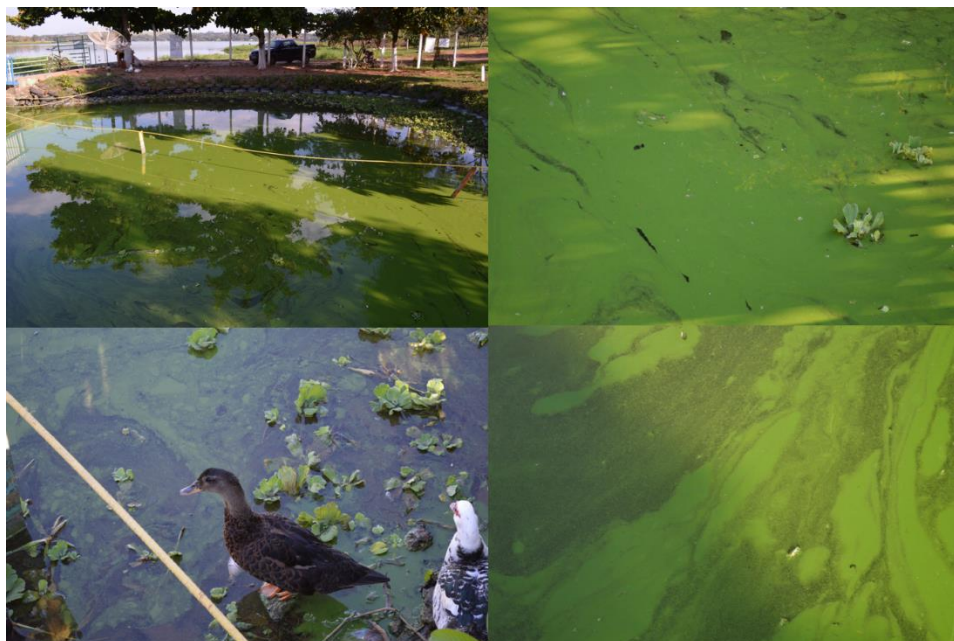


FIGURA 39 - Imagens de Floração de Cianobactérias, Americana -SP. Fonte: arquivo pessoal do autor.

A partir do ano de 1997, a literatura apresenta estudos sobre as florações de cianobactérias que ocorriam na bacia do Rio Tietê (São Paulo – Brasil). Neste período, os problemas gerados em virtude da eutrofização tornaram-se agravantes, pois desde esta época, a região do Alto Tietê já fornecia água para milhares de pessoas nesta região (SANT'ANNA et al., 2007).

Desde então, a floração de cianobactérias que ocorre na cidade de Americana-SP, na Represa Salto Grande, foi constatada e despertou o interesse dos pesquisadores sobre a recorrência da mesma (SANT'ANNA et al., 2007).

A cidade de Americana encontra-se no Estado de São Paulo, pertencente à região Metropolitana de Campinas, possui uma população de aproximadamente 230 mil pessoas (FRANCIS, 1878). Economicamente, Americana possui um pólo industrial importante, sendo a maior produtora de tecidos de fibras artificiais e sintéticas da América Latina. Além disto, o município se destaca nas áreas de metalurgia, borracha, indústria alimentícia e de plásticos, sendo registradas cerca de 1.684 indústrias de todos os ramos e portes (AMERICANA, 2017a).

Quanto a hidrografia, a cidade de Americana possui como principais rios e córregos: o rio Piracicaba, Ribeirão Quilombo, rio Jaguari e rio Atibaia. Sendo que este último possui suas águas represadas nesta região, formando a Represa Salto Grande (AMERICANA, 2017b). A FIGURA 40 apresenta o mapa de hidrografia da cidade.



FIGURA 40 – Mapa de Hidrografia da cidade de Americana -SP. Fonte: http://www.americana.sp.gov.br/v6/images/perfil_municipio/perfil_2011_mapa_hidrografico.jpg

A Represa Salto Grande nasceu em 1949, com o represamento das águas do Rio Atibaia para a construção da Hidrelétrica de Americana. Conseqüentemente, na margem oeste nasceram dois lugares de lazer: a Praia dos Namorados e a Praia Azul, amplamente utilizados pela população. No entanto, atualmente, além da produção energética e recreação, a represa é utilizada para outros fins tais como irrigação e suprimento de água. A represa possui aproximadamente 17 Km de comprimento, 64 Km de perímetro, área específica de 11.5 Km e volume aproximado de $106 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ de água, variando de acordo com os períodos de chuva (AMERICANA, 2017b).

A bacia hidrográfica do rio Atibaia possui cenários contrastantes, variando entre áreas preservadas até grandes centros urbanos. Esta bacia está relacionada a dois grandes centros urbanos e econômicos do país, que são as regiões metropolitanas de Campinas e São Paulo. Estima-se que a densidade demográfica, na bacia, no ano de 2013 foi de aproximadamente 398,38 habitantes/ Km^2 , o que afeta diretamente a qualidade da água desta Bacia. Além disto, a mesma recebe esgoto doméstico das cidades Campinas e Paulínia, além de outros dejetos de dezoito cidades vizinhas menores e das atividades agrícolas que ocorrem em torno da bacia (SILVA; JARDIM, 2007), que conseqüentemente causaram o aumento dos níveis de nutrientes (nitrito, nitrito, amônia e fosfato total dissolvido) na água do reservatório, o que acarretou um

nível avançado de eutrofização da represa, e conseqüentemente, a floração de cianobactérias (LEITE, 1998).

Na literatura estão apresentadas as espécies de cianobactérias que foram encontradas nesta floração: durante o ano de 2004: *Microcystis* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Pseudoanabaena mucicola* e *Anabaena spiroids* [9], em 2004 e 2005: *Microcystis* sp. CENA120, *Cyanobium* sp. CENA122, *Calothrix* sp. CENA127, *Chroococciopsis* sp. CENA124, *Romeria victoriae* CENA123, *Microcystis panniformis* CENA121, *Synechococcus nidulans* CENA132, *Synechococcus elongatus* CENA126, *Microcystis* sp. CENA133, *Lyngbya* sp. CENA128, *Leptolyngbya* sp. CENA131, *Leptolyngbya* sp. CENA129, and *M Cyanobium* sp. CENA118 (GENUÁRIO et al., 2016). No ano de 2014, foi reportado pela primeira vez, a presença da espécie *Phanktothrix isoethrix* e do gênero *Komvophorum* nesta represa (FONSECA, 2014). A FIGURA 41 apresenta imagens de algumas das espécies de cianobactérias encontradas na Represa Salto Grande.

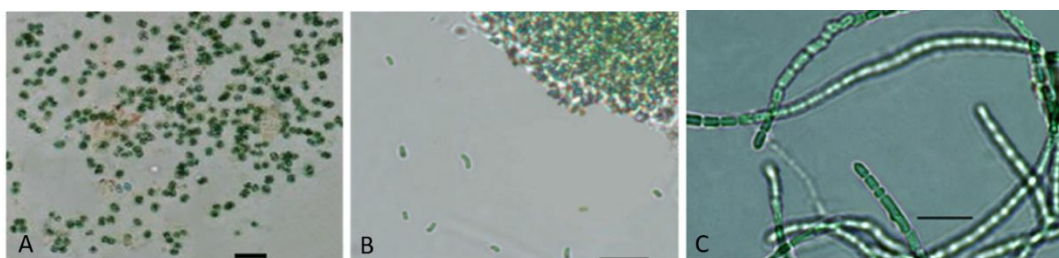


FIGURA 41 – Espécies de cianobactérias encontradas na floração da Represa Salto Grande. A) *Microcystis* sp. CENA120, B) *Cyanobium* sp. CENA122, C) *Romeria victoriae* CENA123. Fonte: Genuário (2016), adaptado.

Além de pesquisas sobre as espécies de cianobactérias presentes nesta floração, foram realizados estudos sobre as cianotoxinas e a concentração das mesmas na Represa Salto Grande. No ano de 2004, a concentração total de microcistinas foram quantificadas, apresentando uma concentração no mês de fevereiro de 0,205 µg/L. As microcistinas detectadas nesta floração até o momento foram MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA (FERREIRA et al., 2005). Outras toxinas detectadas foram anatoxina e saxtoxina. Em amostras coletadas em 2007, foram encontradas duas variantes de microgininas (CARNEIRO et al., 2012).

No ano de 2013 a mídia noticiou em rede nacional esta floração, mostrando imagens da represa e a contaminação visual de manchas verdes, nas plumas de aves (“Estiagem gera ‘boom’ de algas e pato fica com plumagem verde em represa”, 2014).

Atualmente, um movimento ‘Vamos salvar a Represa Salto Grande’ foi criado (“Vamos salvar a represa Salto Grande”), e há uma grande discussão entre os órgãos como Departamento de Água e Esgoto (DAE), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (Cetesb), e prefeituras sobre a interdição da Represa Salto Grande, pois a mesma ainda é utilizada por pescadores e outras pessoas (“Grupo quer interdição da represa do Salto Grande”).

Neste contexto, de modo a colaborar com a sociedade, este trabalho tem como objetivo de identificar, de forma rápida e eficiente, as diferentes variantes de microcistinas, assim como os diferentes cianopeptídeos presentes na floração de cianobactérias da Represa Salto Grande, uma vez que somente as classes de microcistinas e microgininas foram identificadas. Para este fim, as análises foram realizadas primeiramente por MALDI-TOF-MS. No entanto, para confirmação das estruturas detectadas foram necessários experimentos de MS/MS, os quais tiveram que ser realizados em outro equipamento disponível em nosso Instituto de Química: ESI-qTOF-MS/MS, pois que o equipamento de MALDI-TOF-MS presente em nosso grupo de pesquisa não possui configuração para a realização de experimentos de MS/MS.

1.2. *Eletrospray*

A fonte de ionização *eletrospray* (ESI) foi desenvolvida por John Fenn em 1988 (HOFFMAN, E. AND STROOBANT, 2007), o qual foi laureado pelo prêmio Nobel em Química no ano de 2002, pelo desenvolvimento desta fonte de ionização. Assim como a MALDI-MS desenvolvida por Karas e Hillenkamp, a fonte de *eletrospray* também é capaz de ionizar macromoléculas, tornando viável a análise das mesmas por Espectrometria de Massas (DASS, 2007). No entanto, diferentemente a MALDI-MS, a fonte de *eletrospray* realiza análises de moléculas em amostras em fase líquida, como será explicado adiante.

O *eletrospray* é formado pela aplicação de uma diferença de potencial (2-6 kV), a pressão ambiente, em um líquido que passa através de um fino capilar, em baixo fluxo (~ 1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Então, um campo elétrico é obtido entre o capilar e um contra eletrodo, que ficam separados por cerca de 0,3-2 cm. A formação deste campo induz o acúmulo de cargas opostas no líquido localizado no final do capilar, formando o cone de Taylor, e um spray de gotículas altamente carregadas. Um gás, injetado co-

axialmente a este capilar, auxilia na pulverização da amostra. Então, as gotas formadas passam através de uma cortina de gás aquecido, geralmente N_2 , para que o solvente seja evaporado, e as cargas de mesmo sinal, cada vez mais próximas, se repelem acarretando em sucessivas explosões coulombicas, até que haja somente íons do analito, que seguem para os analisadores (DASS, 2007). A FIGURA 42 apresenta o esquema básico de uma fonte de eletrospray.

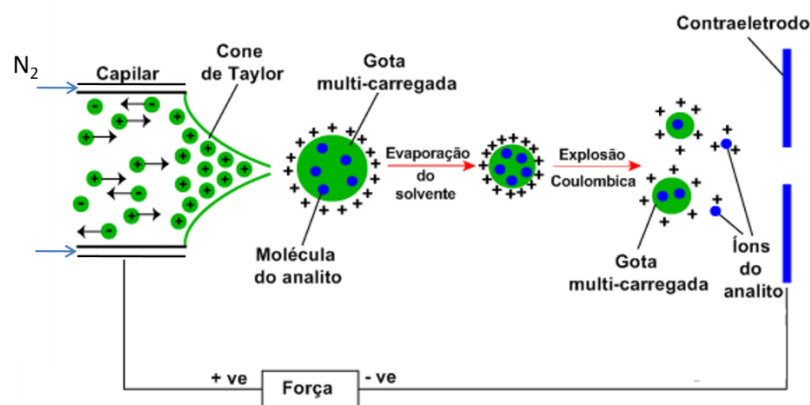


FIGURA 42 - Esquema básico da Fonte de ionização por eletrospray.

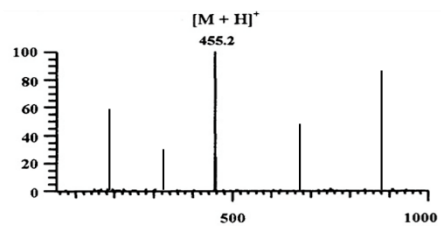
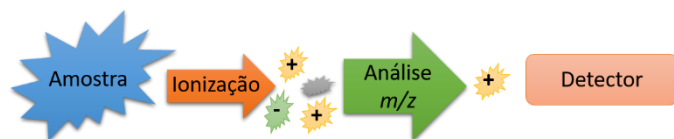
Para que uma amostra seja submetida a uma análise pela fonte de ionização eletrospray, a mesma deve ser preparada preferencialmente, em misturas de solventes: água, acetonitrila e metanol, levemente acidificadas (em caso de análises em modo positivo), contendo aproximadamente $< 0,1\%$ de ácido acético (DASS, 2007). Diferentemente de MALDI-MS, para o eletrospray as amostras, necessitam de um rígido preparo de amostra, para que não haja nenhum tipo de partículas, ou resquícios sólidos da mesma que possam seguir no capilar de ionização. Além disto, as amostras precisam estar diluídas, o suficiente para que os analitos possam ser detectados e analisados.

1.3. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS ou MS²)

As fontes de ionização MALDI-MS e eletronspray, são técnicas que oferecem a ionização branda dos analitos, ou seja, os espectros possuem sinais dos íons da molécula inteira, sem oferecer dados estruturais da mesma. Desta forma, para obter maiores informações sobre a estrutura das moléculas de interesse, é necessário que a mesma seja fragmentada. Para que isto ocorra, o íon de interesse é selecionado e o mesmo é submetido a uma energia de colisão, assim, com excesso de energia, o íon é fragmentado, gerando outros íons menores.

