

Análise de Cianotoxinas por MALDI- TLC-MS

Guilherme A. M. Caes (IC), Marina F. Giubbina (IC), Janine M. Bellincanta (IC),
Cíntia D. F. Milagre (PQ), Humberto M. S. Milagre (PQ)*

hmilagre@rc.unesp.br

Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Rio Claro, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP.

Palavras Chave: Espectrometria de Massas, Cromatografia, MALDI-TOF, Cianobactérias, Microcistinas.

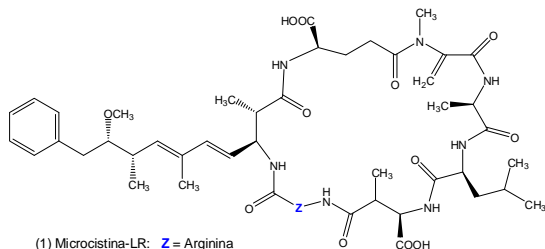
Introdução

A cromatografia em camada delgada (TLC – Thin Layer Chromatography) é a mais simples e econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual de componentes de uma mistura. Porém a identificação inequívoca dos compostos não é possível pelos métodos tradicionais de revelação e comparação com padrões de referência.¹ Neste contexto, a combinação da Espectrometria de Massas (MS) com a TLC surge como uma alternativa interessante e promissora para a identificação e elucidação estrutural de compostos de misturas complexas.

O objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar microcistinas utilizando a técnica MALDI-TLC-MS. As microcistinas são um grupo de heptapeptídeos hepatotóxicos produzidos durante as florações de cianobactérias e representam um problema de saúde pública.

Resultados e Discussão

Inicialmente, foram analisados padrões comerciais das microcistinas LR, LA e LY (Figura 1) por TLC: cromatoplasmas com filme de sílica gel 60F₂₅₄ sobre suporte de alumínio eluidas em água/acetato de etila/n-propanol (1/5/3) e 5% de ácido acético.



(1) Microcistina-LR: Z = Arginina

(2) Microcistina-LA: Z = Alanina

(3) Microcistina-LY: Z = Tirosina

Figura 1. Estruturas das microcistinas LR (1), LA (2) e LY (3).

As cromatoplasmas foram reveladas em *p*-anisaldeído, MnCl₂, ácido sulfúrico, ácido fosfomolibdico, vapores de iodo e luz UV em 264 e 365 nm. A luz UV em 365 nm e o *p*-anisaldeído permitiram a visualização dos padrões de microcistinas com R_f = 0,55, 0,86 e 0,66 para 1, 2 e 3^ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

3, respectivamente. As cromatoplasmas reveladas sob a luz UV foram adaptadas a uma placa de MALDI DIOS (Figura 2) e analisadas por MALDI-TOF utilizando-se como matriz o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.



Figura 2. A) Placa de TLC adaptada a uma placa de MALDI DIOS. B) Placa de MALDI convencional de 96 spots.

Todas as microcistinas foram detectadas: microcistina LR ([M + H]⁺ *m/z* 995,56), LA ([M + Na]⁺ *m/z* 932,46, [M + K]⁺ *m/z* 948,45) e LY ([M + H]⁺ *m/z* 1002,56 [M + Na]⁺ *m/z* 1024,53, [M + K]⁺ *m/z* 1041,26). Em seguida foram analisadas diferentes amostras de água da Represa Billings (São Paulo) fornecidas da pela CETESB.

Em duas amostras foram identificadas a microcistina LR (MC-LR). Em apenas uma amostra foi possível detectar a MC-LR por TLC. Entretanto, mesmo para a amostra menos concentrada foi possível realizar a identificação da MC-LR por MALDI-TOF utilizando-se o valor de R_f da amostra padrão como referência. Assim, comprovamos que a técnica é eficiente, pois mesmo em concentrações abaixo do limite de detecção da TLC é possível empregar a técnica MALDI-TLC-MS para a detecção e identificação dos compostos.

Conclusões

A técnica MALDI-TLC-MS mostrou-se eficiente e reprodutível para a identificação e caracterização das microcistinas LR, LA e LY em amostra padrão e na análise de amostras ambientais.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq, PROPE-UNESP e CETESB

¹ Lopes, J. L. C. Em *Introdução a Métodos Cromatográficos*; Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; eds, Editora da Unicamp, 7 ed. 1997. cap. 3.