UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Bioprospecção de cianobactérias brasileiras dirigida à obtenção de
cianopeptídeos inibidores de proteases

Fernanda Cristina Rodrigues de Paiva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Bioprospecção de cianobactérias brasileiras dirigida à obtenção de
cianopeptídeos inibidores de proteases

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Fernanda Cristina Rodrigues de Paiva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Paiva, Fernanda Cristina Rodrigues de
P149b Bioprospecção de cianobactérias brasileiras dirigida à obtenção
de cianopeptídeos inibidores de proteases / Fernanda Cristina
Rodrigues de Paiva. -- São Paulo, 2015.
107p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Bioquímica : Toxicologia 2. Metabólitos secundários I. T.
II. Pinto, Ernani, orientador.

615.9 CDD

Fernanda Cristina Rodrigues de Paiva

Bioprospecção de cianobactérias brasileiras dirigida à obtenção de
cianopeptídeos inibidores de proteases

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

Profa. Marli de Fátima Fiore
1º examinador

Prof. Augusto Etchegaray Júnior
2º examinador

São Paulo, 13 de abril de 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Agradecimentos

A Deus e aos santos que sempre me abençoaram dando-me alento, força e coragem.

Aos meus pais que são minha vida, fonte de inspiração e porto seguro! Exemplos de caráter e amor incondicional! Obrigada por me enriquecerem com sabedoria e ensinamentos diários.

Aos meus familiares sem os quais não sou ninguém. Muito obrigada por serem luz e alegria em minha vida.

Ao meu grande amor e amigo João pelo companheirismo, suporte e incentivo!

Ao Prof. Ernani pelo carinho e oportunidade e aos amigos do LTPNA que tornaram o dia-a-dia desses dois anos mais leve.

Aos meus mestres e amigos do Laboratório de Ficologia da UFMG que me ensinaram a viver a biologia.

À FAPESP, à CAPES, ao CNPq e à USP pelo auxílio financeiro.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização desse sonho, meu eterno agradecimento!

RESUMO

PAIVA, FCR. **Bioprospecção de cianobactérias brasileiras dirigida à obtenção de cianopeptídeos inibidores de proteases**. 2015. 54f (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Algumas espécies de cianobactérias podem produzir diferentes tipos de peptídeos bioativos (cianopeptídeos), como aeruginosinas, cianopeptolinas, microgininas, microviridinas, anabaenopeptinas e microcistinas. As microcistinas, que compõem a classe mais conhecida na literatura científica, são hepatotoxinas e inibem fosfatases do tipo 1 e 2A. Já as microgininas, moléculas inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ECA) e de outras proteases, são importantes candidatas ao desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos. No entanto, as funções fisiológicas desses compostos ainda não foram completamente elucidadas.

O objetivo desse estudo é identificar e isolar cianopeptídeos, especialmente da classe das microgininas, produzidos por cepas de cianobactérias brasileiras. O fracionamento dos extratos das cianobactérias foi biomonitorado por meio de ensaios de inibição da ECA. Para tanto, foram produzidos extratos de culturas de 59 cepas de cianobactérias mantidas em laboratório e, quando pertinente, seguiu-se o pré-fracionamento por extração em fase sólida em coluna de fase reversa. As frações obtidas foram testadas para a inibição da ECA e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Nos casos em que houve inibição, o fracionamento foi continuado por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa para o isolamento dos cianopeptídeos.