Neste contexto, primeiramente ocorre o experimento de *full scan*, onde todos os íons gerados são separados pelo analisador, de acordo com seu valor de m/z , em seguida, no experimento de MS/MS o íon de interesse é selecionado e isolado em uma câmara de colisão, gerando íons secundários, que serão separados, novamente de acordo com seu valor de m/z , no analisador seguinte. Então, para que ocorra um experimento de MS/MS são necessários dois analisadores em série, para que os íons gerados na ionização sejam separados, e então os íons secundários, formados pela fragmentação do íon selecionado, sejam também separados. A FIGURA 43 apresenta um experimento de MS/MS a molécula do verapramil, na FIGURA 43a, o experimento de Full scan foi realizado, e o espectro obtido apresentou o íon de m/z 455.2, referente a molécula protonada $[M+H]^+$, então em uma segunda etapa este íon foi selecionado e submetido ao experimento de MS/MS, e o espectro obtido (FIGURA 43b) possui o sinal do íon da molécula protonada, e dos íons produtos, gerados pela fragmentação da molécula do verapramil.

a) Full scan



b) MS/MS

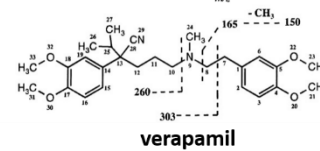
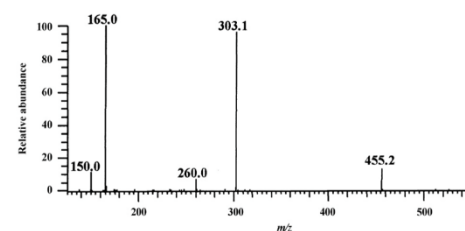
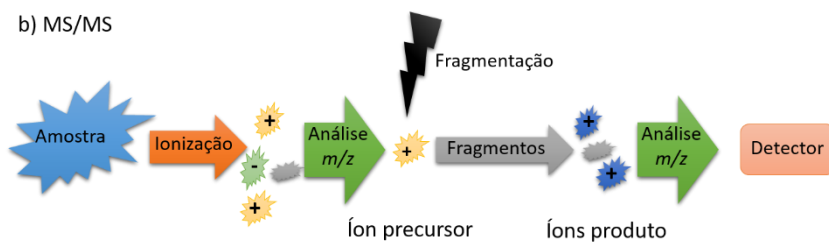


FIGURA 43 - A) Esquema de um experimento Full scan B) Esquema de um experimento de MS/MS.

2. Objetivos

Este capítulo tem como objetivo identificar os cianopeptídeos presentes na floração de cianobactérias da Represa Salto Grande, localizada na cidade de Americana – SP. Diferentemente das espécies estudadas no Capítulo 2 desta tese, as cianobactérias presentes em florações crescem em ecossistema aberto, sem nenhum tipo de controle de luminosidade, temperatura e nutrientes. Neste contexto, os cianopeptídeos serão primeiramente identificados de maneira rápida por MALDI-TOF-MS, e em seguida suas estruturas serão confirmadas em experimentos por ESI-qTOF-MS/MS.

3. Materiais e Métodos

3.1. Coleta de amostras ambientais de floração tóxica de cianobactérias.

A coleta das amostras foi realizada na cidade de Americana- SP (FIGURA 44) em seis pontos. Para a coleta foram utilizados sacos plásticos estéreis (Whirl-pak) que foram armazenados em caixa térmica até a chegada ao laboratório onde foram feitas análises por MALDI-TOF-MS e microscopia óptica.

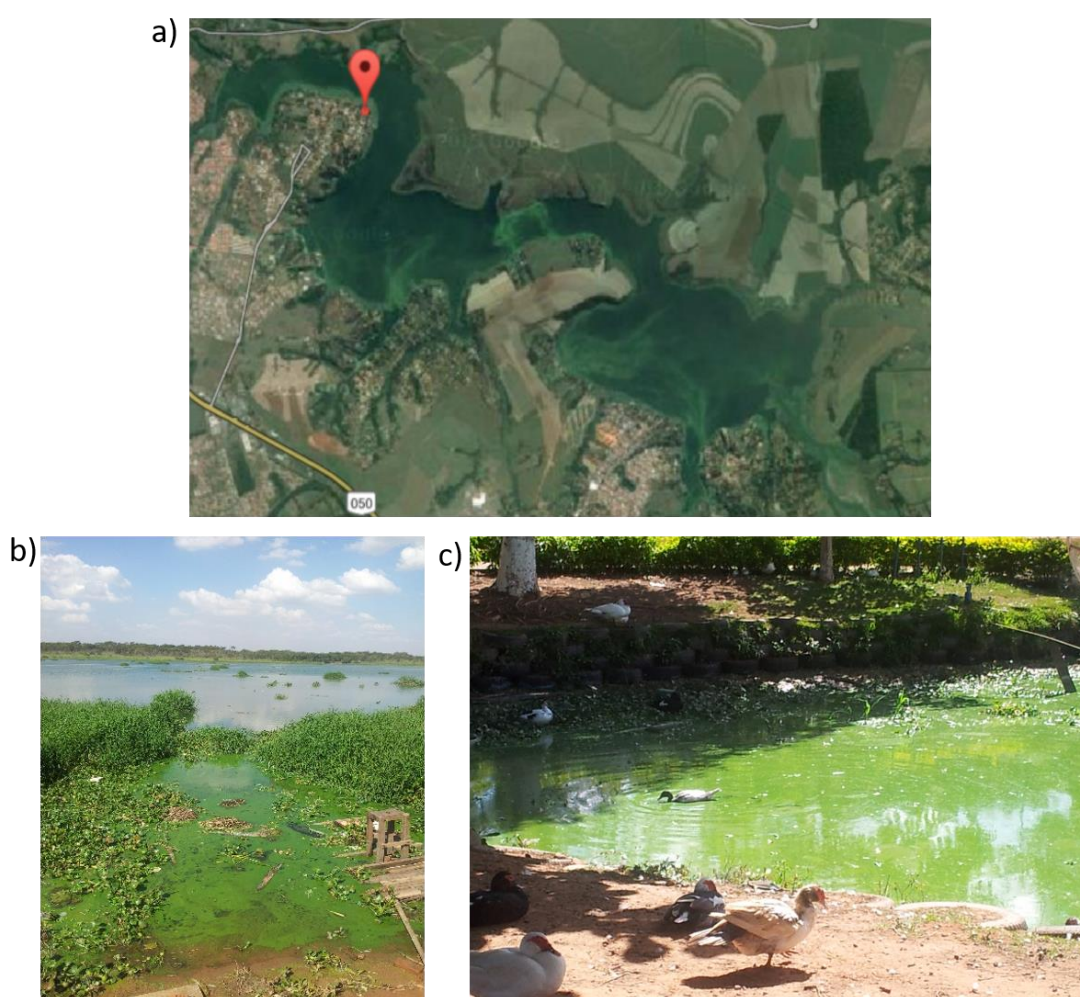


FIGURA 44 – a) Imagem da floração de cianobactérias presente em Americana-SP, Brasil vista por satélite. Fonte: Google Maps. b) Imagem do Ponto de Coleta 1: 22°42.350' S 047°16.058' W. c) Imagem do ponto da margem da Represa na Associação Barco Escola. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

3.2. Análise das amostras ambientais por MALDI-TOF-MS

As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF-MS Micromass-Waters (M@LDI-LR, Manchester, Reino Unido). Os espectros foram adquiridos no modo reflecton e positivo, com as voltagens do equipamento apresentadas na Tabela 14. O laser utilizado foi o de nitrogênio ($\lambda = 337$ nm). O equipamento foi calibrado com polietilenoglicol (PEG) no intervalo de massas moleculares (m/z 600-1250), e as análises tiveram resolução acima de 10000.

Para realizar as análises foi utilizada uma placa de MALDI de aço inoxidável de 96 spots (Micromass®, Manchester, Reino Unido). Cada um dos spots possui a capacidade de 1.50 μ L, e a placa possui 4.00x5.50 cm de dimensão.

Todos os espectros obtidos foram tratados no software Masslynx 4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido).

Tabela 14 - Parâmetros utilizados para as análises por MALDI-TOF.

Parâmetros	Voltagens (V)
Tensão de pulso	2500
Tensão do reflecton	2000
Tensão da fonte	15000
Tensão do MCP (microchannel plate - detector)	18000

O preparo de amostra utilizado foi o mesmo mencionado no Capítulo 2, no qual primeiramente a matriz é preparada com uma solução supersaturada de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,10% de TFA aquoso. Aplica-se 1,00 μ L de amostra sobre um *spot* da placa de MALDI, em seguida foi realizada a secagem da amostra em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo (Tecnal TE-058). Após a secagem da amostra, 1,00 μ L de solução supersaturada da matriz é adicionada por cima da amostra seca e a placa é novamente levada para a o vácuo, onde é esperada a cristalização dessa mistura.

3.3. Análise das amostras ambientais de floração tóxica de cianobactérias por ESI-qQ-TOF-MS/MS.

Como mencionado na Introdução deste Capítulo, o uso da técnica ESI-qQ-TOF-MS/MS requer um rígido preparo de amostra para que as análises sejam realizadas com eficiência e com todo o cuidado que o equipamento requer. A FIGURA 45 apresenta um fluxograma do procedimento realizado.

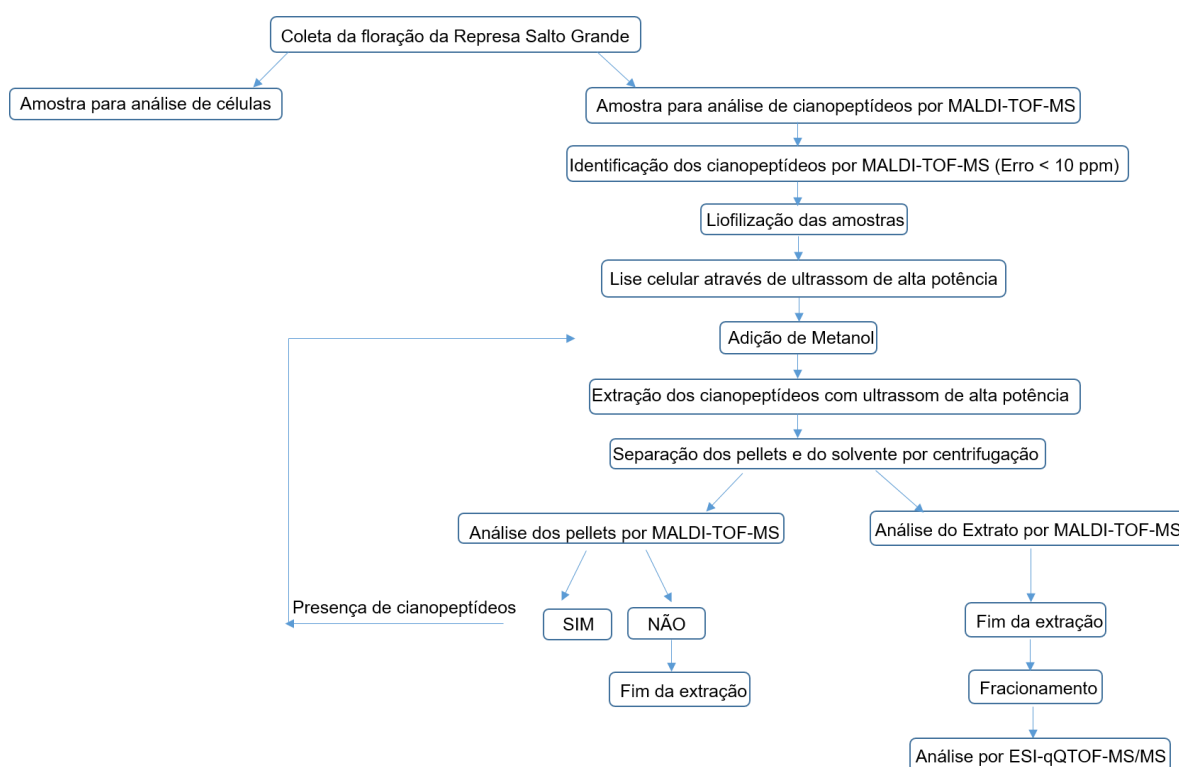


FIGURA 45 – Fluxograma do procedimento experimental realizado para identificação dos cianopeptídeos encontrados na floração de cianobactérias da Represa Salto Grande.

Para realizar este preparo, primeiramente foi necessário a extrair os cianopeptídeos de dentro das células das cianobactérias. Desta maneira, a primeira etapa realizada foi liofilizar 12,50 mL de amostra, no liofilizador Enterprise I (Equipamentos Terroni Científicos). Então, na amostra seca foram adicionados 12,50 mL de metanol e a mesma foi submetida a ultrassom de alta potência (Ultrasonic Homogenizers HD 2070 – HD 2200, Bandelin Sonoplus) com o objetivo de promover a lise celular. Para este fim, foram utilizados 4 ciclos de 30 segundos cada, com 50 W de potência.

Em seguida, a amostra foi centrifugada, e então o extrato, assim como o material celular foram analisados por MALDI-TOF-MS. Este processo foi repetido para cada extração dos cianopeptídeos, até o momento em que o equipamento não fosse capaz de detectar sinais na faixa de massa de interesse (500-2000 Da). Para isto, o processo de extração por ultrassom e centrifugação foram realizados por quatro vezes.

Após a lise celular e extração dos cianopeptídeos, o solvente referente a extração número 3 foi seco totalmente em rotaevaporador, ressuspendido em 1,00 mL de metanol: água (20%, v/v). O fracionamento deste extrato foi realizada em cartucho de extração em fase sólida Sep-pak C₁₈, 500 mg, 3cc, Waters®. Para ativação do cartucho foram utilizados 6,00 mL de metanol e em seguida 6,00 mL de água ultra pura, então o extrato (7,10 mg) foi ressuspendido em 1,00 mL metanol:água (2:8, v/v) foi aplicado no cartucho e a eluição dos compostos de interesse foi realizada utilizando eluentes com ordem decrescente de polaridade, sendo que cada eluente continha 6,00 mL de mistura de solvente metanol:água (2:8, 4:6, 6:4, 8:2, v/v). Cada 1,00 mL de eluente foi coletado em um eppendorf, resultando em 30 eppendorfs, sendo seis de cada eluente. Todos estes foram analisadas por MALDI-TOF-MS, afim de averiguar o perfil de peptídeos eluídos em cada um, e assim agrupar as frações semelhantes e selecionar as quais seriam submetidas às análises por ESI-qTOF-MS/MS.

Para a confirmação estrutural dos íons de *m/z* detectados em análises diretas de floração de cianobactérias por MALDI-TOF-MS, realizou-se a análise de MS/MS destes íons em um equipamento ESI-Qq-TOF-MS Bruker® Maxis Impact. Os espectros foram adquiridos no modo positivo, e as condições de análise encontram-se a seguir:

- Faixa de Aquisição: *m/z* 50 - 1500
- Voltagem da fonte de ESI: 3,5kV
- Pressão do gás nebulizador: 0,4 Bar
- Vazão do gás de secagem: 3,0 L min⁻¹
- Temperatura do capilar de transferência: 180°C

Otimizou-se a energia de colisão (CID) para cada íon de interesse.

4. Resultados e Discussões

Primeiramente, as amostras foram observadas por microscopia óptica para analisar as diferentes espécies de cianobactérias presentes nesta floração, (FIGURA 46). Ao verificar a morfologia celular em forma de cocos, e comparando a concentração celular com as imagens já apresentadas na literatura, pode-se inferir que a maior parte da população de cianobactérias presentes nesta floração são do gênero *Microcystis* sp. Além disso, existem outras células de espécies filamentosas, também já relatadas na literatura.

