

## Caracterização de microcistinas de cepas brasileiras de *Microcystis* por ESI-MS/MS

Rodolpho Braga<sup>1</sup> (PG)<sup>1</sup>, Fabyana Maria dos Anjos (PG)<sup>1</sup>, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (PQ)<sup>2</sup>, Paula Kujbida (PG)<sup>1</sup>, Diogo Oliveira Silva (PQ)<sup>1</sup>, Pio Colepicolo (PQ)<sup>3</sup>, Ernani Pinto (PQ)<sup>1</sup>. [rcbraga@gmail.com](mailto:rcbraga@gmail.com).

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo-SP, Brazil. <sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Ciências Biológicas, Piracicaba-SP, Brazil. <sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, São Paulo-SP, Brazil.

Palavras Chave: Microcistinas; ESI-MS/MS; *Microcystis*.

### Introdução

A determinação e identificação de microcistinas (MC) de cepas de cianobactérias e também de florações algais é um grande desafio, pois há uma grande variedade de análogos e baixa concentração. As MC possuem um esqueleto básico como o apresentado na Figura 1 e sua estrutura geral é ciclo(*D*-Ala-*L*-R<sub>1</sub>-*D*-R<sub>2</sub>Asp-*L*-R<sub>3</sub>-Adda-*D*-Glu-*N*-metil-dihidro-Ala)<sup>1</sup>. 5 aminoácidos normalmente não variam (Adda, Glu, Mdha, Ala e MeAsp). As principais mudanças ocorrem na posição R<sub>1</sub> e/ou R<sub>3</sub>, as quais podem apresentar qualquer aminoácido. Cerca de 70 variantes já foram descritas<sup>2</sup>. Em razão de sua alta sensibilidade e possibilidade de acoplamento com HPLC a espectrometria de massas em “tandem” oferece contribuição significativa na identificação e elucidação estrutural de MC.

Nesse trabalho 4 MC foram isoladas e identificadas de 9 cepas brasileiras de *Microcystis sp.* por RP-HPLC, usando uma coluna C<sub>18</sub> e eluição com uma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O. As toxinas foram identificadas como as variantes MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA por ESI-MS/MS. É importante salientar que algumas dessas variantes não tinham sido reportadas nessas espécies de *Microcystis*.

### Resultados e Discussão

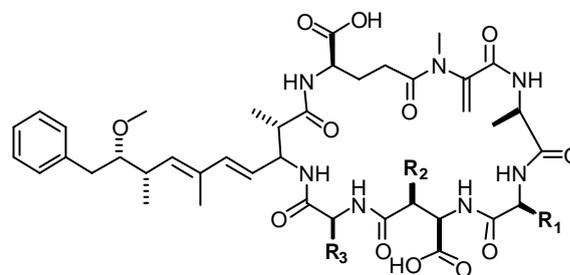
Em razão da alta polaridade das MC foi empregado um método simples e eficiente para sua purificação, usando extração MeOH/H<sub>2</sub>O (3:1), cromatografia de coluna em sílica e HPLC semi-preparativo. As cepas estudadas por HPLC-DAD apresentaram picos com espectro no UV-VIS semelhante ao padrão de MC-LR ( $\lambda_{\max} = 238\text{nm}$ ). Esses picos foram coletados e posteriormente analisados por ESI-MS/MS. As amostras foram ressuspendidas em uma solução de 50% (v/v) MeCN contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico e infundidas no espectrômetro de massas Quattro Micro (Waters®), electrospray modo positivo, com potencial de 30V no cone. Espectros no modo “full scan” e “product ion scan” foram obtidos para massas entre 450 a 550 Da e 900 a 1100 Da.

30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

As estruturas foram identificadas com base no seu perfil de fragmentação, dados já publicados em literatura<sup>2</sup> e em comparação com o padrão de MC-LR.

**Tabela 1.** MCs encontradas em cepas brasileiras de *Microcystis sp.*

Cepas de <i>Microcystis</i>	MC Encontradas
255	n.d.
232	MC-YR
155	n.d.
235	MC-LR
NPLS-1	n.d.
NPLJ-4	MC-LA
NPLJ-47	MC-RR
NPJB-1	MC-LR
BCCUSP 100	MC-LR



**Figura 1.** Estrutura geral das MC. Onde R<sub>1</sub> e R<sub>3</sub> podem ser qualquer aminoácido e R<sub>2</sub> = H ou Me.

### Conclusões

Quatro diferentes MC foram separadas e purificadas em HPLC em fase reversa. Suas estruturas foram elucidadas por ESI-MS/MS. As toxinas foram identificadas como as variantes MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA, sendo que algumas dessas variantes não tinham sido reportadas nessas espécies de *Microcystis*.

### Agradecimentos

Agradecemos à instituição FAPESP, CAPES e CNPq pela ajuda financeira.

<sup>1</sup>Spoof et al., J. Chromatogr. **2001**, 909, 225.

<sup>2</sup>Frias et al., BBRC, **2006**, 344, 741.