As espécies analisadas pertencem aos gêneros: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Radiocystis*, *Sphaerocavum*, *Sphaerospermopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya*, *Pleurocapsa*, *Chroococcidiopsis*, *Nostoc*, *Brasilonema*, *Desmonostoc*, *Oculatella* e *Limnothrix*. Além de outras espécies das famílias *Pseudanabaenaceae*, *Nostocaceae* e *Michochaetaceae* que não tiveram suas identificações concluídas. Nas análises por HPLC-DAD não foram encontrados picos com espectros de UV característicos de microgininas nas 59 cepas avaliadas. Esses resultados foram corroborados por análises por LC-MS, nas quais também não foi possível a detecção desses compostos. Como método de triagem, as análises por LC-MS triplo quadrupolo foram conduzidas via *precursor ion scan* para o monitoramento das perdas m/z 128 e 142, que são fragmentos oriundos do aminoácido Ahda, exclusivamente presente em microgininas. Algumas linhagens se revelaram produtoras de variantes do cianopeptídeo microcistina, possuindo absorção UV máxima em 238 nm. Amostras de Israel, doadas pelo Prof. Shmuel Carmeli, da Universidade de Tel Aviv, também foram analisadas por espectrometria de massas no modo *precursor ion* para a investigação da produção de microgininas. Foram encontrados íons de m/z 128 e 142 em uma das amostras de Israel.

Ensaio enzimáticos iniciais da ECA foram realizados com frações das cepas controle LTPNA 08 e 09, sabidamente produtoras de microgininas. Realizou-se a otimização do método inicial de detecção dos cianopeptídeos para que fosse procedido o isolamento dos compostos de interesse da cultura LTPNA 08. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e isoladas por um coletor de frações. 4,8 mg de microgininas foram obtidos com o isolamento das moléculas a partir de 3 g de biomassa seca da linhagem. Ensaio enzimáticos de inibição da ECA com as frações isoladas de microgininas e microcistina-LR comercial também foram realizados. Os resultados mostram que tanto as microgininas quanto a microcistina-LR comercial apresentam potencial de inibição da enzima ECA. As microgininas e a microcistina-LR podem ser consideradas como novas moléculas a serem estudadas para o desenvolvimento de fármacos inibidores da ECA. Continuar a investigação da produção desses compostos é relevante tanto por seu potencial ecotoxicológico quanto por seu potencial farmacológico.

Palavras-chave: cianobactérias; cianopeptídeos; metabólitos secundários; LC-MS.

ABSTRACT

PAIVA, FCR. **Bioprospection of Brazilian cyanobacteria strains in order to obtain cyanopeptides inhibitors of proteases.** 2015. 54f (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Some cyanobacterial species can produce different types of bioactive peptides (cyanopeptides), such as aeruginosins, cyanopeptolins, microginins, microviridins, anabaenopeptins and microcystins. Microcystins are well known in the scientific literature as hepatotoxins that inhibit phosphatases type 1 and 2A. Microginins are reported as inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE) and other proteases, being important candidates for the development of anti-hypertensive compounds. Nevertheless, the physiological functions of these compounds have not been fully elucidated.

The aim of this study is to isolate and identify cyanopeptides, namely microginins, produced by Brazilian cyanobacterial strains. The fractionation of cyanobacterial extracts was screened by ACE inhibition assays. Extracts of 59 cyanobacterial strains were produced from cultures cultivated under laboratory conditions and, in cases where microginins were found, prefractionation were carried out by solid phase extraction on a reverse phase column. The fractions obtained were tested for inhibition of ACE and analyzed by liquid chromatographymass spectrometry (LC-MS) by using precursor ion scan to monitor the loss of m/z 128 and 142, typical fragments detected from the amino acid Ahda, which is exclusively found in microginins. In cases where fractions demonstrated inhibitory activity, the fractionation was continued by semi-preparative high performance liquid chromatography for the isolation of cyanopeptides.

The analyzed species belong to the genere: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Radiocystis*, *Sphaerocavum*, *Sphaerospermopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya*, *Pleurocapsa*, *Chroococidiopsis*, *Nostoc*, *Brasilonema*, *Desmonostoc*, *Oculatella* and *Limnothrix*. And other species of *Pseudanabaenaceae*, *Nostocaceae* and *Michochaetaceae* families did not have their peptides completely characterized. Analyses of HPLC-DAD did not revealed characteristic features by UV spectra of microginins in the 59 strains. These results were corroborated by analyses of LC-MS triple quadrupole, microginins were not detected as well. Some strains were positive for microcystin variants, showing maximum UV absorption at 238 nm and typical MS/MS spectra. Initial enzyme assays for the inhibition of ACE were performed with fractions of the control strains LTPNA 08 and 09, known as microginins' producers. Samples from Israel, kindly donated by Prof. Shmuel Carmeli, of Tel Aviv University, were analyzed by mass spectrometry in the *precursor ion* mode for the investigation of microginins. Ions m/z 128 and 142 were founded on one sample of Israel.

