

Detecção de Microcistinas e Nodularinas Diretamente das Células de Cianobactérias por MALDI-TOF-MS

Marina F. Giubbina (IC), Humberto M.S. Milagre (PQ)*

hmilagre@rc.unesp.br

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

Introdução

As Cianobactérias pertencentes aos gêneros *Microcystis* e *Nodularia* produzem peptídeos cíclicos como as microcistinas (MC) e nodularinas (Nod). Estes metabólitos secundários são responsáveis por episódios de mortes de animais e seres humanos devido à sua alta toxicidade e presença em ambientes aquáticos espalhados pelo mundo.¹ Neste contexto, este trabalho teve como objetivo contribuir com o desenvolvimento de método rápido e sensível para a identificação e caracterização de MC e Nod diretamente das células de cianobactérias por MALDI-TOF-MS.

Resultados e Discussão

As espécies de cianobactérias *Microcystis aeruginosa* PCC7820 e *Nodularia harveyana* PCC 7804 foram cultivadas e analisadas por MALDI-TOF-MS (Micromass®, Manchester, UK), a fim de detectar e identificar a produção de cianotoxinas. As amostras biológicas foram aplicadas diretamente na placa de MALDI seguido por adição da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico os espectros foram adquiridos no modo positivo e reflectron. As culturas microbianas foram monitorados por 30 dias. Após sete dias de cultivo de *M. aeruginosa* foram identificados três íons referentes as microcistinas MC-LR [$M + H^+$] de m/z 995, D-Asp-MC-LR [$M + H^+$] de m/z 981 e ADMAAdda-MC -LR [$M + K^+$] de m/z 1061, **Figura 1**. As atribuições das microcistinas foram confirmadas por ESI(+)-MS/MS utilizando-se o equipamento SYNAPT G1 HDMS.

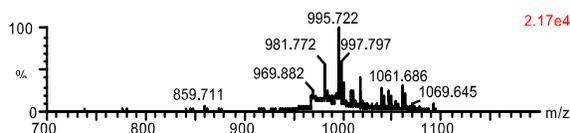


Figura 1: Espectros de MALDI-TOF-MS, no modo positivo, para a cultura de *Microcystis aeruginosa*.

Para comparar a eficiência do método, comparamos a análise diretamente da célula com a análise do extrato celular, para isto a cultura foi centrifugada e o sobrenadante analisado. Somente a MC-LR foi detectada no sobrenadante em pequena intensidade. Posteriormente o centrifugado foi analisado e as três microcistinas foram detectadas.

Após serem centrifugadas as células foram liofilizadas e sonicadas em metanol, o solvente foi

evaporado e o extrato analisado. Os espectros obtidos da análise diretamente das células (**Figura 1**) de microcistinas e do extrato celular (**Figura 2**) são similares, sendo as três microcistinas identificadas.

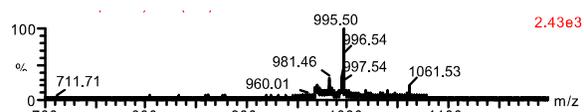


Figura 2: Espectros de MALDI-TOF-MS, no modo positivo, para o extrato de *Microcystis aeruginosa*.

O método de análise foi utilizado para a cultura de *N. Harveyana* e foram obtidos os mesmos resultados. Os íons m/z 839 [$M + H^+$] de (Har)-Nod-R e o íon m/z 825 relativo à Nod-R (**Figura 3**) foram detectados em ambas as análises.

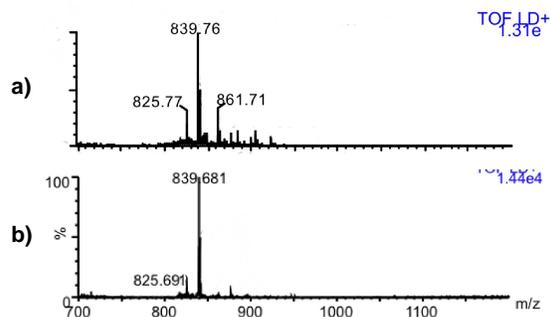


Figura 3: Espectros de MALDI-TOF-MS, no modo positivo, **a)** diretamente das células e **b)** para o extrato de *Nodularia harveyana*.

Conclusões

A análise das cianotoxinas diretamente das células de cianobactérias por MALDI-TOF-MS, mostrou-se eficiente e reprodutiva. Este método possibilita a análise rápida das florações de cianobactérias sem o preparo prévio da amostra.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq, PROPE-UNESP.

¹ van Apeldoorn, M. E.; van Egmond, H. P.; Speijers, G. J. A.; Bakker, G. J. I. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 7-60.