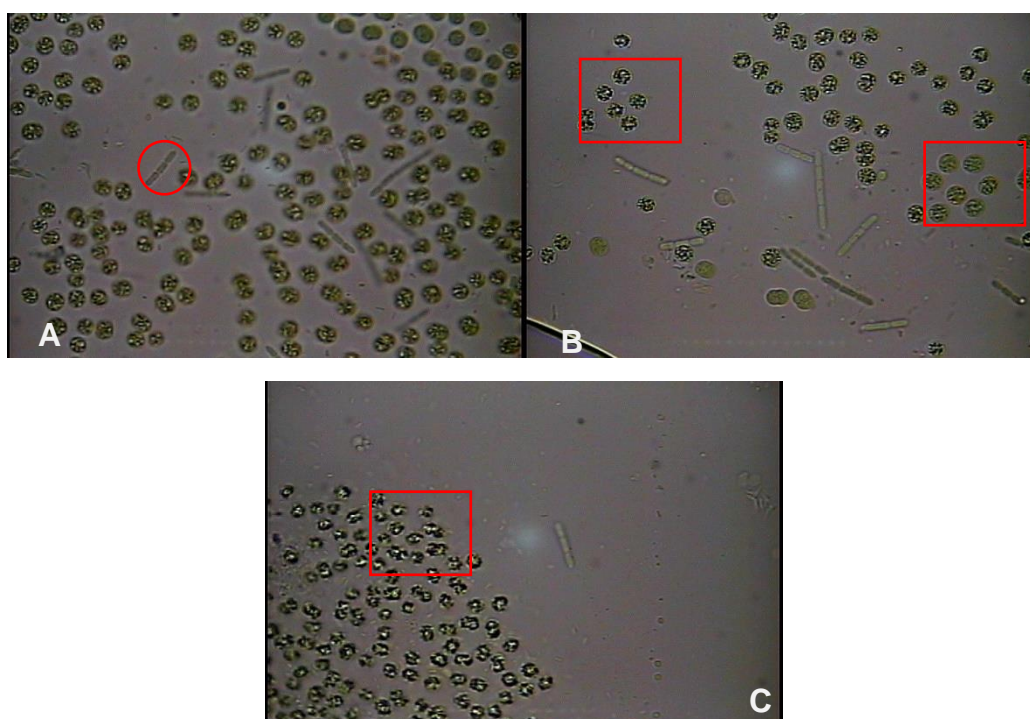


FIGURA 46 - Imagem das cianobactérias vistas ao microscópio óptico, zoom de 100x. A) Células em forma filamentosas, B e C) Células em forma de cocos de diferentes tamanhos, tais como *Microcystis* sp.

Todas as amostras coletadas desta floração de cianobactérias foram analisadas por MALDI-TOF-MS para identificar os cianopeptídeos presentes de modo rápido e eficiente. Nos espectros apresentados na FIGURA 47 podemos verificar que em diferentes pontos de um mesmo reservatório pode ocorrer a presença de uma grande variedade de metabólitos. No espectro a) ressaltamos a presença de sinais na faixa de m/z 600 e 900, que não aparecem nos espectros b) e c). Isto pode ocorrer pela distribuição espacial desigual das espécies de cianobactérias presentes nos diferentes pontos da floração.

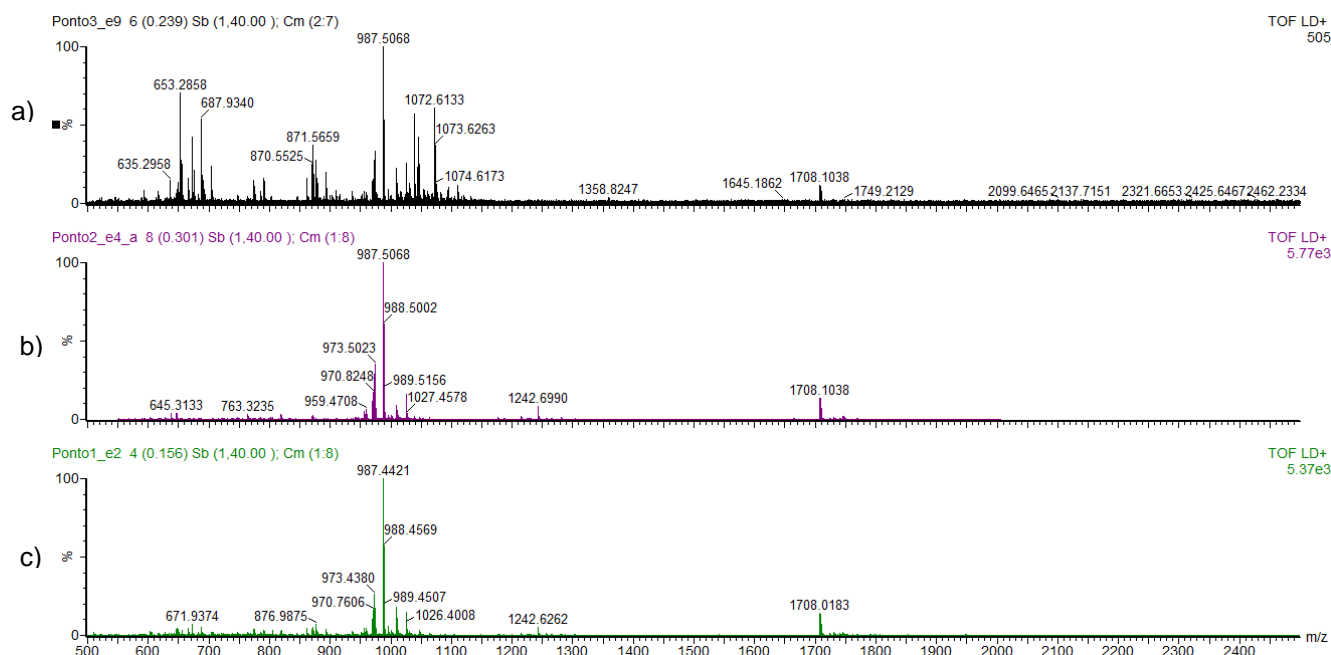


FIGURA 47 - Espectros MALDI-(+)-TOF/MS das amostras coletadas em diferentes pontos: a) Ponto de coleta 1; b) Ponto de coleta 2; c) Ponto de coleta 3.

Nesta floração foram detectados sinais de m/z referentes à quatro variantes de MC's, quatro variantes de aeruginosinas, duas variantes de cianopeptolinas, e uma variante de microviridina. Todos os erros calculados e obtidos foram abaixo do valor de 10 ppm, aceitável pelo equipamento utilizado. A Tabela 15 apresenta os sinais dos íons de m/z referentes aos cianopeptídeos encontrados. A estrutura de cada um foi confirmada por experimentos de MS/MS, e/ou análise de alta resolução por MALDI-TOF-MS.

Tabela 15- m/z referentes aos peptídeos identificados na floração por MALDI-TOF-MS. *Valores descritos na literatura.

Cianopeptídeo	[M + H] ⁺	Teórica	MALDI-MS	Erro(ppm)
	Form. Mol.	m/z [M + H] ⁺	m/z [M + H] ⁺	
Aeruginosina 602	C ₃₀ H ₄₇ N ₆ O ₇	603.35007	603.3510	1.54
Aeruginosina 298A	C ₃₀ H ₄₉ N ₆ O ₇	605.36572	605.3663	0.95
Aeruginosina 644	C ₃₂ H ₄₉ N ₆ O ₈	645.36064	645.3586	-3.16
Aeruginosina 646	C ₃₂ H ₅₁ N ₆ O ₈	647.37620	647.3776	2.03
Cianopeptolina 972	C ₄₆ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃	973.53530	973.5425	7.39
Cianopeptolina 986 A	C ₄₇ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃	987.55096	987.5488	-2.18
MC-LR	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₂	995.55604	995.5626	6.59
MC-HiIR	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃	1009.53000	1009.5429	7.52
MC-RR	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₃ O ₁₂	1038.57309	1038.5757	2.51
MC-YR	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃	1045.53531	1045.5437	8.03
Cianopeptolin 1071	--	1072*	1072.6240	--
Microviridin 1707	--	1707.75*	1707.6777	--

A confirmação das estruturas propostas utilizando MALDI-TOF-MS foram realizadas por ESI-qQ-TOF-MS/MS. Uma análise realizada por ESI-qQ-TOF-MS exige que a amostra esteja extremamente pura, livre de contaminantes tais como resíduos celulares que possam danificar o equipamento. Como parte dos cianopeptídeos está presente dentro das células das cianobactérias, foram realizadas as seguintes etapas para que as análises de MS/MS dos mesmos pudessem ser obtidas.

As lavagens dos pellets das células foram acompanhadas por MALDI-TOF-MS para avaliar a eficiência da extração, até que não houvesse mais sinais na região de m/z de interesse. Para cada etapa, foram analisados o solvente e os pellets das células, a FIGURA 48 e FIGURA 49 apresentam os espectros obtidos para cada análise.

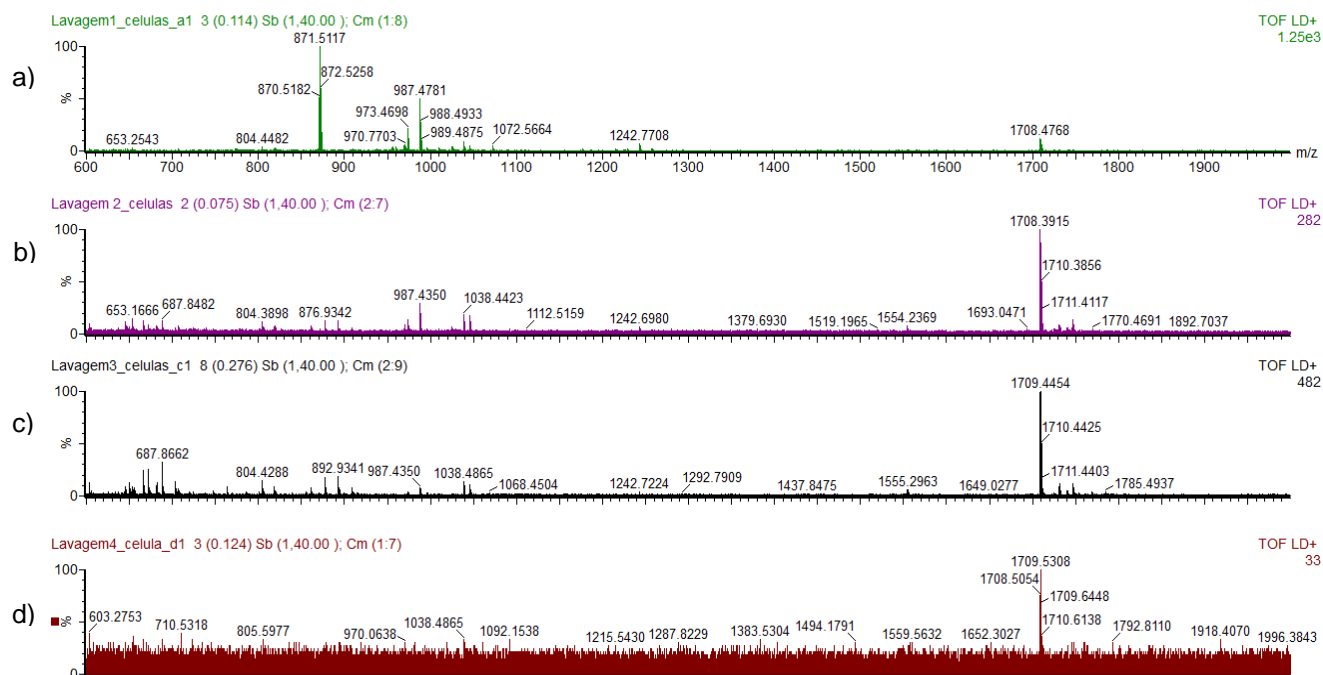


FIGURA 48- Espectros MALDI(+)-TOF/MS das análises das células referentes às extrações realizadas utilizando metanol, a) análise referente às células restantes da extração 1, b) análise referente às células restantes da extração 2, c) análise referente às células restantes da extração 3, d) análise referente às células restantes da extração 4.

Foram realizadas quatro extrações, sendo que nas duas primeiras (FIGURAS 45a e 45b; respectivamente) foi extraído preponderantemente as cianopeptolinas (m/z 987 e 983) e compostos referentes aos pigmentos das cianobactérias (m/z 871). Ainda na segunda extração, FIGURA 49c, podemos verificar a presença de sinais referentes à MC's e também da microviridina presente na amostra, esta extração ainda apresentava coloração verde clara, apontando que ainda havia presença de pigmentos nesta amostra. Na terceira extração, FIGURA 49c, podemos observar sinais dos íons na faixa de m/z 600, referentes às aeruginosinas, assim como, sinais dos íons na faixa de m/z 900, referentes a cianopeptolinas, e sinais dos íons na faixa de m/z 1000 referentes as MC's, e na faixa de m/z 1700, referente a microviridina. Na quarta extração, podemos verificar a baixa intensidade de sinais obtido pela análise das células (FIGURA 49d), apontando que a extração foi efetiva.

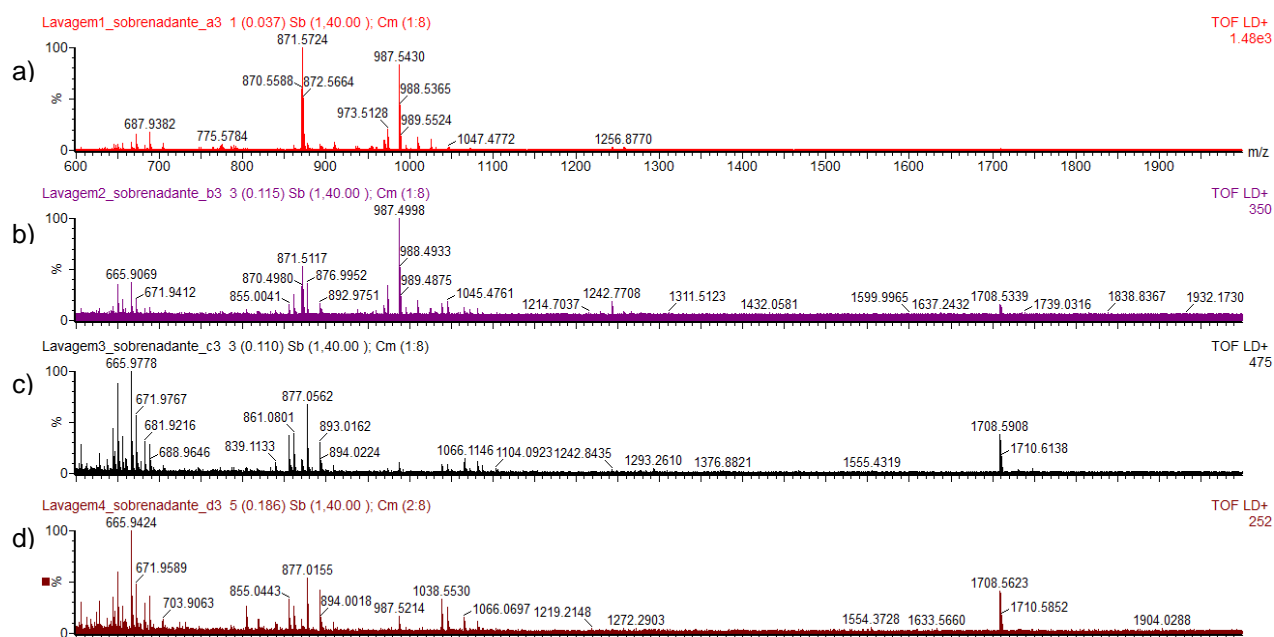


FIGURA 49 - Espectros MALDI(+)-TOF/MS das análises dos solventes das extrações realizadas utilizando metanol. a) análise referente ao solvente de extração 1, b) análise referente ao solvente de extração 2, c) análise referente ao solvente de extração 3, d) análise referente ao solvente de extração 4.

