

Determinação das Hepatotoxinas produzidas pela cepa de *Microcystis* spp. por LC-ESI-MS/MS

Juliana Feijó de S. Daniel^{1*} (PQ), Emília Kiyomi Kuroda² (PQ), Maria Ângela T. Adorno² (PQ), Edson Rodrigues Filho¹ (PQ), Luiz Di Bernardo² (PQ)

¹Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos – LABIOMMI, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, cep 13.565-905, São Carlos-SP, Brasil. ²Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400 CEP 13566-590, São Carlos-SP. e-mail: julianafeijo@dq.ufscar.br

Palavras Chave: microcistinas, espectrometria de massas, hepatotoxina.

Introdução

Microcistinas são hepatotoxinas produzidas por cianobactérias¹. Essas toxinas são responsáveis por graves problemas hepáticos, podendo causar a morte de animais e seres humanos.² A estrutura geral das microcistinas foi determinada como um heptapeptídeo monocíclico. A diferença estrutural das mais de 60 já descritas, consiste na variação de um dos L-aminoácidos.³ Este estudo visa à procura de uma metodologia eficaz, rápida e segura de determinação das microcistinas presentes na cepa de *Microcystis* spp. por LC-ESI-MS/MS. A cepa foi coletada da lagoa Jacarepaguá-RJ, cujo inóculo foi fornecido pelo Labor. de Ecofis. e Toxicol. de Cianobactérias do Inst. de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ.

Resultados e Discussão

As cepas foram cultivadas em meio ASM-1, temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa da ordem de 55 ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Após 15 a 20 dias da inoculação, as culturas foram concentradas e o material extraído com metanol. O isolamento das microcistinas foi realizado por HPLC preparativa usando coluna C-18. Em seguida, o material foi purificado em cartucho C-18, e submetida à análise de LC-ESI-MS/MS. As análises por LC/MS foram realizadas em coluna ODS, utilizando como solvente H_2O e CH_3CN (ambos com 0,1% de TFA), e volume de injeção de 70 μL . As análises foram monitoradas 200-460 nm.

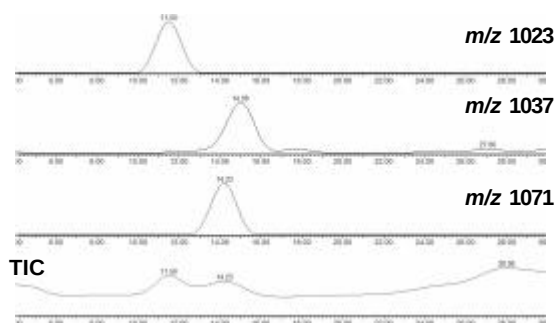


Figura 1: Cromatograma de íons selecionados e TIC das microcistinas presentes na cepa de *Microcystis* spp.

Através desta metodologia foram detectados três microcistinas (**Figura 1**), sendo os picos monitorados por UV. Os íons foram fragmentados

por CID (45 eV; **Figura 2**). A **tabela 1** mostra alguns íons característicos das microcistinas.⁴

Tabela 1: Principais assinalamentos de massas.

	MC-1	MC-2	[Leu ¹]MC-LR
$[M + H]^+$	1071	1023	1037
MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mda + 2H	-	-	925
Leu-Leu	-	226	-
PhCH ₂ CH(OCH ₃)	135	-	135

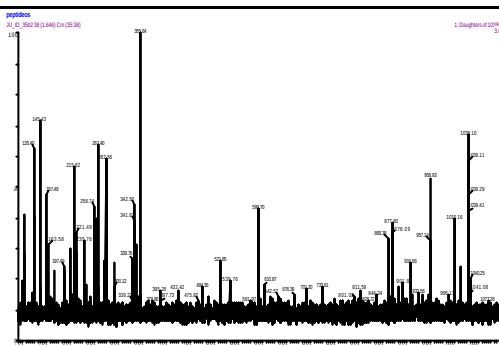
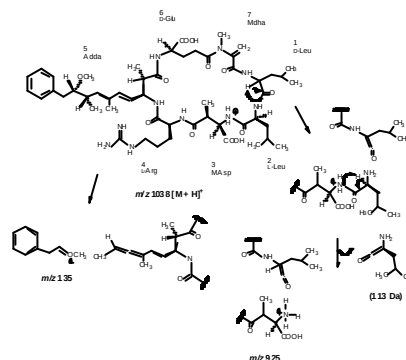


Figura 2: Íons produtos obtidos por CID do íon precursor m/z 1037.



Esquema 1: Proposta de fragmentação para geração dos íons m/z 135 e m/z 925.

Conclusões

A metodologia empregada mostrou-se eficiente, sensível e rápida fornecendo a caracterização das microcistinas presentes na cepa estudada.

Agradecimentos

FAPESP e CNPQ, CAPES

¹ Carmichael, W. W.; *J. Appl. Bact.* **1992**, 445.

² Falconer, I. R.; Bucklery, T. H; *Med. J. Aust.* **1989**, 150.

³ Harada K. I.; Murata, H.; Qiang, Z.; Suzuki, M. et al. *Toxicon*. 1996, 34, 701.

⁴ Namikoshi, M.; Rinehart, K. L.; Sakai, R.; Stotts, R. R.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R. et al. *J. Org. Chem.* 1992, 57, 866-872.