UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Gabriel Nobrega da Rocha Martins

**Detecção e quantificação de derivados e intermediários de
hispidina em fungos bioluminescentes e plantas por LC-
MS/MS**

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo
06/03/2018

GABRIEL NOBREGA DA ROCHA MARTINS

**Detecção e quantificação de derivados e intermediários de
hispidina em fungos bioluminescentes e plantas por LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof Cassius Vinicius Stevani
Coordenadora: Prof Denise de Petri

São Paulo

06/03/2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP
Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Martins, Gabriel N. R.
M379d Detecção e quantificação de derivados e intermediários de hispidina em fungos bioluminescentes e plantas por LC-MS/MS / Gabriel N. R. Martins. - São Paulo, 2018.
53 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Stevani, Cassius

1. Basidiomicetos. 2. Bioluminescência. 3. Hispidina. 4. Luciferin. 5. LC-MS/MS. I. T. II. Stevani, Cassius, orientador.

Dedico esse trabalho a meus pais, Alexandre e Elisabete, e à minha irmã, Carolina, por toda a confiança e suporte através dos anos.

Agradecimentos

Agradeço a meu ex-gerente, Carlos Henrique Ferrazoli, que criou as condições necessárias para que eu pudesse iniciar este mestrado e a minha atual gerente, Cintia Matuyama, que manteve todo o suporte para que eu continuasse e finalizasse este curso. Além do suporte junto a Agilent, ambos têm parte importantíssima nesse processo pela companhia e sabedoria compartilhada nesses anos.

Agradeço ao meu orientador, Cassius Vinicius Stevani, pela confiança, ajuda e disposição em orientar a busca dos resultados aqui contidos e muitos outros. Dizem que o bom orientador orienta para além da academia, orienta para a vida. Posso ter certeza de que tive um dos melhores, tanto para a academia quanto para a vida.

Agradeço a Celso Blatt, Maurício Marques e Leonardo Valentin por toda ajuda em entender e operar os espectrômetros de massas.

À Tatiana Pereira, Hans Waldenmaier, Rodrigo Carvalho, Patrícia Dias e Bianca Nobrega, pela parceria na produção das culturas e extratos, pelas dicas e pela paciência na espera dos resultados.

Agradeço a Márjorie Mendonça e Débora Monção pela ajuda em todos momentos dentro do Centro de Excelência da Agilent.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XIVxiv
ABSTRACT.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 BIOLUMINESCÊNCIA EM FUNGOS	19
1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	23
1.3 OBJETIVOS	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	32
2.2 PREPARO DE AMOSTRAS.....	32
2.2.1 EXTRATO ETANÓLICO DE CAVALINHA.....	32
2.2.2 EXTRATOS VEGETAIS	34
2.2.3 ENSAIOS QUANTITATIVOS DE HISPIDINA EM FUNGOS	35
2.2.4 MÉTODO PARA QUANTIFICAR INTERMEDIÁRIOS DA BIOSÍNTESE DE HISPIDINA	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 EXTRATO ETANÓLICO DE CAVALINHA.....	39
3.3 ENSAIO QUANTITATIVO	45
3.4 HISPIDINA E METABÓLITOS.....	48
4 CONCLUSÕES	52
5 REFERÊNCIAS.....	53

RESUMO

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS E INTERMEDIÁRIOS DE HISPIDINA EM FUNGOS BIOLUMINESCENTES E PLANTAS POR LC-MS/MS

A bioluminescência desperta o interesse humano há muitos séculos. Presente em quatro dos sete reinos taxonômicos, Monera, Chromista, Animalia e Fungi, cada um com mecanismos muito diferentes. Pode-se dizer que o estudo químico da bioluminescência começou com os experimentos de Dubois no século XIX, que cunhou os termos luciferina e luciferase, termos genéricos para o substrato e enzima envolvidos na reação, respectivamente. No caso específico de fungos, o envolvimento de enzimas foi debatido por quase cinco décadas, após a proposta enzimática de Airth e Foerster na década de 1960 e a não enzimática por Shimomura, em 1989. Somente em 2009 a hipótese de Airth e Foerster foi confirmada pelo nosso grupo, seguido da identificação da luciferina fúngica e o envolvimento de hispidina, como molécula precursora, em 2015 pelo grupo de Yampolsky. Para conseguir elucidar mecanismos químicos, a técnica de espectrometria de massas pode ser empregada para a identificação estrutural de reagentes e intermediários destas e de outras reações orgânicas. Após a confirmação do envolvimento de hispidina na bioluminescência de fungos, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para identificar a presença de hispidina, seus derivados e intermediários precursores, em fungos e em algumas plantas.

Palavras-chave: Basidiomicetos, Bioluminescência, Hispidina, Luciferina, LC-MS/MS.

ABSTRACT

DETECTION AND QUANTIFICATION OF HISPIDIN DERIVATIVES AND INTERMEDIATES IN BIOLUMINESCENT FUNGI AND PLANTS BY LC-MS/MS

Bioluminescence arises human interest for centuries. Occurring in four of seven taxonomical Kingdoms, Monera, Chromista, Animalia and Fungi, each of them with completely different mechanisms. The chemical study of bioluminescence starts in XIX century with Dubois, who coined the terms luciferin and luciferase, generic terms for substrate and enzyme involved in the bioluminescent reaction, respectively. In the specific case of fungi, enzyme involvement has been debated for almost five decades, after the enzymatic proposal by Airth and Foerster, during the 1960 decade, and the non-enzymatic proposal by Shimomura in 1989. It was only in 2009 when the proposal by Airth and Foerster was confirmed by our group, followed by the identification of the fungal luciferin and the involvement of hispidin, as the precursor molecule, in 2015 by Yampolsky's group. To elucidate the chemical mechanisms, mass spectrometry can be employed to structural identification of reagents and intermediates on these and other organic reactions. After the confirmation of hispidin involvement in fungi bioluminescence, liquid chromatography coupled with mass spectrometry was used to identify the presence of hispidin, its derivatives and precursor intermediates in fungi and selected plants.

Palavras-chave: Basidiomycetes, Bioluminescence, Hispidin, Luciferin, LC-MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASE: Extração por solvente acelerada.

BL: Bioluminescência.

EIC: Cromatograma íon extraído.

Espectrometria Tandem: Espectrometria de massas sequencial.

Fonte ESI: Fonte eletrospray.

GPC: Cromatografia de permeação em gel (gel permeation chromatography).

HILIC: Cromatografia líquida de interação hidrofóbica (hydrophobic interaction liquid chromatography).

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês high performance liquid chromatograph.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry).

LC-MS: Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida.

m/z : razão massa/carga de um íon.

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

QTOF: Espectrometro de massas híbrido sequencial triplo quadrupolo/tempo de voo.

Luz: luciferase.

MRM: Monitoramento de múltiplas reações (Multiple reaction monitoring).

PVDF: Fluoreto de Polivinilideno.

SIM: Monitoramento de íon selecionado (selected ion monitoring).

SRM: Monitoramento de reação selecionada (selected reaction monitoring).

TIC: Cromatograma de íons totais.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLUMINESCÊNCIA EM FUNGOS

Desde o início do século passado, vários estudos foram conduzidos a fim de compreender os mecanismos envolvidos na emissão de luz por organismos vivos. A Bioluminescência, um tipo de emissão de luz fria, ou quimioluminescência, processo que envolve a formação, em uma reação de oxidação, de um intermediário de alta energia que emite luz ao retornar a seu estado fundamental (Vassil'Ev & Vichuntinskii 1962), está presente em quatro (Monera, Chromista, Fungi e Animalia) dos sete reinos (Ruggiero et al. 2015) e ocorre de forma particular em cada um deles. Alguns sistemas já são bem conhecidos e estudados e o mecanismo *in vivo* de emissão de luz foi proposto em alguns casos. Porém, o mecanismo envolvido na BL de fungos foi elucidado somente em 2017, em um trabalho conjunto internacional, que contou também com a colaboração do nosso grupo (Kaskova et al. 2017). Apesar dos avanços, estudos detalhados da etapa de formação do intermediário de alta energia e de quimiexcitação ainda necessitam de estudos mais aprofundados.