Ao observarmos os espectros obtidos na FIGURA 49, podemos verificar que os cianopeptídeos de interesse (cianopeptolinas, aeruginosinas, MC's e microviridinas) estavam presentes no solvente da terceira extração (FIGURA 49c) então o mesmo foi utilizado para purificação.

O volume de solvente desta extração foi reduzido por rota-evaporação, obtendo 7,1 mg de extrato, que foi purificado utilizando uma coluna Sep-pak C₁₈. Utilizando um gradiente de metanol: água (2:8, 4:6, 6:4, 8:2, (v/v)). A cada 1,0 mL de eluente foi retirado um eppendorf, resultando em 30 frações coletadas, sendo seis de cada mistura de solvente. Todas estas frações foram analisadas por MALDI-TOF-MS para verificar o perfil dos peptídeos eluídos em cada um, e então as frações com o mesmo perfil foram agrupadas e posteriormente, estas foram submetidas a análises por ESI-qTOF-MS/MS. A FIGURA 50 apresenta os espectros obtidos para as análises por MALDI-TOF-MS das frações em que foram detectados cianopeptídeos.

A ordem de eluição, como podemos observar na FIGURA 50 ocorreu de maneira que as aeruginosinas 644 e 646, as variantes de MC's, a cianopeptolina 973 e a microviridina 1707 presentes na amostra foram eluídas na fração com 40% MeOH: água (4:6, (v/v)) (FIGURA 50d); sendo assim mais polares que a cianopeptolina 987, as aeruginosinas 602 e 298A, que eluíram na fração 60% MeOH: água (6:4, (v/v)), como mostra a FIGURA 50.

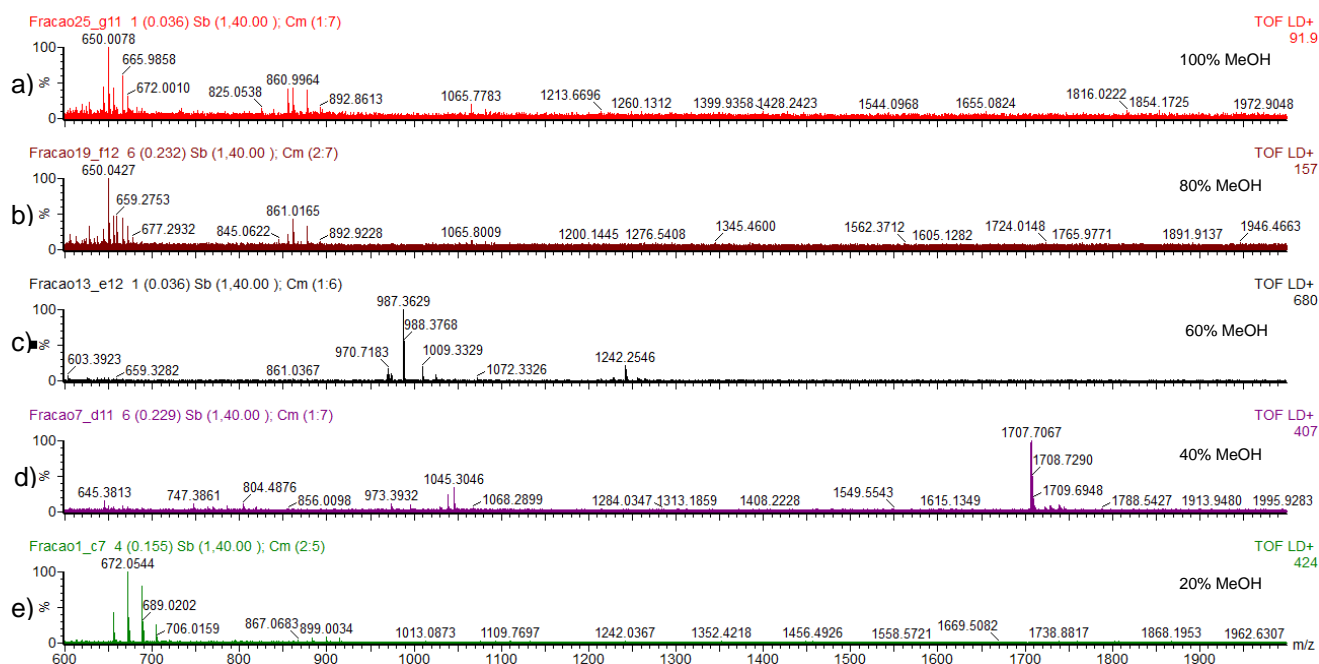


FIGURA 50 - Espectros MALDI(+)-TOF/MS obtidos das análises das frações; a) espectro referente a análise da fração 20% MeOH, b) espectro referente a análise da fração 40% MeOH, c) espectro referente a análise da fração 60% MeOH, d) espectro referente a análise da fração 80% MeOH, e) espectro referente a análise da fração 100% MeOH

Para confirmação das estruturas propostas por MALDI-TOF-MS, as frações que continham os cianopeptídeos foram analisadas por ESI-qTOF-MS/MS, gerando assim espectros com fragmentações que tornaram capazes de comprovar a identificação realizada pelas análises por MALDI-TOF-MS. As classes de cianopeptídeos caracterizadas nesta floração de cianobactérias estão descritas a seguir.

Aeruginosinas:

Nesta floração de cianobactérias foram detectadas as aeruginosinas 602, 298A, 645 e 646, com variações nos aminoácidos nas posições 1 e 4.

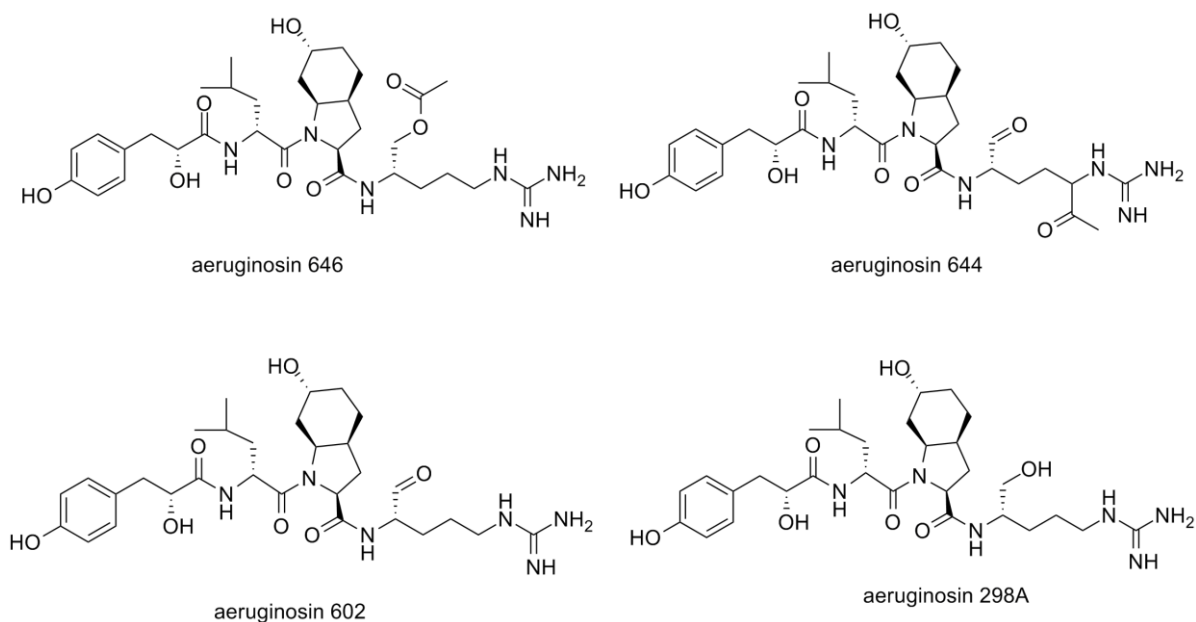


FIGURA 51 - Estrutura das aeruginosinas identificadas na floração de Americana.

Os espectros obtidos das análises por ESI-qTOF-MS/MS desta classe de compostos apresentam m/z referentes às moléculas protonadas. A TABELA 15 apresenta os sinais referentes às fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-MS/MS.

Tabela 16 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-MS/MS das aeruginosinas detectadas e identificadas nesta floração.

Aeruginosina 602 - Hpla-Leu-Choi-Argal		
Fragmento	Tipo de íon	<i>m/z</i>
M+H		603.3611
M-H ₂ O+H		585.3396
M-CH ₃ N ₂ +H		543.3179
M-Argal+H	b ₃	445.2337
Choi-Argal-NH ₂ +H		309.1914
Choi-Argal-NH ₂ -H ₂ O+H		291.1816
Choi-Argal-CH ₃ NH ₂ -H ₂ O+H		266.1854
Hpla-Leu-CO+H	a ₂	250.1432
Leu-Choi-fragmento +H		221.1642
Choi imonio +H		140.1066
Argal-fragmento +H		100.0754
Leu-imonio +H		86.0961

Aeruginosina 298A - Hpla-Leu-Choi-Argol		
Fragmento	Tipo de íon	<i>m/z</i>
M+H		605.3710
M-H ₂ O+H		587.3406
M-CH ₃ N ₂ +H		545.3661
M-Hpla+H	y ₃	441.3166
Choi-Argol-NH ₂ +H		311.2073
Choi-Argol-NH ₂ -H ₂ O+H		293.1956
Choi-Argol-CH ₃ NH ₂ -H ₂ O+H		266.1857
Hpla-Leu-CO+H	a ₂	250.1447
Leu-Choi-fragmento+H		221.1642
Choi imonio+H		140.1066
Argol-fragmento+H		100.0754
Leu-imonio+H		86.0983

Aeruginosina 644 - Hpla-Leu-Choi-AcArgal		
Fragmento	Tipo de íon	<i>m/z</i>
M+H		645.2745
M-H ₂ O+H		627.3509
M-CH ₃ N ₂ +H		585.3354
Choi-AcArgal-NH ₂ +H		311.2078
Choi-AcArgal-NH ₂ -H ₂ O+H		293.193
Choi-AcArgal-CH ₃ NH ₂ -H ₂ O+H		266.188
Hpla-Leu-CO+H	a ₂	250.1432
Leu-Choi-fragmento+H		221.1642
Choi imonio+H		140.1066
Argol-fragmento+H		100.0754
Leu-imonio+H		86.0961

Aeruginosina 646 - Hpla-Leu-Choi-AcArgol		
Fragmento	Tipo de íon	<i>m/z</i>
M+H		647.3744
M-Hpla+H	y ₃	483.3294
Choi-AcArgol-NH ₂ +H		311.0000
Choi-AcArgol-NH ₂ -H ₂ O+H		293.1955
Choi-AcArgol-CH ₃ NH ₂ -H ₂ O+H		266.1880
Hpla-Leu-CO+H	a ₂	250.1432
Leu-Choi-fragmento+H		221.1642
Choi imonio+H		140.1066
Argol-fragmento+H		100.0754
Leu-imonio+H		86.0961

Cianopeptolinas:

Nesta floração de cianobactérias foram detectadas as seguintes variantes cianopeptolina 972 (m/z 973) e 986 (m/z 987). Os íons de m/z 959 e 1072 também são sinais referentes a esta classe de compostos. No entanto na literatura não é reportado a estrutura e a fórmula molecular destas substâncias, sendo somente citados os valores dos sinais de m/z . A TABELA 16 apresenta os fragmentos referentes a elucidação estrutural das cianopeptolinas 972 e 986. Para os íons 959 e 1072 também foram realizados experimentos de MS/MS (apresentados no apêndice deste capítulo), no entanto os mesmos não foram conclusivos para a confirmação das estruturas dos mesmos.

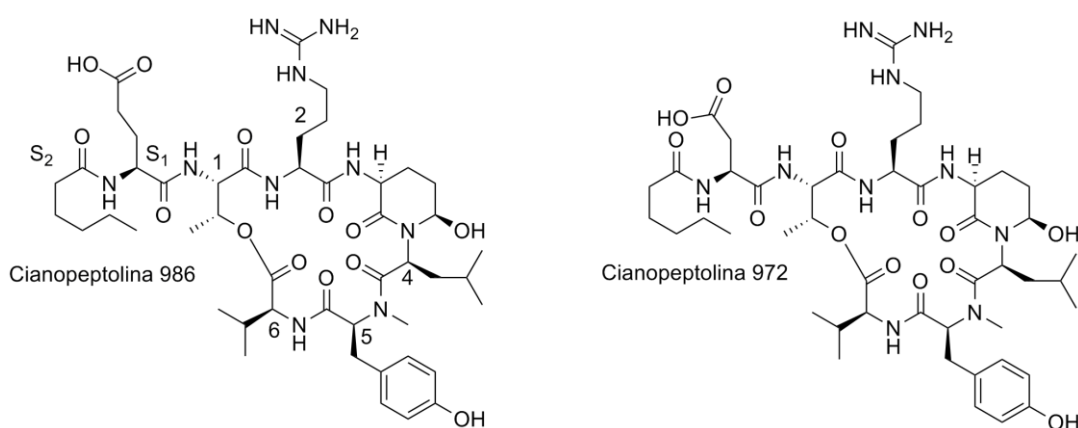


FIGURA 52 - Estruturas das cianopeptolinas identificadas na floração de Americana.

Tabela 17 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-HRMS/MS das cianopeptolinas detectadas e identificadas nesta floração.

Cianopeptolina 972 - [Arg-Ahp-Leu-Val-O- Thr]-Asp-HA	
Fragmento	<i>m/z</i>
M+H	973.5389
Ahp-Leu-H ₂ O	209.1288
(Ahp-Leu)-H ₂ O-CO+H	181.1337
MeTry imonio	150.0916
Leu/Ileu imonio	86.0598
Arg-fragmento	70.0646

Cianopeptolina 986 - [Arg-Ahp-Leu-MeTry-Val-O-Thr]-Glu-HA	
Fragmento	<i>m/z</i>
M+H	987.5593
M-H ₂ O+H	969.5413
M-CO ₂ H+H	941.5457
Arg-Ahp-Leu+Me	400.2255
Ahp-Leu-H ₂ O	209.1294
Leu/Ileu imonio	86.0965
Arg-fragmento	70.0646

Microcistinas:

Nesta floração de cianobactérias foram identificadas quatro variantes de MC's, sendo elas MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-HiIR (HiI-homoisoleucina) . Na TABELA 17 estão representados os sinais de *m/z* referentes os fragmentos obtidos que caracterizam cada variante. A ocorrência concomitante de cianopeptolinas com diferentes variantes de MC's em outras florações de *Microcistis sp.* foram reportadas por outros pesquisadores.

