

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 30/06/2018.

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

Luizete, Milena Fontes
L952a 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

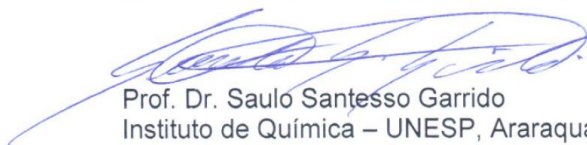
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

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 ciano-peptídeos, 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 ciano-peptídeos 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 ciano-peptítolinas (972 e 986), e uma variante de microviridina (1707).

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

Abstract

In this work, the technique *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry* (MALDI-MS) were used in different application for analysis of peptides produces 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 exemple 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 cianopectídeos.	67
FIGURA 23 - Amino ácidos e resíduos de aminoácidos não usuais presentes nas estruturas dos cianopectídeos.	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 Cianopectolina 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 cianopectídeos 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>Microcystis</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-qQTOF-MS/MS das aeruginosinas detectadas e identificadas nesta floração.	115
Tabela 17 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qQTOF-HRMS/MS das cianopeptolinas detectadas e identificadas nesta floração.	117
Tabela 18 - Fragmentações obtidas nos espectros de MS/MS gerados pelas análises por ESI-qQTOF-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 dihidroxibenzóico
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. Cianopectídeos	65
1.1.1. Aeruginosinas.....	70
1.1.2. Cianopectolinas.....	70
1.1.3. Microviridinas	71
1.1.4. Nodularinas e Microcistinas.....	72
1.1.5. Cianopectídeos 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 cianopectídeos 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 cianopectídeos 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).

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, 2007.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

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. **Enviromental 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. **Analitical 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 planctônicas 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.