A proposta de que a BL em fungos é produzida por uma reação enzimática surgiu nos anos 1960 (Airth & Foerster 2018) (Figura 1), que, com algumas alterações, reproduziram os experimentos com extratos quente e frio realizados no século XIX por Dubois (Desjardin et al. 2008). Em 1989, Shimomura (Shimomura et al. 1989) propôs um mecanismo não enzimático para a reação. A retomada desses testes pelo nosso grupo de pesquisa já nos anos 2000, conseguiu reproduzir os testes de Airth Foerster, indicando que se tratava realmente de uma reação enzimática (Oliveira & Stevani 2009).

Figura 1. Mecanismo enzimático simplificado da bioluminescência de fungos, proposto por Airth e Foerster na década de 1960 e a primeira etapa da reação, proposto por Yampolsky em 2015.

Em 2015, o substrato (3-hidróxihipidina, a luciferina) da luciferase envolvida na reação de emissão de luz foi caracterizado (Purtov et al. 2015), que era um dos objetivos da proposta inicial deste trabalho. A hispidina, a molécula precursora da luciferina, é uma substância que pode ser encontrada em diversos fungos orelha-de-pau e em plantas, como Piperaceae (família da pimenta do reino), Zingiberaceae (família do gengibre e cúrcuma) e Equisetales (família da cavalinha). As espécies de cavalinha, todas do gênero *Equisetum*, *E. arvense*, *E. giganteum* e *E. hyemale*, produzem não só hispidina, mas também a 3-hidróxihipidina e duas variedades glicosiladas, 3-hidróxihipidina-3-O-glicosídeo (equisetumpirona) e 3-hidróxihipidina-3,4'-di-O-glicosídeo (Veit et al. 1993, Francescato et al. 2013). Estes dois derivados glicosilados de 3-hidróxihipidina, quando em meio neutro ou levemente básico, tem maior estabilidade do que a hispidina ou a 3-hidróxihipidina, podendo ser isolado e armazenado por mais tempo. A glicosilação poderia conferir outra propriedade à estas moléculas, o endereçamento celular para alguma membrana, como ocorre com proteínas, lipídios e outras moléculas orgânicas em meio biológico.

Tais características levaram-nos a hipótese de que a real luciferina fúngica seria um derivado glicosilado de 3-hidróxihipidina. Isso também explicaria a quantidade de hispidina em fungos bioluminescentes ser tão baixa. A hipótese de que a concentração é baixa pois o fungo a usa para emitir luz não parece ser muito provável. Outros organismos bioluminescentes também utilizam as suas luciferinas, porém elas podem ser detectadas em maior concentração.

Tendo em vista o que se sabe do mecanismo até 2018, pode-se supor que fungos bioluminescentes tem pouca hispidina e luciferina, pois a oxiluciferina é reciclada no processo (Figura 2). Recentemente, o mecanismo de emissão de luz em fungos foi descrito com o envolvimento do nosso grupo (Kaskova et al. 2017). Atualmente, estamos no processo de descrição de todos os genes e enzimas importantes envolvidos na biossíntese da luciferina e emissão de luz.

A biossíntese envolve duas enzimas-chave, uma responsável pela síntese de hispidina e uma hidroxilase, que a converte em 3-hidróxihipidina (luciferina). A reação da luciferina com a luciferase gera um endoperóxido como intermediário de alta energia, cuja decomposição resulta na oxiluciferina e emissão de luz.

Figura 2. Rotas de biossíntese da hispidina a partir de seus precursores.

Figura 3. Mecanismo de emissão de luz, biossíntese e reciclagem da luciferina fúngica.

O sistema de fungos bioluminescentes emite luz verde (λ_{max} 530 nm) de forma contínua (Oliveira et al. 2013), ao custo de uma molécula de ATP, uma de NADH ou NADPH e duas de malonil-CoA por fóton, partindo-se de ácido cafeico (Figura 3). O fato deste sistema consumir recursos energéticos celulares valiosos e requerer oxigênio (Boyle 1666) levanta algumas perguntas. Em particular, é a intensidade da luz realmente constante? Esta questão é importante, porque regulação implica função, e a verdadeira função da BL de fungos permaneceu controversa por mais de dois milênios (Aristóteles 350 a.C., Boyle 1666, Desjardin et al. 2008). A emissão de luz é influenciada pela hidratação do micélio ou cogumelos (Mendes et al. 2008), porém sua regulação circadiana era desconhecida até 2015. A possibilidade de ritmo foi proposta no início dos anos 1960 (Berliner 1961, Calleja & Reynolds 1970), mas rapidamente esquecida. Nos subsequentes 50 anos foram apenas questionados dados sobre a ritmicidade (Mihail & Bruhn 2007, Mihail 2013). Nossos resultados anteriores mostram que a BL do fungo *N. gardneri* é realmente regulada por um ritmo circadiano (Oliveira et al. 2015). Associações entre insetos e fungos, observados em seu ambiente natural, suportam um modelo em que a regulação circadiana de luminescência observada confere vantagem seletiva para estes fungos, ajudando-os a economizar energia durante o dia e melhorar a dispersão de esporos à noite por insetos. Relógios circadianos são osciladores biológicos responsáveis pela manutenção dos ritmos internos de animais, plantas, fungos e cianobactérias para a alternância de estímulos externos como luz e temperatura (Dunlap et al. 2004). Com estes resultados será possível agora estudar como o ritmo circadiano afeta a expressão e atividade das enzimas envolvidas (i.e., HispS, H3H, CPH e Luz), bem como a biossíntese dos

intermediários da luciferina fúngica, ou seja, ácidos *p*-cumárico e cafeico, bisnoriangonina, hispidina e a oxiluciferina.

1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para suportar os estudos de mecanismos e função nos fungos, fez-se necessária a utilização de técnicas analíticas instrumentais capazes de identificar e quantificar os substrato e seus precursores na reação de BL. A necessidade de separar uma grande quantidade de compostos nos extratos fúngicos para se determinar a presença ou concentração dos analitos de interesse faz da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) uma técnica interessante para esse estudo.

A técnica HPLC é a mais amplamente utilizada de todas as técnicas analíticas de separação. A popularidade da técnica se deve, entre outros, pela sensibilidade, fácil adaptação para métodos quantitativos exatos e precisos, capacidade de separar moléculas não-voláteis ou termicamente lábeis e, acima de tudo, sua ampla aplicação para substâncias de extremo interesse para muitos campos da indústria e da ciência (Skoog et al. 1998).

Nas separações em cromatografia líquida, a amostra, introduzida por um injetor de amostras, é carregada por um fluido, a fase móvel, forçada através de uma fase estacionária imiscível, uma coluna cromatográfica, por um sistema de bombeamento.

O conjunto fase móvel e fase estacionária será escolhido de forma a conduzir a separação dos componentes da amostra pelas diferentes velocidades com as quais analitos com propriedades químicas ou físicas distintas, e portanto interações diferentes com essas fases, percorrem a coluna de fase estacionária. Dentro da cromatografia líquida existem diversas dessas modalidades de separação. É o conhecimento prévio do analito de interesse e o que se quer saber sobre esse analito ou conjunto de analitos que determinará a melhor estratégia para a separação (Snyder et al. 1997).

Os modos de separação mais difundidos atualmente em HPLC são cromatografia em fase reversa, cromatografia líquida fase normal, cromatografia de troca iônica, cromatografia por permeação em gel (GPC) e cromatografia de interação

hidrofóbica (HILIC) e a escolha da estratégia de separação é feita de acordo com as características químicas dos analitos que se quer utilizar para separá-los.

As técnicas em fase normal e reversa, tem sua separação baseada na partição dos analitos entre as fases móveis e estacionárias. Em fase normal, tem-se fase a fase móvel composta por solvente polar e a fase estacionária composta por compostos apolares (Snyder et al.1997). Na fase reversa acontece o contrário, a fase móvel é um solvente, ou mistura de solventes, polar e a fase estacionária com partículas recobertas por moléculas apolares e é hoje a técnica utilizada em cerca de 95% das aplicações (Agilent 2016).