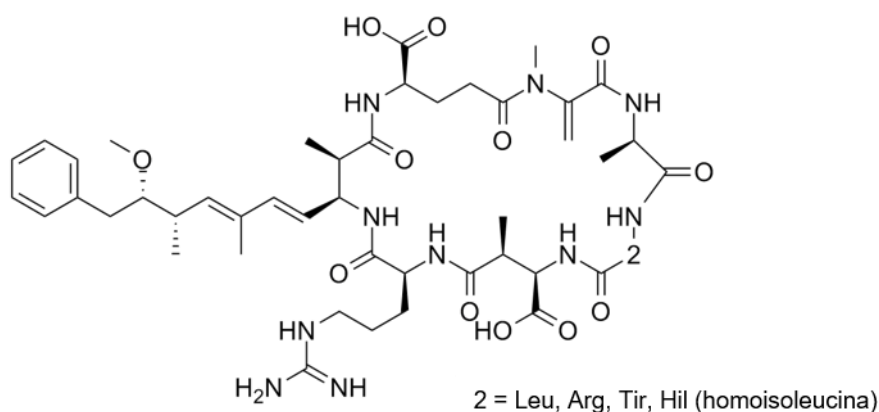


FIGURA 53 - Estrutura das MC's encontradas na floração de Americana.

Tabela 18 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qTOF-HRMS/MS das MC's detectadas e identificadas nesta floração.

MC-LR [Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha]	
Fragmento	m/z
M + H	995.5536
M-fragmento Adda+H	861.4828
Glu-Mdha + H	213.0866
Adda + H	163.1111
Mdha-Ala + H	155.0807
Arg+H	157.1071
Adda cadeia lateral	135.0802
Arg fragmento	112.0853
Leu imonio	86.0954

MC-YR [Ala-Tir-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha]	
fragmento	m/z
M + H	1045.5389
Adda-Glu-Mdha-Ala + H	432.1862
Adda-Glu-Mdha + H	375.1919
(Me)Asp-Arg + H	286.1519
Glu-Mdha + H	213.0869
Arg+H	157.1077
Adda cadeia lateral	135.0803

MC-HilR [Ala-Hile-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha]	
Fragmento	m/z
M + H	1009.5716
Arg-Adda-Glu-Mdha + H	724.4018
(Me)Asp-Arg + H	286.1502
Mdha-Ala-Hil + H	269.1279
Mdha-Ala-Hil-NH ₂ CH ₃ + H	253.0788
Adda+ H	163.1121
Adda cadeia lateral	86.0965

MC-RR [Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha]	
fragmento	m/z
M + H	1045.5389
Adda-Glu-Mdha-Ala + H	432.1862
Adda-Glu-Mdha + H	375.1919
(Me)Asp-Arg + H	286.1519
Glu-Mdha + H	213.0869
Arg+H	157.1077
Adda cadeia lateral	135.0803

Microviridinas:

Na floração de Americana foi identificada a Microviridina 1706, de m/z 1707,75, na literatura há relatos sobre este oligopeptídeo (PEREIRA; PIMENTA; GIANI, 2012), mas sua sequência primária de aminoácidos ainda não foi caracterizada. Foram realizados experimentos de MS/MS para elucidação desta estrutura, no entanto, os mesmos não foram conclusivos, sendo necessários mais experimentos para concluir a estrutura da mesma.

5. Conclusões

Das amostras coletadas da floração de cianobactérias da Represa Salto Grande foram identificadas uma microcistina (MC-HilR), quatro aeruginosinas (298A, 602, 644 e 646), duas cianopeptolinas (959, 972, 986 e 1072), e uma variante de microviridina (1707), identificadas pela primeira vez nesta floração, totalizando dez cianopeptídeos em quatro diferentes classes. Além disto, as microcistinas: MC-LR, MC-YR e MC-RR também foram detectadas, assim como há relatos da presença das mesmas nesta represa. Desta maneira, este capítulo possui contribuição positiva e com relação a informações adicionais sobre os cianopeptídeos produzidos pelas espécies de cianobactérias presentes neste ecossistema aquático.

Apêndice:

Espectros de MS/MS dos cianopeptídeos
identificados na floração de cianobactérias.

Apêndice: Espectros de MS/MS dos cianopeptídeos identificados na floração de cianobactérias.

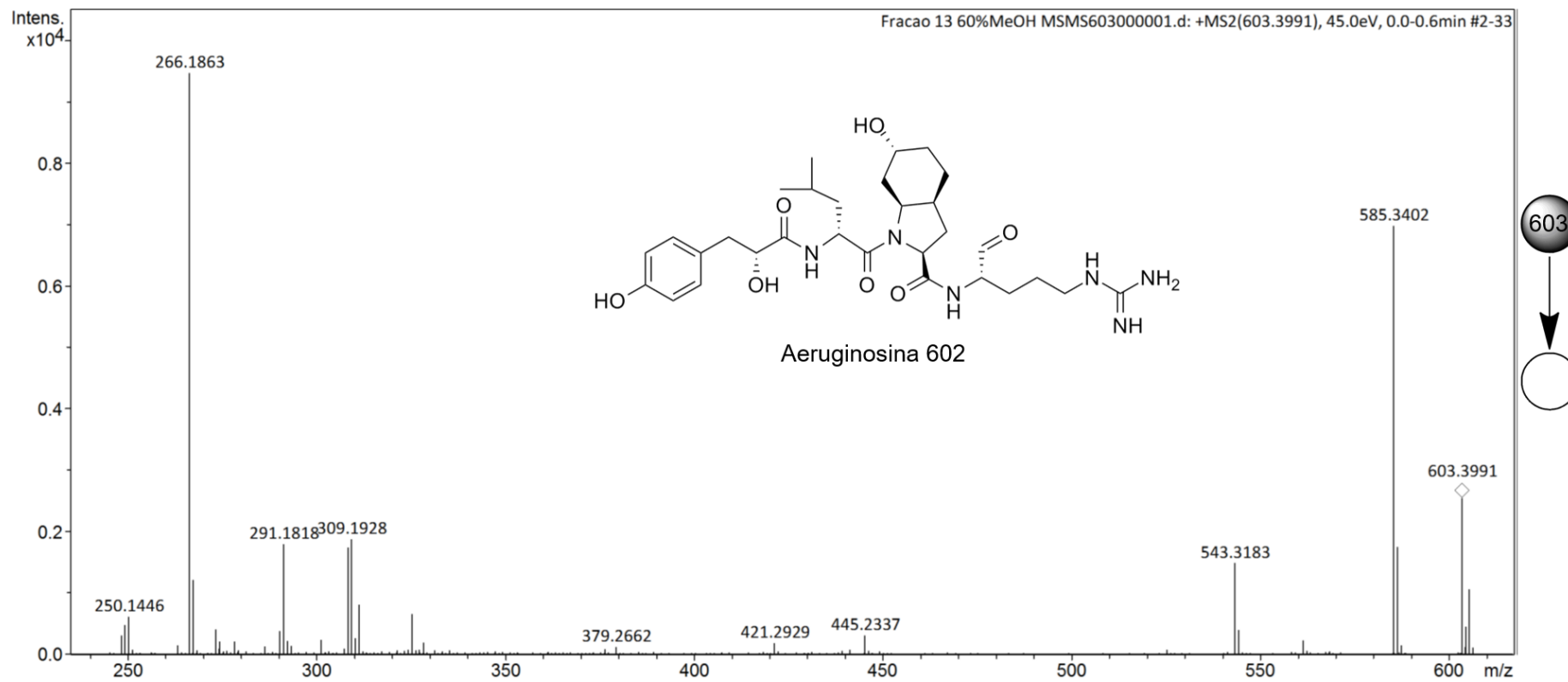
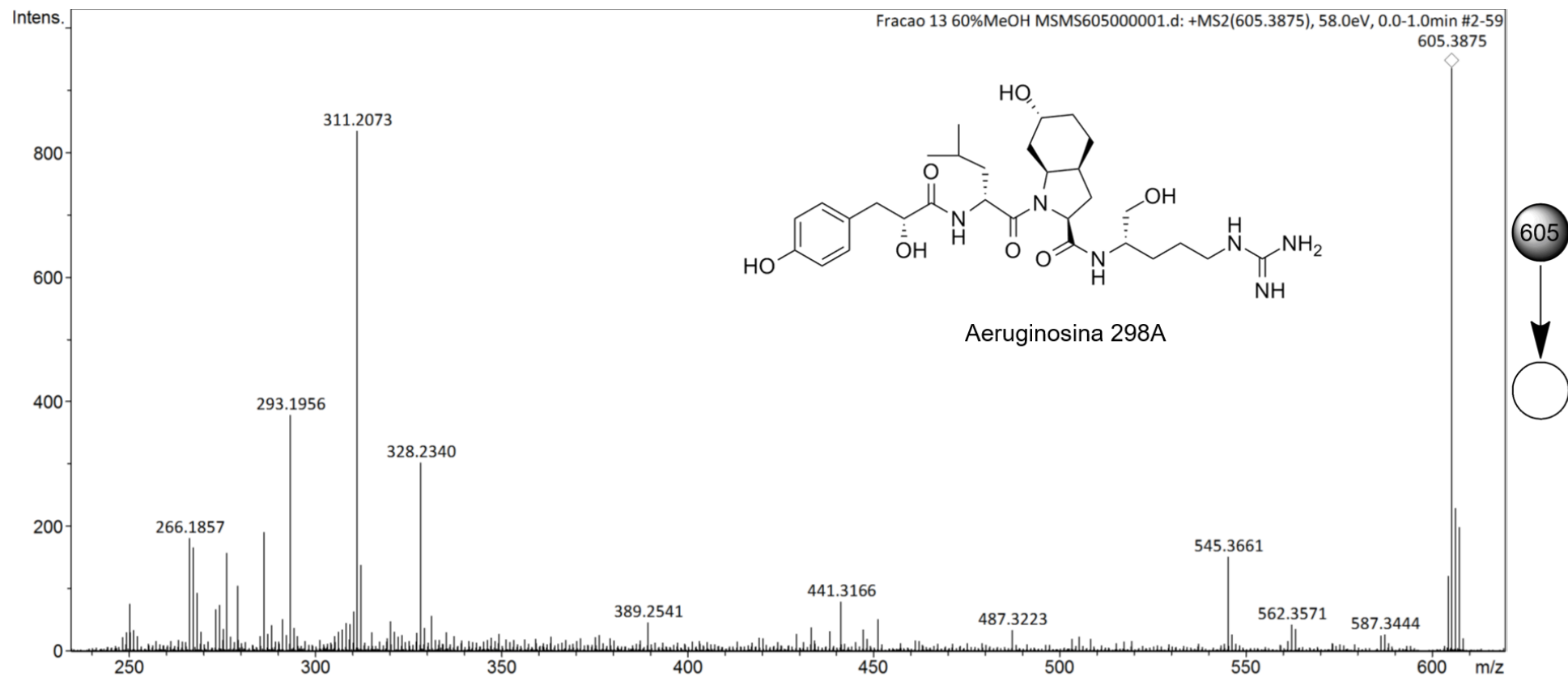


FIGURA 54 - Espectro de MS/MS do íon m/z 603.

FIGURA 55 - Espectro de MS/MS do íon m/z 605.

