

# Detecção de Peptídeos Hepatotóxicos em Florações Mistas de Cianobactérias por MALDI-TOF-MS

Fernanda Bacaro (IC), Cíntia D. F. Milagre (PQ), Humberto M. S. Milagre (PQ)\*

hmilagre@rc.unesp.br

Laboratório Hooke de Espectrometria de Massas, 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, MALDI-TOF, Cianobactérias, Microcistinas, Nodularinas.

## Introdução

Nodularinas (Nod) e microcistinas (MC) são peptídeos cíclicos hepatotóxicos produzidos durante florações de cianobactérias.<sup>1</sup> Nas florações ocorre, geralmente, mais de uma espécie de cianobactéria, ocasionando a produção de diferentes cianotoxinas e que dificulta a identificação inequívoca das mesmas pela maioria dos métodos de detecção e identificação existentes até o momento.

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia para a detecção de microcistinas e nodularinas em culturas mistas de cianobactérias por espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS).

## Resultados e Discussão

As cianobactérias *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e *Nodularia harveyana* PCC 7804 foram cultivadas em biorreatores por um período de 15 dias para a produção das cianotoxinas. A espécie *M. aeruginosa* produz as microcistinas MC-LR e D-Asp-MC-LR (**Figura 1**) e a *N. harveyana* as nodularinas Nod-R e (Har)-Nod-R (**Figura 2**).

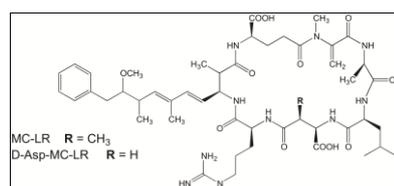


Figura 1. Estruturas das microcistinas MC-LR e D-Asp-MC-LR.

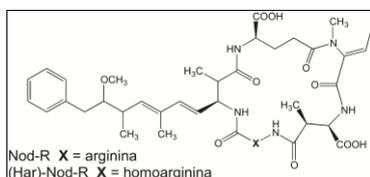


Figura 2. Estrutura das nodularinas Nod-R e (Har)-Nod-R.

Após o cultivo, a concentração celular de cada cultura foi realizada por análise espectrofotométrica da densidade óptica (D.O.) em 730 nm. Desse modo, calculamos a diferença de concentração entre as culturas e estabelecemos uma proporção entre a concentração celular de cianobactérias e produção de cianotoxinas para análise por MALDI-TOF-MS.

Inicialmente realizamos a análise diretamente das culturas da cianobactérias: para a *M. aeruginosa* foram detectadas a MC-LR  $[M + H]^+$   $m/z$  995,56 e  $[M + K]^+$   $m/z$  1033,32 e a D-Asp-MC-LR  $[M + H]^+$   $m/z$  981,43. Para a *N. harveyana* foram detectadas a Nod-R  $[M + H]^+$   $m/z$  839,52 e a (Har)-Nod-R  $[M + H]^+$   $m/z$  825,54.

Posteriormente, analisamos as cianotoxinas em culturas mistas com diferentes concentrações das duas cianobactérias, sempre mantendo uma das concentrações fixa e variando a outra. Na **Figura 3** são apresentados os espectros de massas em que cada cianobactéria apresentava a concentração celular na proporção 1:100.

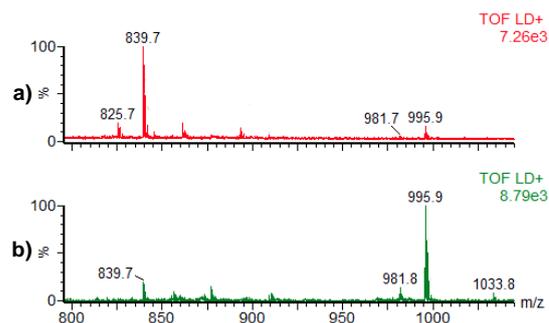


Figura 3: Espectros de MALDI-TOF-MS, no modo positivo, a) concentração celular de *N. harveyana* e *M. aeruginosa* na proporção 100: 1 e b) na proporção 1:100.

Analisando a **Figura 3a** observamos que mesmo tendo uma concentração celular 100 vezes maior de *N. harveyana* em relação à *M. aeruginosa* foi possível detectar e distinguir as microcistinas. Porém na situação inversa apenas a Nod-R foi detectada (**Figura 3b**). O maior limite de detecção alcançado foi de 1000:1 (*N. harveyana* : *M. aeruginosa*) para a microcistina-LR.

## Conclusões

A técnica MALDI-TOF-MS mostrou-se eficiente e sensível para a detecção de cianotoxinas em florações mistas de cianobactérias.

## Agradecimentos

FAPESP, CNPq e PROPE-UNESP

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