Na cromatografia de troca iônica, as partículas são recobertas por íons, e a separação acontece quando os íons presentes no analito interagem com os íons da fase estacionária. No modo GPC, os analitos são separados de acordo com o tempo que levam para atravessar uma coluna de fase estacionária porosa de acordo com seu tamanho, partículas maiores não entram em todos os poros, portanto tem trajetórias mais curtas e eluem primeiro da coluna cromatográfica. Já partículas menores são capazes de penetrar nos poros das partículas constituintes da fase estacionária, realizando trajetórias mais longas e levando mais tempo para percorrer a coluna cromatográfica.

No presente trabalho utilizou-se o modo de separação por fase reversa, mas com um tipo de partícula especial. Geralmente as colunas de fase reversa são compostas por partículas de sílica porosa, que podem variar em diâmetro de 1,8 a 10 μ m, recoberta com moléculas apolares. No caso da coluna Poroshell 120 utilizada no trabalho, as partículas medem 2,7 μ m, dos quais apenas a superfície, de 0,5 μ m do diâmetro da parte mais externa da partícula é composto de sílica porosa. O cerne de 1,2 μ m é sólido. Essa disposição faz com que as colunas de separação Poroshell 120 tenha melhor eficiência de separação gerando menos pressão no sistema cromatográfico.

As leituras da separação são realizadas por detectores sensíveis a propriedades dos analitos, como absorção de uma banda específica de luz ultravioleta, nos detectores de absorção ultravioleta, emissão uma banda de fluorescência específica, observável por detectores de fluorescência, capacidade de mudar o índice de refração de um meio, observável nos detectores de índice de refração ou ainda que os analitos sejam menos voláteis que a fase móvel, para que o efluente do sistema passe por um

processo de nebulização e evaporação da fase móvel e os analitos secos, carregados por um fluxo de gás e com tamanho suficiente de partícula, sejam capazes de refratar luz, como acontece no sistema evaporativo de detecção por espalhamento de luz.

A massa dos analitos também é uma propriedade que se pode utilizar para a detecção em cromatografia líquida. Para isso utiliza-se a espectrometria de massas, uma técnica analítica de grande destaque que recentemente tem sido bastante utilizada para resolver problemas de química e bioquímica em áreas como a proteômica, metabolômica, descoberta de novas drogas e seu metabolismo, rotinas como controle de poluição, controle alimentício, ciência forense, investigações em produtos naturais e monitoramento de processos. A lista de aplicações ainda inclui física atômica, física de reações, cinética de reações, geocronologia, análise de inorgânicos e muitas outras (Hoffmann & Stroobant 2007).

Pode-se compreender um espectrômetro de massas como o conjunto composto de fonte de íons, analisador de massas e detector (Figura 4). Esse tipo de espectrômetro pode utilizar um sistema de separação cromatográfica como entrada de amostra, nesse caso, as amostras são previamente separadas em uma coluna cromatográfica antes de passarem pela fonte de ionização que, no caso desse acoplamento, está na interface entre os sistemas.

Figura 4. Diagrama simplificado de um espectrômetro de massas.

Dos tipos mais comuns no acoplamento da espectrometria de massas com cromatografia, LC-MS, as fontes de ionização eletrospray (ESI) começaram a ter popularidade quando John Fenn mostrou que elas eram capazes de ionizar proteínas em íons multiplamente carregados, tornando possível analisar grandes proteínas em equipamentos cujo limite de m/z não era maior que 2000. Em princípio, utilizou-se esse tipo de fonte apenas para análises de proteínas e longas cadeias poliméricas, mas logo sua utilização com moléculas polares pequenas se popularizaria, principalmente, devido a capacidade dessas fontes para trabalhar com fluxos maiores de fase móvel proveniente de separações cromatográficas com colunas analíticas comuns em HPLC. O spray é formado aplicando-se uma diferença de potencial entre

3 e 6 kV entre o capilar pelo qual a amostra passa e um contra eletrodo, separado do capilar por uma distância de 0,3 a 2 cm. O campo elétrico produzido, da ordem de 10^6 Vm^{-1} , induz uma acumulação de carga na superfície da amostra saindo do capilar, que diminui a tensão superficial do líquido, fazendo com que este se quebre em gotículas carregadas.

Um fluxo de gás coaxial ajuda a reduzir o espalhamento dessas gotículas no espaço, enquanto uma cortina de gás inerte aquecido, ajuda a terminar a dessolvatação dos íons. As fontes Jet Stream, que foram utilizadas nesse trabalho, são fontes ESI em que a dessolvatação é otimizada pela adição de um fluxo de gás inerte aquecido, colinear com o gás de nebulização da fonte, o que ajuda a melhorar a dessolvatação dos íons, aumentando consideravelmente a quantidade de íons disponíveis e, como consequência, a sensibilidade de detecção.

Uma característica importante das fontes ESI é sua sensibilidade para concentração, e não para o total de amostra presente, ou seja, ao analisar a mesma amostra com fluxos mais baixos, haverá uma melhora na sensibilidade, devido ao aumento da concentração de analito no efluente de uma separação por HPLC.

Depois da formação dos íons, eles precisam ser separados de acordo com suas massas, que deveram ser determinadas. A propriedade física que é medida por um analisador de massas é a razão massa carga (m/z) e não sua massa propriamente dita. Os analisadores quadrupolo e de tempo de voo, comuns de serem encontrados em equipamentos comerciais, realizam essas medidas de forma diferente e, como veremos a seguir, podem ser utilizados de forma complementar.

Os analisadores podem ser separados em duas classes principais. À uma dessas classes, pertencem os detectores de varredura, ou seja, os detectores que transmitem íons de diferentes m/z sucessivamente em uma escala de tempo, dentre os quais estão os analisadores quadrupolo (Q). Compõem a outra classe os detectores que transmitem todos os íons simultaneamente, da qual os detectores de tempo de voo (TOF) são representantes. À outra classe de analisadores, pertencem os analisadores quadrupolo são equipamentos que utilizam a estabilidade das trajetórias em campos elétricos oscilantes para separar íons de acordo com sua razão m/z . São constituídos de quatro hastes metálicas, às quais são aplicadas radiofrequência e potencial de corrente alternada. Além de trabalhar em modo de varredura, em que uma faixa de massas é analisada em um ciclo de tempo, podem

trabalhar em modo de monitoramento de um único íon, também chamado modo SIM (single ion monitoring).

Já os analisadores de tempo de voo possuem transmissão simultânea dos íons formados na fonte. A interpretação das razões massa carga depende do tempo de trajetória de íons com mesma aceleração dentro do tubo de voo. A natureza de transmissão simultânea da técnica, torna-a excelente para fontes de íons pulsadas, como é o caso das fontes de ionização MALDI (matrix assisted laser desorption ionization). No entanto, para aliar essa técnica a fontes contínuas de íons, como é o caso das fontes ESI, foi criado um sistema no qual o feixe de íons é direcionado para um pulsador de íons, responsável pela aceleração ortogonal dos íons para sua trajetória através do tubo.

A associação de dois analisadores através de um quadrupolo, hexapolo ou octapolo, operando apenas como guia de íons ou célula de colisão, é chamada espectrometria de massas sequencial, ou tandem (MS/MS). Essa técnica pode associar dois analisadores quadrupolo numa montagem chamada triplo quadrupolo, ou QQQ. Também é possível associar um analisador quadrupolo a um TOF de forma semelhante, que dá origem ao analisador híbrido QTOF.

Ao se associar dois analisadores, existem algumas estratégias principais de análise que podemos utilizar (Tabela 1): varredura de íons, monitoramento de íon selecionado (SIM), varredura de íons produto (product ion scan), varredura de íons precursores (precursor ion scan), e monitoramento de reação selecionada (single reaction monitoring, ou SRM, ou, no caso de monitoramento de mais de uma reação, multiple reactions monitoring, ou MRM).

Na varredura de íons produto, um íon precursor é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1 em modo SIM), sofre dissociação induzida na célula de colisão (Q2 ligado) e os íons, produtos da colisão, são analisados por um segundo analisador quadrupolo ou por tempo de voo (Q2 em modo varredura). A varredura de íons precursores consiste em fazer uma varredura de íons precursores no primeiro analisador (Q1 em modo varredura), com ação da célula de colisão (Q2 ligado), e o segundo analisador monitorando um íon específico (Q3 em modo SIM).