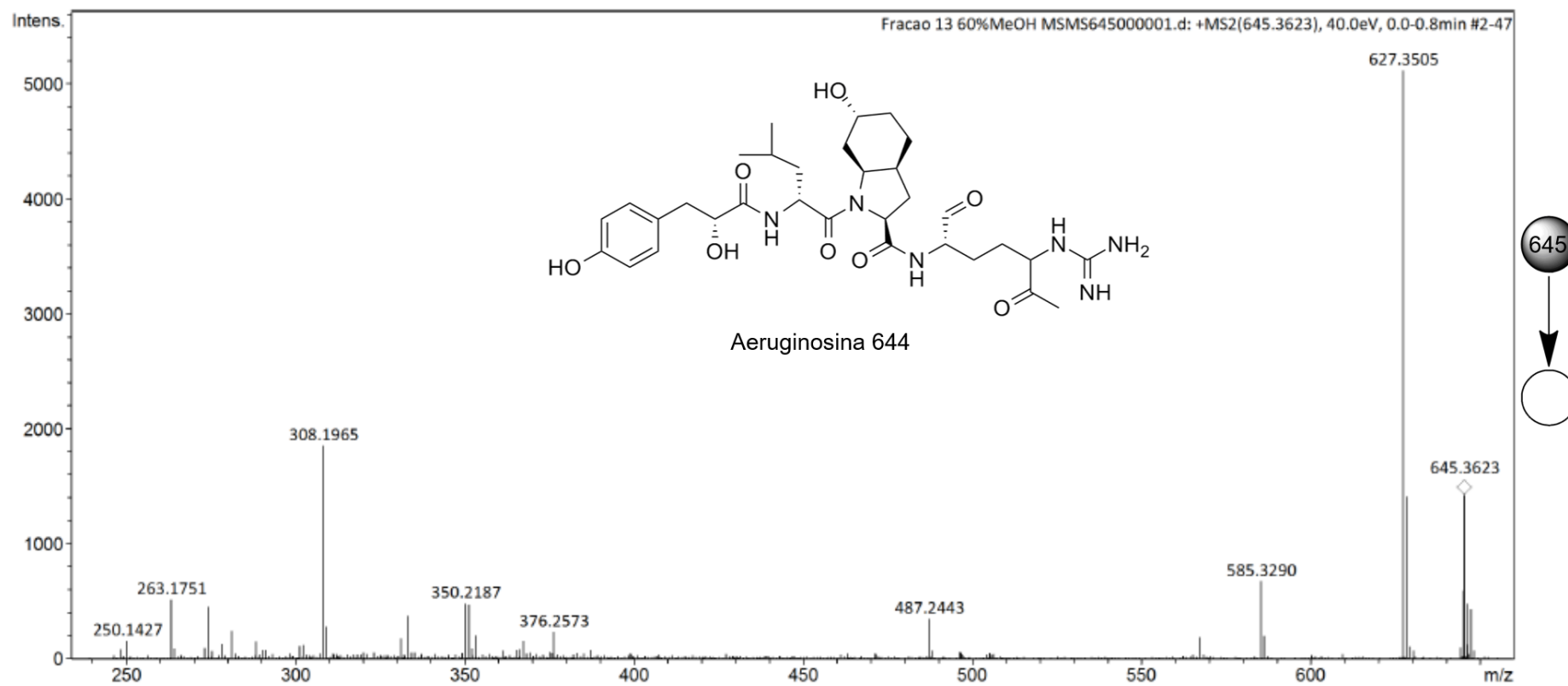
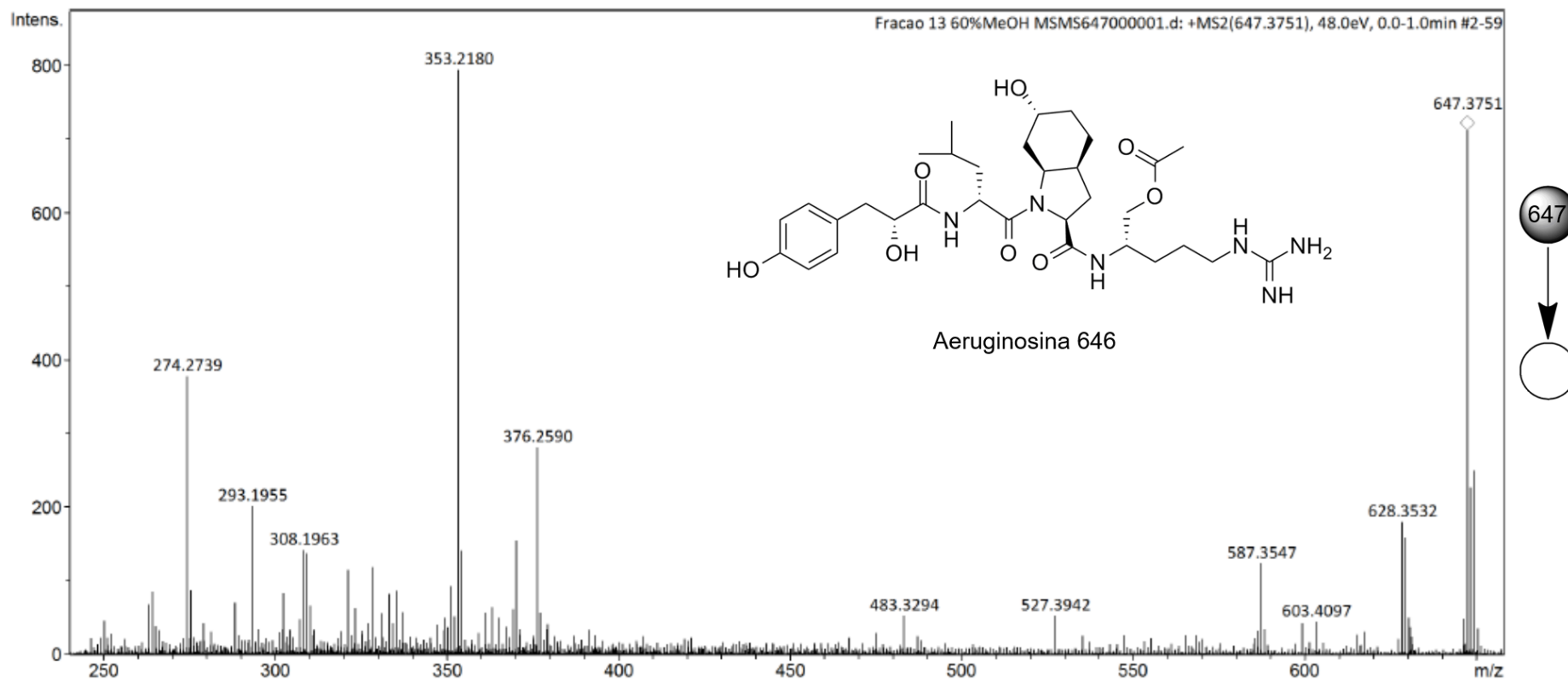
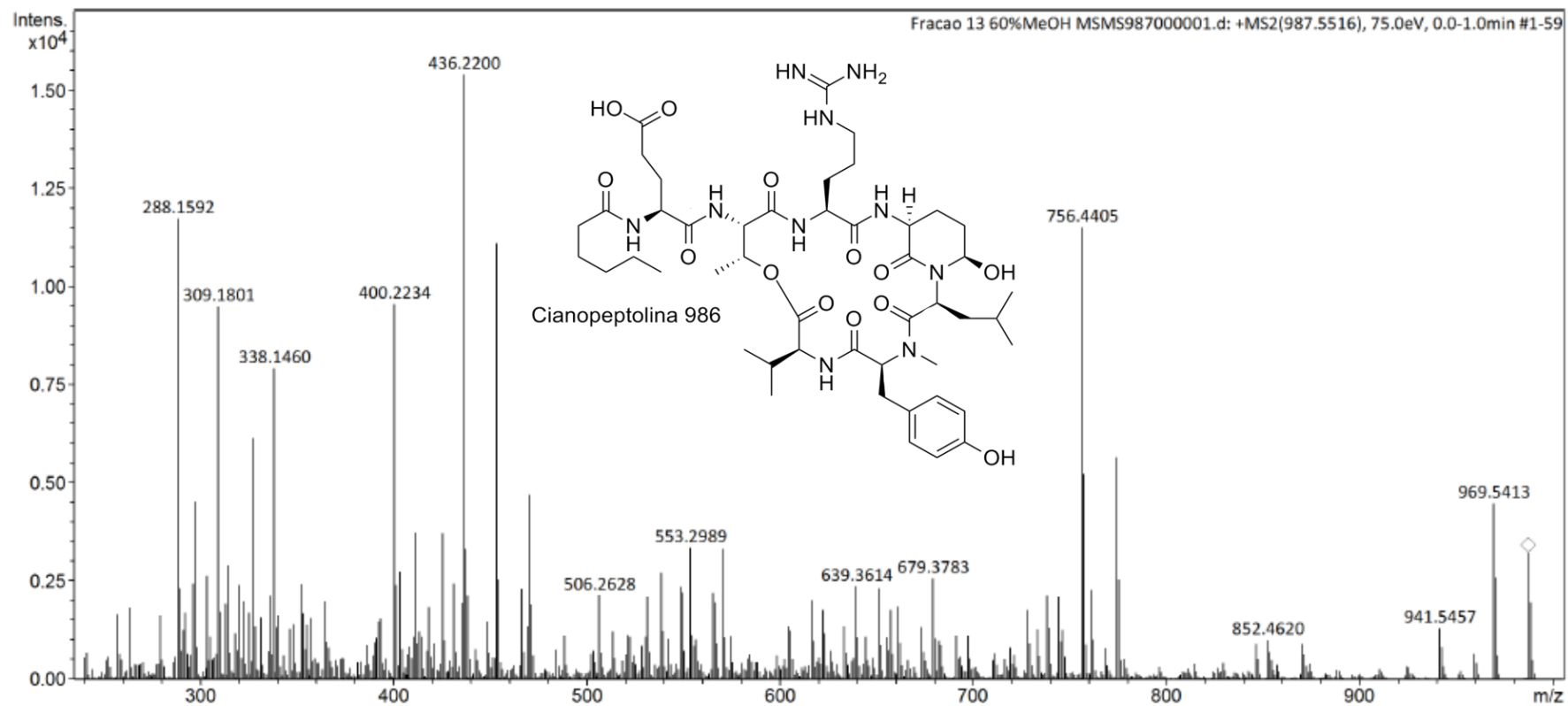
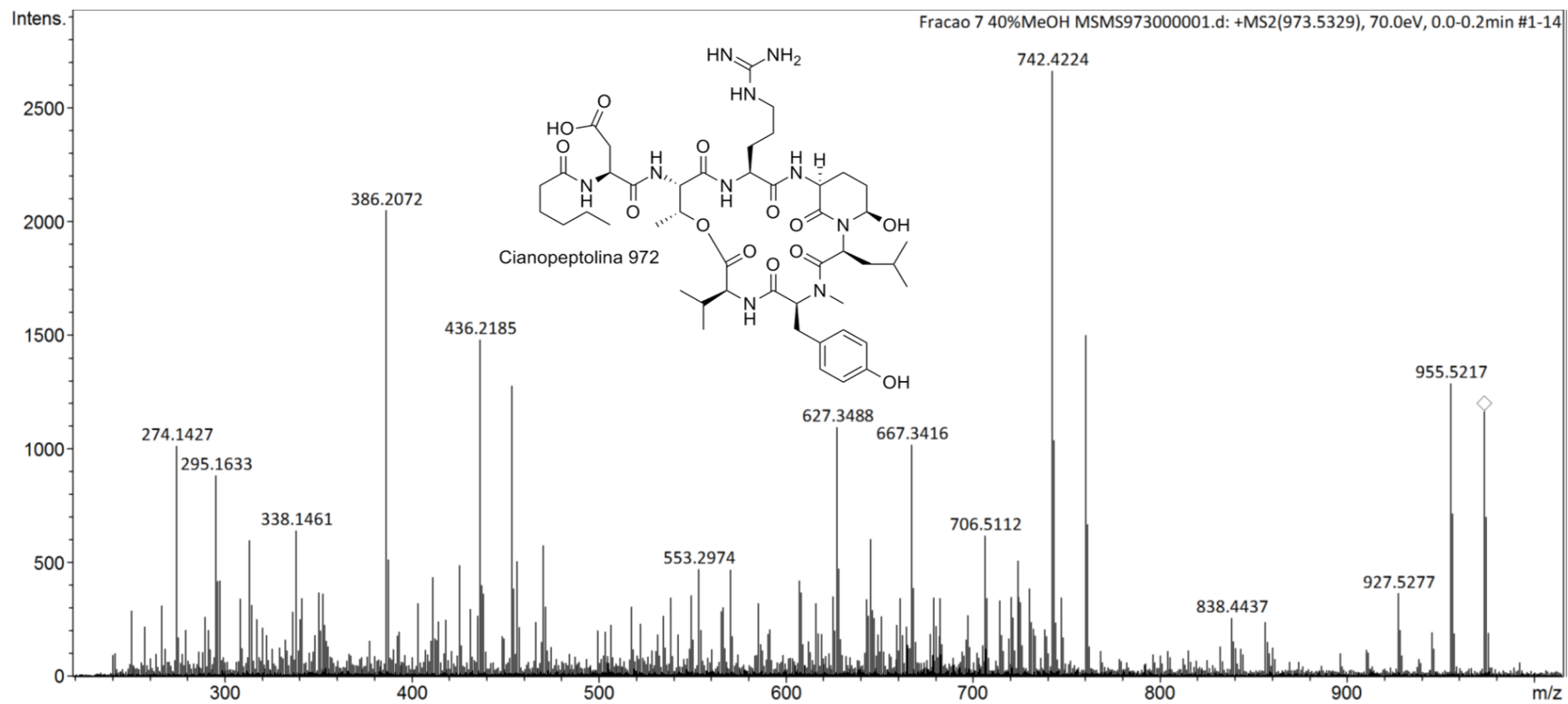
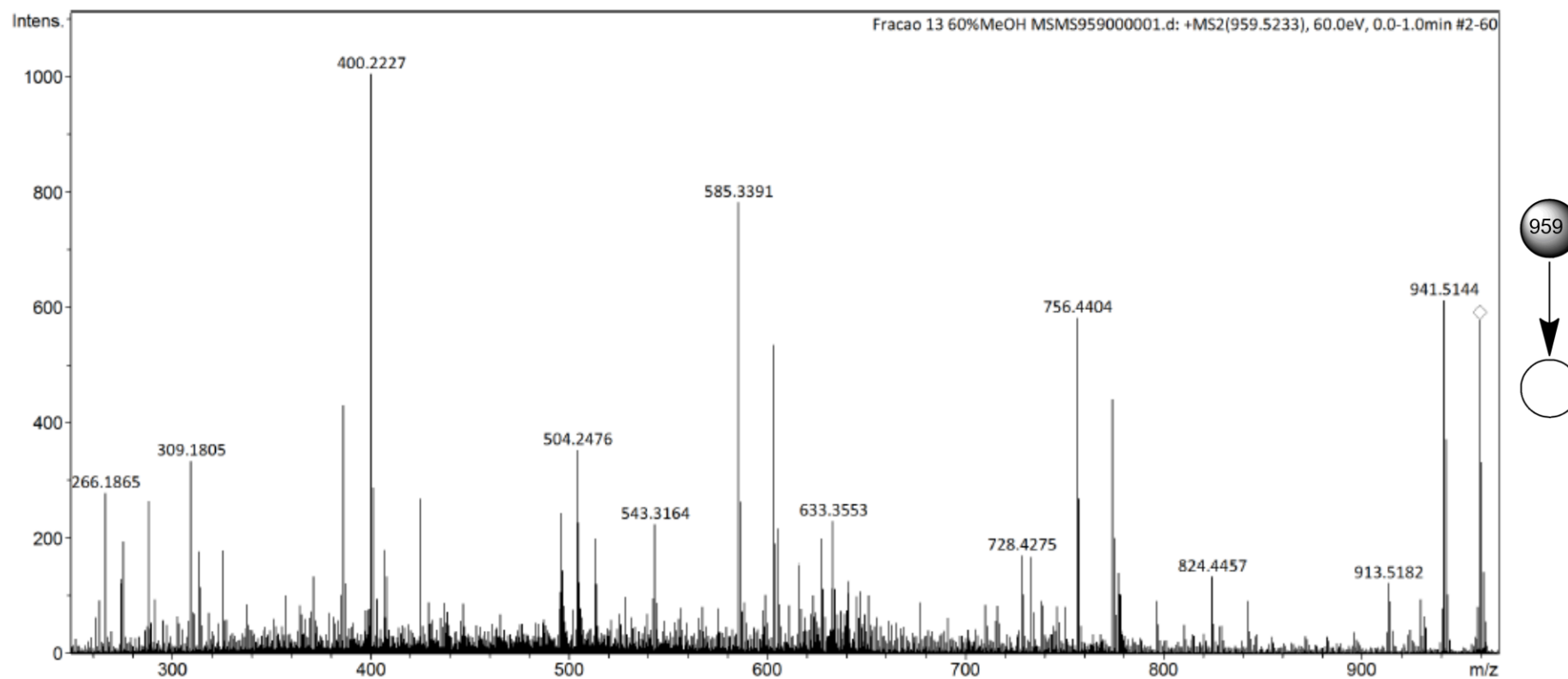