Utiliza-se o monitoramento de reações selecionadas (MRM) quando queremos monitorar o íon precursor no primeiro analisador (Q1 em modo SIM), utilizar a célula de colisão para fragmentar o íon precursor (Q2 ligado) e monitorar um íon produto

selecionado no segundo analisador (Q3 em modo SIM). Nos instrumentos QTOF, não é possível fazer monitoramento de um íon através de modo SIM no analisador TOF, no entanto, podemos realizar esse filtro digitalmente através de ferramentas de software.

Tabela 1. Modos de análise em detectores híbridos.

Modo	Q1	Q2	Q3
<i>Varredura de íon</i>	Varredura	Desligado	Transmissão
<i>Monitoramento de íon selecionado</i>	SIM	Desligado	Transmissão
<i>Varredura de íons produto</i>	SIM	Ligado	Varredura
<i>Varredura de íons precursores</i>	Varredura	Ligado	SIM
<i>Monitoramento de reações selecionadas</i>	SIM	Ligado	SIM

Outro ponto importante a ser mencionado quando falamos de espectrometria de massas é definir as diferenças entre os termos poder de resolução e resolução. O poder de resolução (Macherone, 2013) é a capacidade de um instrumento separar dois íons adjacentes. A IUPAC define o poder de resolução:

“Para dois picos de mesma altura com massas m_1 e m_2 , quando há uma sobreposição desses dois picos de uma porcentagem delimitada da altura de qualquer um dos picos (10% é o recomendado), então o poder de resolução será dado por:

$$\frac{m_1}{m_1 - m_2}$$

A porcentagem de sobreposição (ou ‘vale’) deve sempre ser definida.”

Resolução de massas é definida pela IUPAC através da largura de pico: *“Para um pico único, constituído de íons carregados com carga unitária de massa m num espectro de massas, a resolução pode ser expressa como:*

$$\frac{m}{\Delta m}$$

Em que Δm é a largura do pico à uma da altura que seja uma fração especificada da altura máxima do pico (por exemplo: 50%).”

Essas definições são necessárias para entender diferenças de performance e no funcionamento de cada um dos tipos de analisador. Os analisadores quadrupolo são analisadores de banda fixa, ou seja, se a largura de pico um pico monocarregado à meia altura é de 0,5 u para uma razão m/z 40, também será 0,5 u para m/z 1000, porém o poder de resolução para m/z 40, de acordo com a equação proposta é 80, enquanto esse valor sobe para 2000 com m/z 1000. Diferentemente, nos analisadores TOF, a resolução se mantém constante com o aumento das massas analisadas, o que mantém a precisão de massa constante por toda a faixa de massas.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é de utilizar o sistema bioluminescente de fungos como desafio analítico na elucidação de mecanismos de Química Orgânica, para aprofundar o conhecimento do autor desta dissertação sobre o desenvolvimento de métodos e utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (LC-MS). Inicialmente, o objetivo direto desse trabalho era caracterizar o substrato da reação bioluminescente no fungo *Neonothopanus gardneri*. Os objetivos indiretos tratariam da capacitação do autor na técnica de LC-MS, tornando-o mais apto aos desafios analíticos dentro da sua instituição de trabalho, a Agilent Technologies do Brasil, e de auxiliar a equipe orientada pelo Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani a elucidar os mecanismos de reação na BL em fungos através do trabalho analítico em LC-MS.

Com a publicação da estrutura da luciferina de fungos e da molécula precursora, a hispidina, presente em outros organismos além dos fungos, com função antioxidante, foi necessário que se reorientasse o objetivo direto, afim de conseguir manter em vista os objetivos indiretos. Desta forma, os objetivos foram alterados para:

1. Realização de varredura qualitativa a fim de determinar a presença de hispidina e equisetumpirona em algumas espécies de plantas.
2. Quantificação da hispidina em corpos de frutificação secos e em micélios de amostras de fungos bioluminescentes.

3. Análise qualitativa com foco no desenvolvimento posterior de um método quantitativo que permita avaliar as concentrações de hispidina e de metabólitos envolvidos na sua síntese, a fim de poder determinar se a biossíntese dos intermediários é pautada por um ciclo circadiano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Durante a realização do presente trabalho foram utilizadas duas combinações diferentes de espectrômetros de massas. A primeira delas, utilizada apenas no teste dos extratos etanólicos de cavalinha, o espectrômetro Agilent QTOF 6530, contou com fonte electrospray (ESI), analisador quadrupolo (Q1), célula de colisão hexapolo (Q2), analisador por tempo de voo (TOF) e detector composto de placa de microcanais, cintilador e fotomultiplicadora. A segunda combinação, utilizada em todos os outros testes, o espectrômetro Agilent 6460, contou também com fonte ESI, analisador Q1, célula Q2 e, em lugar de um analisador TOF, contou com um segundo analisador quadrupolo (Q3), arranjo conhecido como triplo quadrupolo. A detecção foi realizada por um sistema com dois dinodos associados a uma eletromultiplicadora. Além dos espectrômetros acima, foram utilizados nesse trabalho uma colunas cromatográficas Poroshell EC-C18 com partículas de 2,7 μm , com dimensões diferentes para partes diferentes do trabalho, como veremos a seguir, sistema HPLC 1260 Agilent, constituído de bomba binária, injetor automático, forno de colunas e detector arranjo de diodos e HPLC 1290 Agilent, constituído de bomba binária, injetor automático, forno de colunas e detector arranjo de diodos.

2.2 PREPARO DE AMOSTRAS

2.2.1 EXTRATO ETANÓLICO DE CAVALINHA

Para os experimentos de detecção de hispidina e seus derivados em extratos metanólicos de cavalinha (*Equisetum hyemale*) foi utilizado sistema similar ao reportado na literatura (Francescato *et al.*, 2013). As amostras foram preparadas utilizando-se 0,4g de estróbilos secos de *E. hyemale*, extraídos com 2mL de solução metanol/água 50% em volume. Esse extrato passou por 30 min de banho ultrassom, centrifugação a 1500 $\times$ g, diluição 1:10 em solução de extração e filtração em membrana PVDF de 0,2 μm . O gradiente do método foi baseado no mesmo trabalho sobre a cavalinha, mas otimizado para separar a equisetumpirona e a equisetumpirona glicosilada, conforme fosse possível encontrar suas razões m/z , de

forma que posteriormente fosse possível coletar as frações de cada um dos compostos manualmente, direto da saída do sistema HPLC para um frasco de coleta, baseando-se nos tempos de retenção. As corridas foram feitas no modo negativo, com varredura de m/z 100 a 600, de 200 a 640 nm em arranjo de diodos, gerando-se os cromatogramas TIC, EIC para as m/z de 423,0933, para a equisetumpirona, 581,1461 para a equisetumpirona glicosilada e também em 210, 254, 272 e 320 nm. As massas exatas foram calculadas utilizando a ferramenta do software de aquisição MassHunter. As condições específicas de instrumentação foram: HPLC 1260 Agilent, constituído de bomba binária, injetor automático, forno de colunas e detector arranjo de diodos, espectrômetro de massas QTOF 6530 Agilent, software de aquisição e tratamento de dados MassHunter, água deionizada, ácido fórmico (Grau HPLC, Merck), acetonitrila (Grau HPLC, Merck), filtro 0,2 μm PVDF Agilent, coluna Poroshell 120 EC-18 3,0 x 100mm 2,7 μm , pré-coluna Poroshell 120 EC-18 3,0 x 5mm 2,7 μm . Método Cromatográfico: fluxo 0,4 mL/min, volume de injeção 20 μL , fase A: ácido fórmico 0,3% em água deionizada, fase B: ácido fórmico 0,3% em acetonitrila, separação realizada em modo gradiente (Tabela 2) temperatura de coluna 40°C. Parâmetros MS: ESI negativo, temperatura do gás 300°C, gás de secagem 13 L m^{-1} . Fonte: nebulizador 40 psig, temperatura do sheath gás 250°C, fluxo do sheath gás 11 L m^{-1} , tensão no VCap 4000V, tensão no Nozzle 2000V, tensão no fragmentador 100V, tensão no skimmer 450V, aquisição no QTOF em modo scan de 100 a 1100 m/z , taxa de aquisição de 3 espectros s^{-1} e 3266 transientes por espectro.

Tabela 2. Composição do gradiente utilizado nas análises de cavalinha.

<i>Tempo (min)</i>	<i>% Solvente A</i>	<i>% Solvente B</i>
0	95	5
15	75	25
20	5	95
25	95	5
30	95	5

2.2.2 EXTRATOS VEGETAIS

Tomando como base o mesmo trabalho realizado com a hispidina e derivados (Francescato *et al.*, 2013), mas com enfoque em fazer uma busca por plantas que possuísem hispidina ou equisetumpirona, a abordagem da cromatografia teve de ser modificada. A otimização das energias de fragmentação foi realizada através do software Optimizer, presente no pacote de acessórios do software Mass Hunter. O Optimizer funciona utilizando modo de varredura de íons produto enquanto varia os valores de energia na célula de colisão. As maiores abundâncias de íons produto são destacadas em um relatório, com os respectivos valores de energia para célula de colisão. Como método cromatográfico base para a otimização, foi utilizado o mesmo método cromatográfico empregado nas análises.

Condições específicas de instrumentação: HPLC 1260 Agilent, constituído de bomba binária, injetor automático, forno de colunas e detector arranjo de diodos, espectrômetro de massas triplo quadrupolo 6460 Agilent, software de aquisição e tratamento de dados MassHunter, água deionizada, ácido fórmico (Grau HPLC, Merck), acetonitrila (Grau HPLC, Merck), filtro 0,2 μm PVDF Agilent, coluna Poroshell 120 EC-18 3,0 x 100mm 2,7 μm , pré-coluna Poroshell 120 EC-18 3,0 x 5mm 2,7 μm . Método cromatográfico: fluxo 0,4 mL/min, volume de injeção 20 μL , fase A: ácido fórmico 0,2% em água deionizada, fase B: ácido fórmico 0,2% em acetonitrila, separação em modo gradiente (Tabela 3), temperatura de coluna 40°C. Parâmetros MS: temperatura do gás 300°C, gás de secagem 13 L m^{-1} . Fonte: nebulizador 40 psig, temperatura do sheath gás 250°C, fluxo do sheath gás 11 L m^{-1} , tensão no VCap 4000V, tensão no Nozzle 2000V, tensão no fragmentador 100V, tensão no skimmer 450V, aquisição no modo MRM (multiple reaction monitoring). Transições monitoradas para a hispidina (fonte em modo ESI positivo conforme Tabela 4).

Tabela 3. Composição do gradiente utilizado nas análises de extratos vegetais por triplo quadrupolo.

<i>Tempo (min)</i>	<i>% Solvente A</i>	<i>% Solvente B</i>
0	80	20
25	20	80
25,1	80	20
30	80	20

Tabela 4. Transições MRM para detecção de hispidina em LC-MS/MS.

Composto	m/z íon precursor (Da)	m/z íon produto (Da)	Energia de colisão (V)	Polaridade da fonte	Fragmentador (V)
Hispidina	247,06	138,1	68	+	100
Hispidina	247,06	69,1	60	+	100

2.2.3 ENSAIOS QUANTITATIVOS DE HISPIDINA EM FUNGOS

O atual ensaio originou-se da necessidade de comparar duas metodologias diferentes de extração de hispidina: uma utilizando extrator ASE e outra conduzida pelo grupo de Y. Oba, da Universidade de Nagoya, Japão, que colaborou com nosso grupo (Oba *et al.*, 2017). A extração acelerada com solvente com o equipamento ASE 300 Dionex (Thermo Fischer Scientific, USA) foi conduzida a partir de 3,10 g de corpos de frutificação moídos ou 3,00 g de micélio fresco do fungo *N. gardneri*, a essa massa adicionam-se 2,00 g de resina Celite 545 (Merck). A mistura então obtida foi carregada numa célula de extração de 66 mL, entre duas camadas, de 5 g cada, de resina Celite 545. A extração foi conduzida utilizando-se uma solução 0,025% de ácido fórmico, 20 mM 2-mercaptoethanol, pH 3, sob 1500 psi a 80°C. Tempo de aquecimento de 5 min, com 15 min de ciclo e purga de 120 s. Um total de 100 mL de extrato foi obtido, e depois evaporado em um rotoevaporador (Büchi, Suíça), à 60°C e pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em 300 µL de acetato de etila, colocado em um vial e submetido a evaporação sob fluxo de nitrogênio.

A extração conduzida pelo grupo de pesquisa do Prof. Oba é conduzida a partir de 1,07 g de *Mycena chlorophos*, 1,00 g de *Omphalotus japonicus* e 3,00 g de *N. gardneri*, na forma de corpos de frutificação liofilizados. As massas de fungos foram moídas em tampão 100 mM fosfato (pH 7.5), contendo 5 mM EDTA e 1 mM 2-mercaptoetanol usando um pistilo. Acidificou-se a mistura até pH inferior a 2, pela adição de 500 µL de HCl 12 M, centrifugou-se a mistura a 17.400 × g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi extraído utilizando-se 40mL de acetato de etila e a solução obtida foi levada ao rotoevaporador, em temperatura não maior que 40°C sob pressão reduzida. O resíduo foi então dissolvido em 300 µL de acetato de etila, colocado em um frasco e submetido a evaporação sob fluxo de nitrogênio.

Inicialmente utilizou-se um método cromatográfico com um gradiente de 25 min, como o utilizado na parte anterior deste trabalho, porém, após testes preliminares, uma coluna mais longa e um gradiente cromatográfico mais longo foram empregados para melhorar a separação e evitar a supressão de ionização na fonte, separando os compostos de interesse de outras partes do extrato. A quantificação foi realizada utilizando-se uma curva gerada a partir de 5 níveis de concentração, em triplicata, de padrão comercial de hispidina. A utilizou-se uma calibração com padrão interno ácido acetilsalicílico.

Condições específicas de instrumentação HPLC 1290 Agilent, constituído de bomba binária, injetor automático, forno de colunas e detector arranjo de diodos, espectrômetro de massas triplo quadrupolo 6460 Agilent, software de aquisição e tratamento de dados MassHunter, água deionizada, ácido fórmico (Grau HPLC, Merck), acetonitrila (Grau HPLC, Merck), filtro 0,2 µm rPVDF Agilent, coluna Poroshell 120 EC-18 3,0 x 100mm 2,7µm, pré-coluna Poroshell 120 EC-18 3,0 x 5mm 2,7µm. Método cromatográfico: fluxo 0,4 mL/min, volume de injeção 20µL, fase A: ácido fórmico 0,2% em água deionizada, fase B: ácido fórmico 0,2% em acetonitrila, separação em modo gradiente (Tabela 5), temperatura de coluna 40°C. Parâmetros de MS: temperatura do gás 300°C, gás de secagem 13 L m⁻¹. Fonte: nebulizador 40 psig, temperatura do sheath gás 250°C, fluxo do sheath gás 11 L m⁻¹, tensão no VCap 4000V, tensão no Nozzle 2000V, tensão no fragmentador 135V, tensão no skimmer 450V, aquisição no modo QQQ, MRM (multiple reaction monitoring). Transições monitoradas para a hispidina (fonte em modo ESI positivo, conforme tabela 4).

Tabela 5. Composição do gradiente utilizado nas análises quantitativas.