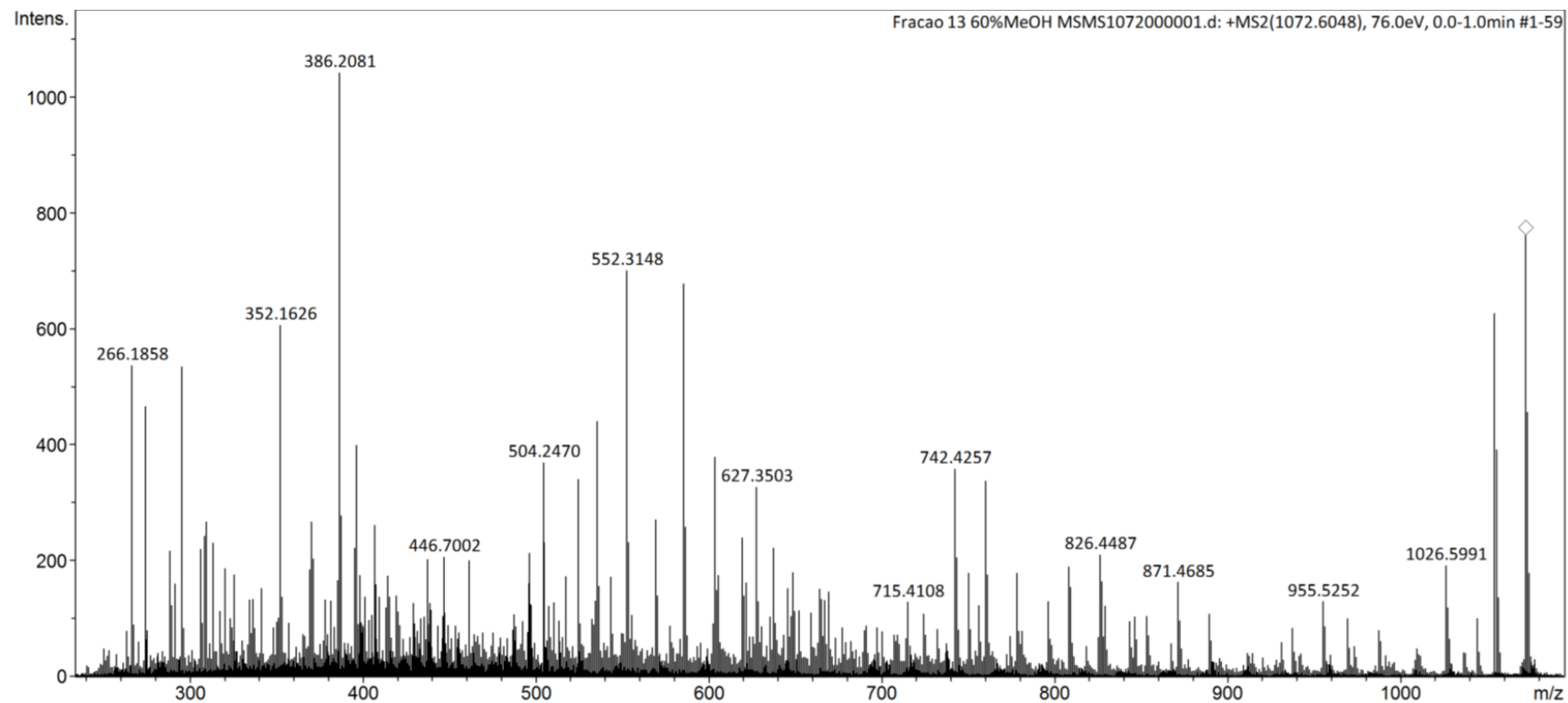
FIGURA 56 - Espectro de MS/MS do íon m/z 645.

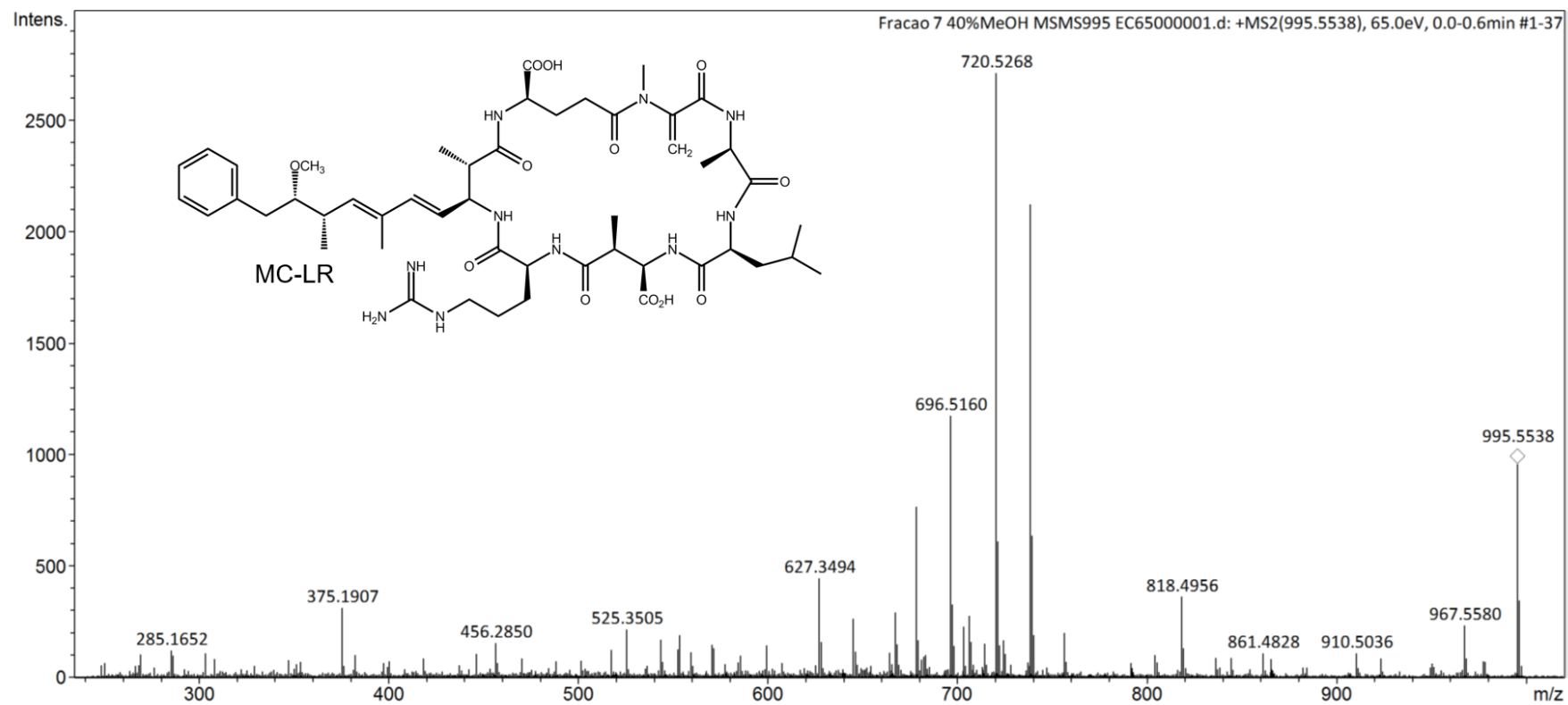
FIGURA 57 - Espectro de MS/MS do íon m/z 647.

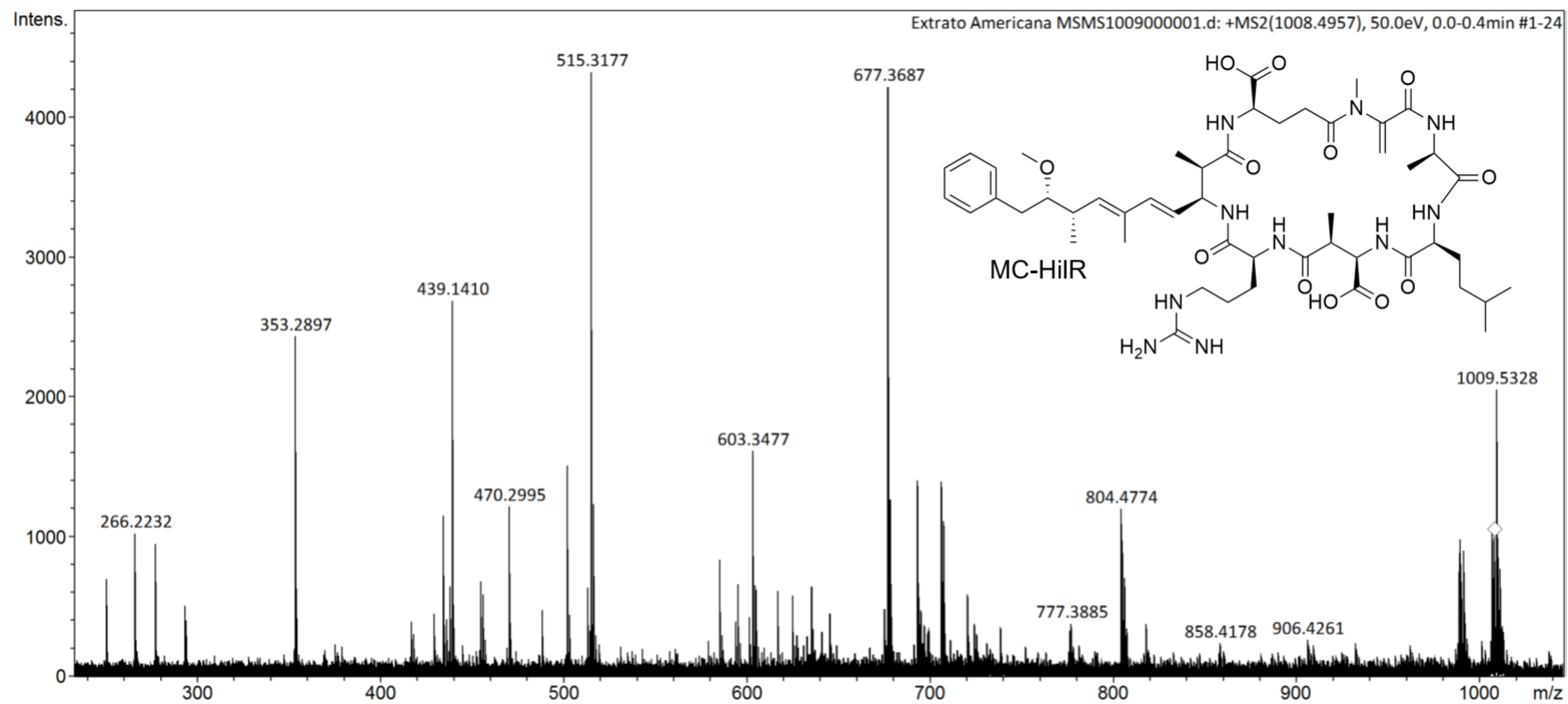
FIGURA 58 - Espectro de MS/MS do íon m/z 987.

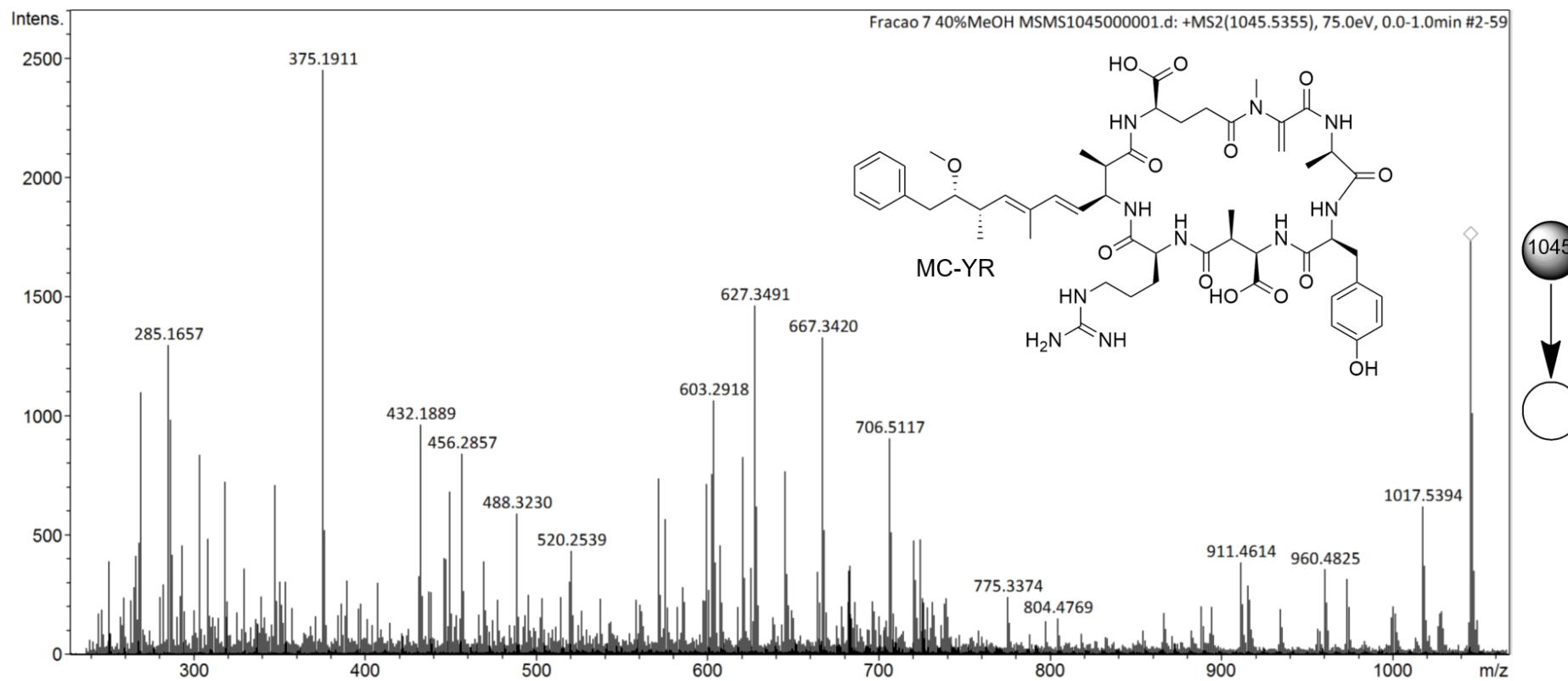
FIGURA 59 - Espectro de MS/MS do íon m/z 973.

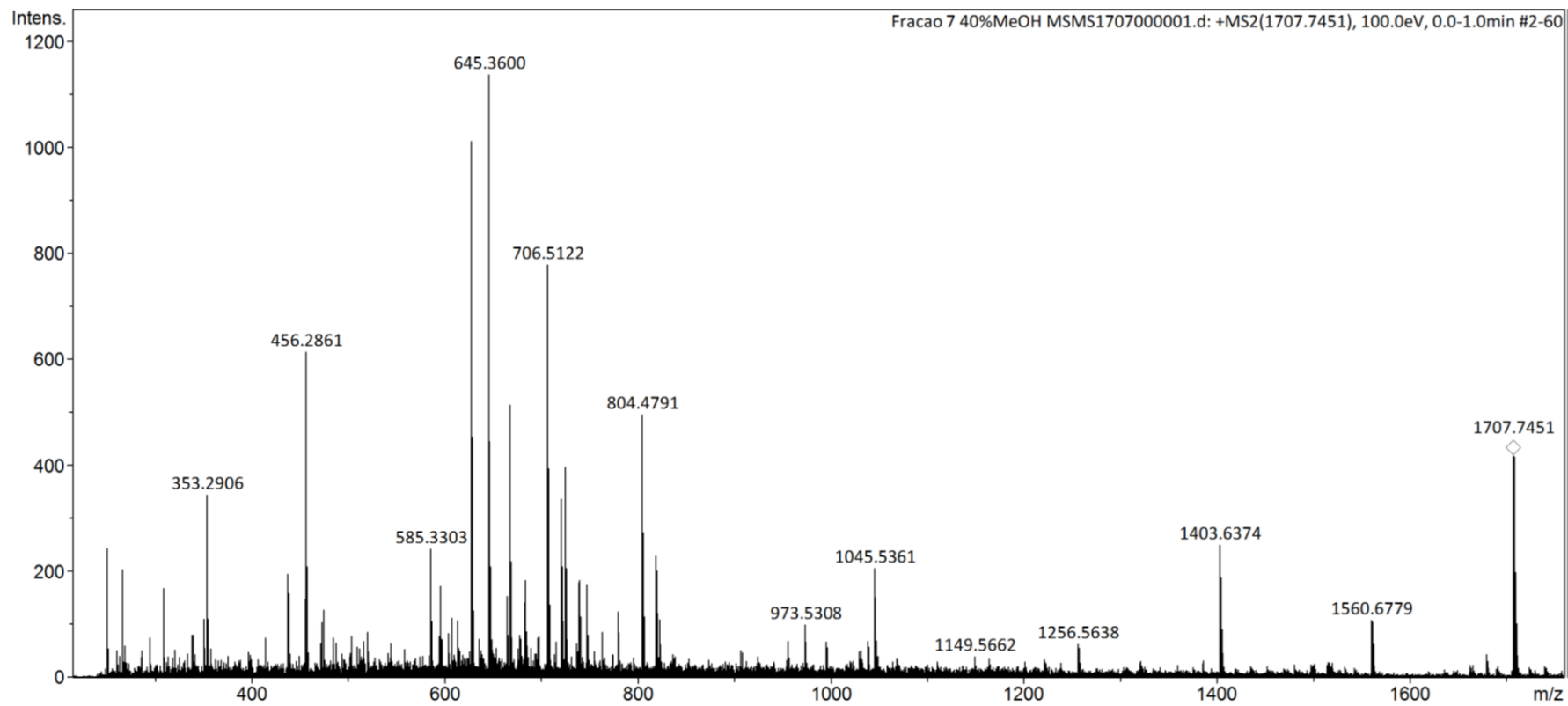
FIGURA 60 - Espectro de MS/MS do íon m/z 959.