<i>Tempo (min)</i>	<i>% Solvente A</i>	<i>% Solvente B</i>
0	80	20
60	20	80
60,1	80	20
65	80	20

2.2.4 MÉTODO PARA QUANTIFICAR INTERMEDIÁRIOS DA BIOSÍNTESE DE HISPIDINA

A fim de compreender melhor se a biossíntese da luciferina de fungos e seu consumo gerando luz seria governado por ritmo circadiano (Oliveira *et al.*, 2015), os níveis de hispidina e de seus precursores, ácidos cafeico, cinâmico e cumárico foram monitorados. Foram realizadas corridas cromatográficas de padrões dessas substâncias em um cromatógrafo com detecção UV, a fim de destacar os tempos de retenção dessas substâncias. Além disso, foram analisados por espectrometria de massas mix de padrões e extratos reais de micélio obtidos pelo protocolo de extração com extrator ASE a partir de uma, duas ou três placas de micélio do fungo *N. gardneri*, tanto da fração aquosa da extração, quando da fração orgânica. Para esta etapa utilizou-se o mesmo método cromatográfico e condições de fonte no espectrômetro de massas da etapa anterior, apenas realizou-se uma nova otimização das transições MRM. Condições específicas de instrumentação: detecção UV em 220 nm, aquisição no QQQ (fonte em modo ESI positivo), modo MRM (multiple reaction monitoring). Transições monitoradas para a hispidina, ácido cafeico, ácido, cinâmico, conforme tabela 6.

Tabela 6. Transições MRM para detecção de hispidina, ácido cafeico, ácido cumárico e ácido cinâmico por LC-MS/MS.

Composto	m/z íon precursor	m/z íon produto	Energia de colisão (V)	Polaridade da fonte	Fragmentador (V)
hispidina	247,06	138,1	68	+	100
hispidina	247,06	69,1	60	+	100
ácido cafeico	181,05	63,0	50	+	100
ácido cafeico	181,05	89,1	66	+	100
ácido cumárico	165,06	65,2	50	+	100
ácido cumárico	165,06	108,6	54	+	100
ácido cinâmico	149,06	51,2	54	+	100
ácido cinâmico	149,06	77,1	62	+	100

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir mostram a utilização da espectrometria de massas em diferentes necessidades e momentos da pesquisa da bioluminescência em fungos.

A busca em extratos vegetais pela hispidina, ou por uma variante glicosilada, como é o caso da equisetumpirona, que servisse como precursor para a luciferina, ocorreu em um momento em que se procurava uma planta rica nesses substratos, que pudesse receber e expressar os genes das enzimas envolvidas no processo de bioluminescência em fungos. Já o estudo nos extratos fúngicos ocorreu para publicação de um artigo em que se consolida o papel da hispidina como precursor da luciferina. O ensaio com precursores da luciferina se destina a estudar o ritmo circadiano da bioluminescência a partir da biossíntese da luciferina através das rotas propostas na introdução do presente trabalho.

3.1 EXTRATO ETANÓLICO DE CAVALINHA

Da análise do extrato de cavalinha por QTOF obteve-se o cromatograma de íons totais (TIC) (Figura 5), bem como o cromatograma de íons extraído (EIC) para m/z 423,0933, característica da equisetumpirona. e o espectro do pico observado em 11,07 min (Figura 6). Os primeiros resultados obtidos com QTOF para as análises de extratos de cavalinha (*E. hyemale*) mostraram um pico nos cromatogramas extraídos para m/z 423,0933, valor de m/z calculado a molécula de equisetumpirona. É possível ver no espectro extraído do pico em 11,07min um íon com m/z 423,0934, que apresenta um erro de apenas -0,2ppm em relação a m/z da equisetumpirona, sendo o principal componente do pico cromatográfico, o que indica a presença da equisetumpirona na amostra (Figura 6). A sequência de confirmação envolveria a estratégia de varredura de íons fragmento, através de dissociação induzida por colisão dos íons encontrados no hexapolo do instrumento. Porém, não foi possível detectar nessa varredura nenhuma fragmentação para a m/z da equisetumpirona.

Essa etapa foi primordial como primeiro contato com a espectrometria de massas, compreensão da instrumentação e do funcionamento das fontes de íons ESI. Para conseguir resultados que complementassem as informações do grupo de pesquisa, seria necessário evoluir na técnica para ter resultados e respostas melhores. Porém,

com o avanço da pesquisa do grupo e a busca de um sistema que produzisse a hispidina ou uma de suas formas glicosiladas, o estudo de extratos de outras plantas começou a ser realizado, como pode ser visto na sessão 3.2.

Figura 5. (a) Cromatograma de íons totais da amostra de extrato etanólico de cavalinha mostrando todos os sinais de íons que foram detectados em modo varredura pelo espectrômetro de massas QTOF. (b) Cromatogramas de íons extraído da mesma injeção para m/z 423,0933, mesma razão do composto equisetumpirona, com sinal em 11,07 min, que também é possível observar no TIC dessa corrida.

Figura 6. Espectro de massas do sinal em 11,07 min da Figura 4, $m/z=423,0933$ com grande abundância. Erro de massas de -0,2ppm.

3.2 EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos de orquídea comercial do gênero *Cattleya*, lentilha d'água (*Lemna* sp.) e alface d'água (*Pistia* sp.), bem como padrões qualitativos de hispidina e equisetumpirona, foram analisados em um espectrômetro triplo quadrupolo. Nesta análise foram utilizados os cromatogramas MRM das transições mencionadas para a na parte experimental para a hispidina (Figura 7) e equisetumpirona (Figura 8).

Neste estudo, utilizou-se a estratégia de otimizar as energias de colisão para obter o melhor sinal de íons fragmento para as reações características. A partir das transições otimizadas obtidas, foram feitas análises dos extratos em busca de hispidina e equisetumpirona. Apenas a amostra de orquídea mostrou algum sinal para hispidina, como é possível visualizar nos resultados. A utilização de monitoramento de reações específicas dos íons de interesse, como descrito acima, compreende analisar o íon precursor no primeiro quadrupolo, induzir sua dissociação na célula de colisão e, monitorar um ou mais íons fragmento no segundo quadrupolo. Um sinal de absorção em 254 nm foi monitorado em todas as corridas, mas nenhum pico foi detectado.

Pouco tempo após a descrição da molécula precursora da luciferina fúngica, isto é, a hispidina, foi possível ter acesso a padrões dessa molécula, bem como tivemos acesso a padrões de equisetumpirona, purificados a partir de extratos do estróbilo de *E. hyemale* coletados pelos alunos do grupo, Dr. Hans E. Waldenmaier e Dra. Tatiana A. Pereira. A partir desses padrões foi iniciado o trabalho com o triplo quadrupolo. A estratégia era otimizar um método de monitoramento MRM, capaz de identificar as substâncias de interesse (hispidina e equisetumpirona) para que, em um primeiro momento, utilizássemos na descoberta de fontes alternativas de hispidina e equisetumpirona e, posteriormente, pudéssemos criar métodos de quantificação a partir dos métodos de detecção.

É possível perceber alguma diferença entre um padrão comercial de alta pureza de hispidina na (Figura 7), com sinais intensos e linha de base mais limpa, e um padrão de purificação de extratos vegetais, como é o caso do padrão de equisetumpirona, obtido através da purificação de extratos de *Catleya*, utilizado (Figura 8) em que o cromatograma mostra um pico de baixa intensidade com uma base bastante larga e ruidosa. Já o cromatograma da transição MRM 423,0933 $\rightarrow$ 158,90 (b), mostra um sinal mais limpo. Os picos menores tratam-se possivelmente de compostos de massa e estrutura muito próximas a equisetumpirona que geram os mesmos íons durante a fragmentação. Também é possível tratar-se de moléculas maiores que se fragmentaram na fonte de íons gerando o íon precursor com a mesma m/z do íon precursor da equisetumpirona, apesar do tempo de retenção diferente.

No cromatograma da transição MRM 247,06 $\rightarrow$ 69,1 (Figura 9), correspondente a amostra de orquídea do gênero *Catleya*, única amostra do grupo em que encontramos algum sinal uma das moléculas procuradas, a hispidina, podemos ver um pico de hispidina de intensidade baixa, bastante próxima perto do ruído, possivelmente devido a supressão de ionização por outros compostos coeluinto devido a uma separação cromatográfica pobre, ou mesmo por baixo teor.

Figura 7. Diferentes cromatogramas para a mesma injeção de padrão de hispidina no LC-MS/MS triplo quadrupolo. Cromatogramas para as duas transições monitoradas para a hispidina: (a) transição MRM 247,06 → 77,1 e (b) transição MRM 247,06 → 69,1, que é a transição mais intensa da hispidina. Na figura é possível verificar a concordância das transições com o TIC da mesma injeção

Figura 8. Cromatograma da transição MRM 423,0933 → 158,90, obtido injeção de padrão purificado de extrato vegetal.

Figura 9. Cromatograma da transição MRM 247,06 → 69,1 para a amostra de orquídea do gênero *Catleya*.

Observando-se os cromatogramas dos padrões é possível observar que os sinais obtidos para a hispidina são muito mais intensos e bem definidos que os sinais da equisetumpirona. Embora ainda estivessem sendo usados padrões de concentração desconhecida, possivelmente a diferença seria devido a origem dos padrões. Enquanto o padrão de hispidina era comercial (Sigma-Aldrich, EUA), com alta pureza, o padrão de equisetumpirona foi conseguido através de purificação de extratos vegetais e, sendo uma molécula lábil, pode ter sofrido alguma degradação tanto no processo de purificação como pelo tempo de armazenamento. Também é possível que a otimização de m/z não estivesse adequada, porém o relatório de otimização

retornou com bons valores de intensidade para as transições consideradas. A única amostra em que alguma hispidina foi detectada foi na amostra de orquídea, com um sinal bastante fraco. Posteriormente, foi realizada mudança no método que possibilitou melhora no sinal das amostras nessa etapa. Nenhum dos extratos vegetais apresentou presença de equisetumpirona. É interessante também apontar que a equisetumpirona pode hidrolisar e forma 3-hidróxi-hispidina (luciferina), que, por sinal, é bem instável, e poderia se degradar. Até esta parte do projeto as corridas ainda levavam 25 min para a separação cromatográfica ocorrer, no entanto, maiores tempos de análise foram empregados na sessão 3.3, para conseguir melhores resultados.

3.3 ENSAIO QUANTITATIVO

Após os testes com extratos vegetais, e novos avanços do grupo de pesquisa foi possível consolidar o papel da hispidina na bioluminescência em fungos definitivamente, através da publicação de um artigo (Oba et al, 2017) em que refuta-se as críticas do modelo de bioluminescência baseado em hispidina, pela sua baixa concentração nos fungos bioluminescentes, mostrando que a hispidina, precursor da luciferina, é reciclada no processo de bioluminescência, e por isso não necessita de concentrações mais altas nos fungos.

Para essa publicação a quantificação foi gerada uma curva analítica (Figura 10) contra a qual foram analisadas amostras dos extratos de corpos de frutificação secos e micélios frescos do fungo *N. gardneri*, obtidas através de dois protocolos de extração, cujos resultados são apresentados a seguir (Tabela 7).

Figura 10. Curva analítica para a hispidina construída com cinco níveis em triplicata de padrão comercial de hispidina com coeficiente $r^2=0.9338$, utilizada para calcular as concentrações de hispidina (Tabela 3).

Tabela 7. Resultados da quantificação de hispidina em corpos secos de frutificação e micélios de cultura do fungo *Neonothopanus gardneri*, obtidos através dos métodos de extração do grupo de pesquisa do Prof. Oba, identificado como “OBA” na tabela e utilizando método de extração com extrator ASE300, identificado como “ASE” na tabela.

<i>Material</i>	<i>Extração</i>	<i>Hispidina ($\mu\text{mol g}^{-1}$)</i>
Corpos de frutificação secos de fungos	Método de extração convencional (OBA)	117
Corpos de frutificação secos de fungos	Extração assistida com solvente (ASE)	1224
Micélios de fungos	Método de extração convencional (OBA)	26
Micélios de fungos	Extração assistida com solvente (ASE)	36

A determinação da quantidade de hispidina em fungos bioluminescentes brasileiros e japoneses, realizado em colaboração com o grupo do Prof. Oba e que rendeu uma publicação no Photochemical and Photobiological Sciences (Oba et al. 2017), foi importante para se compreender pontos chave nas análises por LC-MS: a importância da separação cromatografia. As corridas de 25 min funcionaram para

detectar a presença de hispidina em amostras, mas a quantificação das amostras ficou muito complicada nessas corridas. Mesmo nas curvas que foram construídas com padrão diluído observou-se uma melhora considerável quando as curvas foram realizadas com fluxo de gradiente mais lento. Houve melhora de sinal, porém com a utilização de padrão interno. Esse foi o ensaio mais importante para a compreensão da técnica e também o mais longo, levando-se em conta que cada tentativa de curva com 5 pontos em triplicata levou cerca de 15 h. Adicionalmente, tendo em vista que, tanto os padrões como as amostras degradavam muito rápido, estudar essas curvas foi também o maior desafio desse trabalho.

Revisando o trabalho para esta dissertação, tornou-se evidente que talvez a melhor escolha para o modelo de calibração descrito não fosse uma regressão linear, mas antes um outro modelo de curva. No software Masshunter há um assistente de curvas em que é possível verificar a melhor regressão a ser utilizada, baseado nos melhores coeficientes de relação dos pontos com a curva.

Como os dados utilizados para a curva publicada foram perdidos, utilizou-se um conjunto de dados semelhante para recriar a curva com a melhor regressão baseada nesse assistente, que podemos ver na figura 11.

Figura 11. Curva de calibração para hispidina com regressão otimizada utilizando assistente de curvas do software Masshunter. Coeficiente $r^2=0,9922$.

3.4 HISPIDINA E METABÓLITOS

O presente ensaio surge na necessidade de separar a hispidina e precursores, os ácidos cafeico, cinâmico e cumárico, para preparar um método quantitativo que permita a determinação da concentração dessas quatro espécies simultaneamente.

Nesta etapa observam-se dois conjuntos de resultados, referentes aos padrões dos ácidos cumárico, cinâmico e cafeico (Figuras 12 e 13), analisados por massas e por absorção UV, e as amostras dos extratos orgânicos e aquosos de micélios frescos extraídos de uma, duas e três placas de cultura do fungo *N. gardneri*, (Figura 14) com a finalidade de avaliar a relação entre a melhor condição, aquosa ou orgânica, e melhor número de placas e a qualidade dos cromatogramas MRM para cada transição, avaliando intensidade e sinal. Nas amostras também foi avaliado o sinal da hispidina, cujo padrão não foi injetado nessa etapa devido ao conhecimento prévio das transições a serem monitoradas.

Figura 12. Cromatograma TIC dos padrões de ácidos cafeico, cinâmico e cumárico.

Figura 13. Sinal de absorção UV em 220 nm de um mix de padrões de hispidina, ácidos cafeico, cinâmico e cumárico. Teste realizado para comparar os tempos de retenção no massas com os tempos observados para cada padrão por absorção.

O último ensaio, está ainda em andamento, relacionado com a detecção de hispidina e outros metabólitos envolvidos em sua biossíntese, no micélio do fungo *N. gardneri* cultivado sob ritmo claro/escuro. A manutenção das culturas e preparação dos extratos vem sendo realizada pela aluna Bianca de Barros Nobrega. Nesse trabalho conseguiu-se chegar até a parte de otimizar as transições MRM para três metabólitos do fungo (Figura 13) e observá-los junto com a hispidina na mesma corrida de extrato fúngico, obtido com extrator ASE.

Notamos ainda a falta de correlação entre as eluições nas figuras 14 e 15 com a figura 16. Devido ao ácido cinâmico ser o composto mais apolar dos três ácidos (ácido cinâmico, ácido cafeico e ácido cumárico) a eluição seria esperada bem depois dos outros ácidos, e não antes do ácido cumárico.

Finalmente, analisando os experimentos realizados neste trabalho nota-se uma evolução interessante. Deu-se início com ensaios de caracterização utilizando um espectrômetro QTOF e de identificação da hispidina e derivados por triplo quadrupolo, finalizando com ensaios para sua quantificação e o início do estudo para a quantificação dos seus intermediários biossintéticos, os ácidos cafeico, cumárico e cinâmico, em uma mesma corrida.