FIGURA 61 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1072.

FIGURA 62 - Espectro de MS/MS do íon m/z 995.

FIGURA 63 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1009.

FIGURA 64 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1045.

FIGURA 65 - Espectro de MS/MS do íon m/z 1707.

Referências

- AMERICANA. **Perfil do município-hidrografia**. Disponível em: <http://www.americana.sp.gov.br/v6/americanaV6_index.php?it=38&a=perfil_hidrografia>. Acesso em: 26 maio 2017a.
- AMERICANA. **Perfil do município-economia**. Disponível em: <http://www.americana.sp.gov.br/v6/americanaV6_index.php?it=38&a=perfil_economia>. Acesso em: 26 maio 2017b.
- ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; TANDEAU DE MARSAC, N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 813-828, 2010.
- BAKER, P. D; FABRO, L. D. **A guide to the identification of common blue green algae in Australian freshwaters**. 2nd ed. Albury: Cooperative Research Center of Freshwater Ecology, 2002.
- BENT, S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation - grand rounds at University of California, San Francisco Medical Center. **Journal of General Internal Medicine**, v. 23, p. 854-859, 2008.
- BRYANT, D. A. **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994.
- CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4751-4760, 1997.
- CARMICHAEL, W.W. The cyanotoxins. **Advances in Botanical Research**, v. 27, p. 211-256, 1997.
- CARMICHAEL, W. W.; BOYER, G. L. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: implications for the North American Great Lakes. **Harmful Algae**, v. 54, p. 194-212, 2016.
- CARMICHAEL, W. W. et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 663-668, 2001.
- CARNEIRO, R. L. et al. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, p. 692-702, 2012.
- CARVALHO, G. M. C. et al. Pulmonary and hepatic injury after sub-chronic exposure to sublethal doses of microcystin-LR. **Toxicon**, v. 112, p. 51-58, 2016.
- CASTENHOLZ, R. W. [3] culturing methods for cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 68-93, 1988.

CHRISTEN, V.; ZUCCHI, S.; FENT, K. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. **Aquatic Toxicology**, v. 102, p. 167-176, 2011.

CONG, L. et al. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 569, p. 157-168, 2006.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken: Willey-Interscience, c2207.

DERIKVAND, P.; LLEWELLYN, C. A.; PURTON, S. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds. **European Journal of Phycology**, v. 52, p. 43-56, 2017.

DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 23-43, 2013.

DOLMAN, A. M. et al. Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038757.

DUNCAN, M. W.; RODER, H.; HUNSUCKER, S. W. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 7, p. 355-370, 2008.

FALCONER, I. R. Cyanobacterial ecology. In: _____. **Cyanobacteria-toxins in drinking water supplies**. Boca Raton: CRC Press, 2005a. p. 45-75.

FALCONER, I. R. Toxic cyanobacteria and their identification. In: _____. **Cyanobacteria-toxins in drinking water supplies**. Boca Raton: CRC Press, 2005b. p. 9-23.

FASTNER, J.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis spp.* (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5069-5076, 2001.

FERRANTI, P. et al. Profiling microcystin contamination in a water reservoir by MALDI-TOF and liquid chromatography coupled to Q / TOF tandem mass spectrometry. **FRIN**, v. 54, p. 1321-1330, 2013.

FERREIRA, R. A. R. et al. Monitoramento de fitoplâncton e microcistina no reservatório da Uhe Americana. **Planta Daninha**, v. 23, p. 203-214, 2005.

FESSER, K. **Chemical and biological investigations of vietnamese cyanobacteria**. 2010. 198 f. Dissertation (Doctor an der Mathematisch) - Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt, Universität Greifswald, Greifswald, 2010.

FONSECA, A. M. da. **Cianobactérias e cianotoxinas em áreas recreacionais do reservatório de Salto Grande, Americana – SP**. 2014. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

FRANCIS, G. Poisonous Australian Lake. **Nature**, v. 18, p. 11-12, 1878.

FUKUTA, Y. et al. Enantioselective syntheses and biological studies of aeruginosin 298-A and its analogs: application of catalytic asymmetric phase-transfer reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 5433-5438, 2004.

G1 CAMPINAS E REGIÃO. Estiagem gera “boom” de algas e pato fica com plumagem verde em represa. **G1**, 2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/2014/04/estiagem-gera-boom-de-algas-e-pato-fica-com-plumagem-verde-em-represa.html>>. Acesso em: 30 maio 2017.

GANF, G. G.; OLIVER, R. L. Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of Green Algae by Blue-Green Algae in the plankton of a stratified lake. **The Journal of Ecology**, v. 70, p. 829-844, 1982.

GENUÁRIO, D. B. et al. Cyanobacterial community and microcystin production in a recreational reservoir with constant *Microcystis* blooms. **Hydrobiologia**, v. 779, p. 105-125, 2016.

GREAVES, J.; ROBOZ, J. **Mass spectrometry for the novice**. Boca Rato: CRC Press, 2014.

GUPTA, N. et al. Toxin production in batch cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, p. 339-346, 2001.

HILLENKAMP, F.; PETER-KATALINIC, J. (Ed.) **MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, c2007.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, c2007.

HOSSAIN, M.; LIMBACH, P. A. **Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications**. 2nd ed. Oxford: Wiley, 2010.

HOWARD, K. L.; BOYER, G. L. Quantitative analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 5980-5986, 2007.

IBELINGS, B. W. et al. CYANOCOST special issue on cyanobacterial blooms: synopsis—a critical review of the management options for their prevention, control and mitigation. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 6, p. 595-605, 2016.

ISHIDA, K. et al. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2017-2026, 2009.

JACKSON, P.; ATTALLA, M. I. N-Nitrosopiperazines form at high pH in post-combustion capture solutions containing piperazine: a low-energy collisional behaviour study. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 3567-3577, 2010.

JASKOLLA, T. W.; KARAS, M. Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, p. 976-988, 2011.

JOHNSON, T. J. et al. Producing next-generation biofuels from filamentous cyanobacteria: an economic feasibility analysis. **Algal Research**, v. 20, p. 218-228, 2016.

JUÁREZ-OROPEZA, M. A. et al. Effects of dietary Spirulina on vascular reactivity. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 15-20, 2009.

KARAS, M.; GL, M. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1-12, 2000.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses 10000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 2301, p. 2299-2301, 1988.

KARAS, M.; KRUGER, R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 2, p. 427-440, 2003.

KAUSHIK, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: a review. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 1349-1383, 2013.

KNOCHENMUSS, R.; ZENOBI, R. MALDI Ionization :the role of in-plume processes. **Chemical Reviews**, v.103, n. 2, p. 441-452, 2003.

KOLE, P. L. et al. Cosmetics potential of herbal extracts. **Natural Product Radiance**, v. 4, p. 315-321, 2005.

LAMBERT, T. W. et al. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 753-755, 1994.

LAŠTOVIČKOVÁ, M.; CHMELIK, J.; BOBALOVA, J. The combination of simple MALDI matrices for the improvement of intact glycoproteins and glycans analysis. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 281, p. 82-88, 2009.

LAUGESEN, S.; ROEPSTORFF, P. Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n.9, p. 992-1002, 2003.

LEITE, M. A. **Variação espacial e temporal da taxa de sedimentação no reservatório de Salto Grande (Americana, SP) e sua influência nas características limnológicas do sistema**. 1998, 164f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

LI, W. et al. Determination of microcystin-LR in drinking water using UPLC tandem mass spectrometry-matrix effects and measurement. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 665-670, 2011.

LIFSHITS, M.; CARMELI, S. Metabolites of microcystis aeruginosa bloom material from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 209-219, 2012.

LIMA NETO, F. Grupo quer interdição da represa do Salto Grande. **Todo Dia**, set. 2015. Disponível em:
<http://portal.tododia.uol.com.br/_conteudo/2015/09/cidades/88741-grupo-quer-interdicao-de-represa-do-salto-grande.php>. Acesso em: 31 maio 2017.

LONE, Y.; KOIRI, R. K.; BHIDE, M. An overview of the toxic effect of potential human carcinogen microcystin-LR on testis. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 289-296, 2015.

LYRA, C. et al. Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 555-568, 2005.

MAHAJAN, U.; WASULE, D. Sunscreen and anti-oxidant activities of herbal gel formulations. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, p. 99-101, 2008.

MEREL, S. et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms. **Environmental International**, v. 59, p. 303-327, 2013. Suppl 1.

MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. Characterization of the Nodularin Synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6353-6362, 2004.

NEUMANN, A.-C. et al. Determination of microcystin-LR in surface water by a magnetic bead-based colorimetric immunoassay using antibody-conjugated gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 8, p. 57-63, 2016.

NICOLETTI, M. Microalgae nutraceuticals. **Foods**, v. 5, n. 3, 2016.
doi:10.3390/foods 5030054.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 995-1010, 2013.

PAPAC, D. I.; WONG, A.; JONES, A. J. S. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3215-3223, 1996.

PEREIRA, D. A.; PIMENTA, A. M. C.; GIANI, A. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. **Microbiological Research**, v. 167, p. 413-421, 2012.

PERISSINOTTO, R. et al. Tufa stromatolite ecosystems on the South African south coast. **South African Journal of Science**, v. 110, 2014.
doi:10.1590/sojs.2014/20140011.

POURIA, S. et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, p. 21-26, 1998.

PRAKASH, S.; LAWTON, L. A.; EDWARDS, C. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. **Harmful Algae**, v. 8, p. 377-384, 2009.

PUDDICK, J. et al. Enhanced sample preparation for quantitation of microcystins by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 285-291, 2012.

PUDDICK, J. et al. Structural characterization of new microcystins containing tryptophan and oxidized tryptophan residues. **Marine Drugs**, v. 11, p. 3025-3045, 2013.

QIAN, S. S. et al. Quantifying and reducing uncertainty in estimated microcystin concentrations from the ELISA method. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 14221-14229, 2015.

QUESADA, A. Oligopeptides as biomarkers of cyanobacterial subpopulations. Toward an understanding of their biological role. **Toxins**, v. 6, p. 1929-1950, 2014.

QUINTANA, N. et al. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 471-490, 2011.

RAMOS, C. P. da S. et al. Estudo da presença da toxina microcistina na água de reservatório de Mundaú (Garanhuns-PE) pelas metodologias ELISA e CLAE. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, p. 169-177, 2000.

RANTALA, A. et al. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 568-573, 2004.

REED, R. H. et al. Osmotic adjustment in Cyanobacteria from hypersaline environments. **Archives of Microbiology**, v. 138, p. 333-337, 1984.

RISHWORTH, G. M. et al. Peritidal stromatolites at the convergence of groundwater seepage and marine incursion: patterns of salinity, temperature and nutrient variability. **Journal of Marine Systems**, v. 167, p. 68-77, 2017.

ROHRLACK, T.; CHRISTIANSEN, G.; KURMAYER, R. Putative antiparasite defensive system involving ribosomal and nonribosomal oligopeptides in cyanobacteria of the genus planktothrix. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 2642-2647, 2013.

RUNNEGAR, M. T.; FALCONER, I. R.; SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 317, p. 268-272, 1981.

RZYMSKI, P.; PONIEDZIAŁEK, B. Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (Cyanobacteria). **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 29, p. 47-50, 2012.

SANDONATO, B. B. **Peptídeos cíclicos hepatotóxicos: MALDI-TOF como uma ferramenta analítica**. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

SANDONATO, B. B. et al. MALDI imaging mass spectrometry of fresh water cyanobacteria: spatial distribution of toxins and other metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 521-528, 2017.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias plânticas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006.

SANT'ANNA, C. L. et al. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 1-15, 2007.

SARMA, T. A. Cyanobacterial toxins. In: _____. **Handbook of Cyanobacteria**. Boca Raton: CRC Press, c2013. p. 487-606.

SCHWABE, W. et al. Plasmids in toxic and nontoxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Current Microbiology**, v. 17, p. 133-137, 1988.

SHIH, C.-J. et al. Bringing microbial interactions to light using imaging mass spectrometry. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 739-755, 2014.

SILVA, G. S. da; JARDIM, W. F. Aplicação do método da carga máxima total diária (CMDT) para a amônia no rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia - SP. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 160-168, 2007.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking water health advisory for the cyanobacterial microcystin toxins**. Washington, DC, 2015.

VAMOS salvar a represa Salto Grande.[Americana]. Disponível em: <<https://www.facebook.com/VamosSalvarAREpresa/>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

VASAS, G. et al. Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 66, p. 87-97, 2006.

VIDÉ, J. et al. Assessment of potential toxicological aspects of dietary exposure to silicon-rich spirulina in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 108-113, 2015.

WEHR, J. D. et al. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5069-5076, 2001.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 530-563, 2006.

WELKER, M. et al. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (Cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2090-2103, 2006.

WESTRICK, J. A. et al. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1705-1714, 2010.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000.

YANG, F. et al. Biodegradation of microcystin-LR and-RR by a novel microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu. **Biodegradation**, v. 25, p. 447-457, 2014.

YOSHIMURA, Y. et al. Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 200-211, 2016.

ŽEGURA, B.; ŠTRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutation Research: Reviews in Mutation Research**, v. 727, p. 16-41, 2011.

ZHAO, C. et al. Physicochemical and engineering aspects a non-enzymatic electrochemical immunosensor for microcystin-LR rapid detection based on Ag @ MSN nanoparticles. **Colloids and Surfaces A**, v. 490, p. 336-342, 2016.