Figura 14. Cromatogramas obtidos para injeção do extrato em fase orgânica, obtido de 2 placas de cultura de micélio fresco do fungo *Neonothopanus gardneri*. (a) TIC com os picos de cada composto, seguido das transições MRM para hispidina (b); ácido cafeico (d) e (e); ácido cumárico (f); ácido cinâmico, (g) e (h). Tempo de retenção fora do esperado para o ácido cumárico, revela problemas com esta transição.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Como conclusões finais desta dissertação de mestrado, alguns pontos podem ser citados, embora seja necessário fazer uma observação importante, como o objetivo inicial do trabalho era caracterizar a luciferina fúngica, que hoje sabe-se ser a 3-hidróxihipidina, as diferentes etapas do trabalho refletem diferentes etapas do processo de compreensão do mecanismo da reação envolvendo hispidina, as enzimas responsáveis pela conversão da hispidina em 3-hidróxihipidina e pela reação bioluminescente.

No trabalho com QTOF, somente foi possível identificar uma m/z de interesse nos extratos de cavalinha, porém não se conseguiu confirmar tratar-se de equisetumpirona. Não foi detectada m/z de hispidina, porém, foi possível detectar a hispidina, por LC-MS/MS triplo quadrupolo, no extrato de orquídea, como já se supunha, não sendo possível detectar a equisetumpirona. Estes resultados são importantes nesta etapa pois havia o interesse em se encontrar plantas que produzissem hispidina ou outro derivado, a fim de criar plantas bioluminescentes, pela expressão das enzimas necessárias.

Quantificou-se por LC-MS/MS triplo quadrupolo, hispidina em micélios e corpos secos de frutificação secos de *N. gardneri* e dois métodos de extração foram comparados, chegando-se a conclusão de que o protocolo de extração com ASE300 é mais eficiente para extração de hispidina. Este resultado foi de suma importância para encerrar discussão que vinha sendo reportada na literatura que talvez a hispidina não estivesse envolvida na BL de fungos.

Também se conseguiu um método por LC-MS/MS triplo quadrupolo capaz de separar hispidina e os ácidos cafeico, cinâmico e cumárico. Tudo indica que será possível empregar esse método quantitativamente, o que é muito importante para os próximos estudos de síntese da 3-hidróxihipidina e expressão da BL em fungos.

Além disso, também foi possível alcançar outros objetivos mencionados na introdução desta dissertação, ou seja, auxiliar o grupo de pesquisa do Prof. Stevani no estudo do mecanismo da BL de fungos. Saliento também meu grande desenvolvimento na compreensão, utilização e interpretação de resultados obtidos pela técnica de espectrometria de massas, em diversos contextos, o qual tenho certeza que me tornou um profissional mais capacitado na empresa em que trabalho.

5 REFERÊNCIAS

- AIRTH, R. L.; FOERSTER, G. E. Some aspects of fungal bioluminescence. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 56, n. 3, p. 173–182, 6 set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcp.1030560307>>.
- ARISTOTLE. **De Anima (On the Soul)**. [s.l.] J.A. Smith, [s.d.]
- BERLINER, M. D. Diurnal Periodicity of Luminescence in Three Basidiomycetes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 134, n. 3481, p. 740, set. 1961.
- BOYLE, R. Observations and tryals about the resemblances and differences between a burning coal and shinning wood. 1666.
- CALLEJA, G. B.; REYNOLDS, G. T. The oscillatory nature of fungal luminescence. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 149–154, 1970. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153670801073>>.
- DESJARDIN, D. E.; OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. Fungi bioluminescence revisited. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 170, 11 fev. 2008. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b713328f>>. Acesso em: 14 fev. 2018.
- DUNLAP, J. C.; HASTINGS, J. W.; SHIMOMURA, O. Dinoflagellate luciferin is structurally related to chlorophyll. **FEBS Letters**, v. 135, n. 2, p. 273–276, 4 set. 2018. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80799-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80799-5)>.
- FRANCESCATO, L. N.; DEBENEDETTI, S. L.; SCHWANZ, T. G.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T. Identification of phenolic compounds in Equisetum giganteum by LC–ESI–MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v. 105, p. 192–203, 15 fev. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914012010259?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 fev. 2018.
- HOFFMANN, E. de.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry : principles and applications**. [s.l.] J. Wiley, 2007.
- KASKOVA, Z. M.; DÖRR, F. A.; PETUSHKOV, V. N.; PURTOV, K. V.; TSARKOVA, A. S.; RODIONOVA, N. S.; MINEEV, K. S.; GUGLYA, E. B.; KOTLOBAY, A.; BALEEVA, N. S.; BARANOV, M. S.; ARSENIYEV, A. S.; GITELSON, J. I.; LUKYANOV, S.; SUZUKI, Y.; KANIE, S.; PINTO, E.; DI MASCIO, P.; WALDENMAIER, H. E.; PEREIRA, T. A.; CARVALHO, R. P.; OLIVEIRA, A. G.; OBA, Y.; BASTOS, E. L.; STEVANI, C. V.; YAMPOLSKY, I. V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. **Science Advances**, v. 3, n. 4, p. e1602847, 26 abr. 2017. Disponível em: <<http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1602847>>. Acesso em: 28 fev. 2018.
- MACHERONE, A. Resolving Power and Mass Resolution Instrument Resolving Power and Mass Resolution. **Analysis. In Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 61, p. 471–490, 2013.
- MENDES, L. F.; BASTOS, E. L.; DESJARDIN, D. E.; STEVANI, C. V. Influence of Culture Conditions on Mycelial Growth and Bioluminescence of *Gerronema Viridilucens*. **FEMS microbiology letters**, v. 282, n. 1, p. 132–139, maio 2008.
- MIHAIL, J. D. Comparative bioluminescence dynamics among multiple *Armillaria gallica*, *A. mellea*, and *A. tabescens* genets. **Fungal biology**, v. 117, n. 3, p. 202–210, mar. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.01.008>>.
- MIHAIL, J. D.; BRUHN, J. N. Dynamics of Bioluminescence by *Armillaria Gallica*, *A. Mellea* and *A.*

Tabescens. **Mycologia**, v. 99, n. 3, p. 341–350, 2007.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, R. P.; WALDENMAIER, H. E.; STEVANI, C. V. BIOLUMINESCÊNCIA DE FUNGOS: DISTRIBUIÇÃO, FUNÇÃO E MECANISMO DE EMISSÃO DE LUZ. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. 314–319, 2013. Disponível em: <<http://submission.quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2013/vol36n2/17-RV12419.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 10, p. 1416, 1 out. 2009. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b908982a>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V.; WALDENMAIER, H. E.; VIVIANI, V.; EMERSON, J. M.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. **Current biology : CB**, v. 25, n. 7, p. 964–8, 30 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802150>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

PURTOV, K. V.; PETUSHKOV, V. N.; BARANOV, M. S.; MINEEV, K. S.; RODIONOVA, N. S.; KASKOVA, Z. M.; TSARKOVA, A. S.; PETUNIN, A. I.; BONDAR, V. S.; RODICHEVA, E. K.; MEDVEDEVA, S. E.; OBA, Y.; OBA, Y.; ARSENIYEV, A. S.; LUKYANOV, S.; GITELSON, J. I.; YAMPOLSKY, I. V. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 28, p. 8124–8128, 6 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094784>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

RUGGIERO, M. A.; GORDON, D. P.; ORRELL, T. M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T.; BRUSCA, R. C.; CAVALIER-SMITH, T.; GUIRY, M. D.; KIRK, P. M. A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0119248, 29 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4418965/>>.

SHIMOMURA, O.; MUSICKI, B.; KISHI, Y. Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to Ca^{2+} ions. **Biochemical Journal**, v. 261, n. 3, p. 913 LP-920, 1 ago. 1989. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/content/261/3/913.abstract>>.

SKOOG 1918-2008 (VIAF)14845221, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis : Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman**. 5th ed. / ed. [s.l.] Belmont (Calif.) : Brooks/Cole, 1998.

SNYDER, R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, 1997. .

VASSIL'EV, R. F.; VICHUTINSKII, A. A. Chemiluminescence and Oxidation. **Nature**, v. 194, p. 1276, 30 jun. 1962. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/1941276a0>>.

VEIT, M. Styrylpyrone biosynthesis in Equisetum Arvense. **Phytochemistry**, v. Vol. 44, N, n. 96, 1997.