A HPLC method was optimized for the detection and isolation of cyanopeptides produced by culture LTPNA 08. Fractions isolated by semi-preparative HPLC were analyzed by LC-MS and collected when UV and MS spectra were characteristically similar to microginins . 4.8 mg of microginins were obtained by semi-preparative HPLC from 3 g of dried strains. The inhibition assays of ECA were performed with fractions of microginins and microcystin-LR analytical standard. The results showed that microginins as well as microcystin-LR have the potential of inhibiting ACE. Microginins and microcystin-LR can be considered as target molecules for the study of ACE inhibitors. Further research on the production of these classes of peptides is relevant because of its ecotoxicological and pharmacological potential.

Keywords: cyanobacteria; cyanopeptides; secondary metabolites; LC–MS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de aminoácidos dos congêneres de microgininas (Adaptado de Carneiro <i>et al.</i> (49)).....	23
Tabela 2 - Medida das absorbâncias das soluções de tirosina por espectrofotometria (média das determinações para cada concentração; n = 3) – Experimento 10.	77
Tabela 3 - Medida das absorbâncias das soluções de tirosina por espectrofotometria (média das determinações para cada concentração; n = 3) – Experimento 11.	77
Tabela 4 – Atividades inibitórias da ECA por algumas microgininas.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química geral das principais toxinas produzidas por cianobactérias (Adda: ácido 3-amino-2-hidróxidecanoico).	21
Figura 2 - Estrutura química de algumas variantes das principais classes de cianopeptídeos.	22
Figura 3 – Estrutura das microgininas MG756 (R=H) e MG770 (R=CH ₃). Adaptado de Carneiro <i>et al.</i> (2012) (49). Onde: (1) ácido 3-amino-2-hidróxidecanoico; (2) valina; (3) leucina; (4) homotirosina; (5) tirosina.	26
Figura 4 - Hidrólise de Hip-His-Leu pela ECA. (Adaptado de Bhuyan e Mugesh (2011) (61)).	28
Figura 5 - Estrutura química de alguns inibidores sintéticos atualmente usados no tratamento da hipertensão em seres humanos.	29
Figura 6 – Curvas de crescimento das cepas LTPNA 08 e LTPNA 09, respectivamente.	55
Figura 7 – Cromatograma obtido na análise por HPLC-DAD (Shimadzu®). de extrato bruto das linhagens (a) LTPNA 08 e (b) LTPNA 09. Os picos numerados	

correspondem a diferentes compostos, onde: (1) MC-RR; (2) pico desconhecido; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. As duas cepas apresentam o mesmo perfil de produção de compostos. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹..... 56

Figura 8 - Espectros de absorção obtidos do cromatograma da Figura 7 pelo detector DAD nas faixas de 200 a 700 nm, onde: (a) MC-RR; (b) MC-LR; (c e d) microgininas 756 e 770; (e) pico desconhecido. 57

Figura 9 - Corrida cromatográfica de uma mistura de padrões comerciais de microcistinas, onde: (A) MC-RR; (B) MC-YR; (C) MC-LR; (D) MC-LA. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹ 57

Figura 10 – Cromatogramas em HPLC-DAD (Shimadzu®), em 276 nm de representantes das 59 cepas analisadas, segundo metodologia descrita por Lawton *et al.*(1994) (78). A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹ 58

Figura 11 – Espectros de absorção no UV-VIS característicos de (a) microcistinas e (b) microgininas obtidos em HPLC-DAD (Shimadzu®)..... 59

Figura 12 – Cromatogramas do extrato da linhagem LTPNA 08 após a etapa de extração em SPE com lavagens de diferentes porcentagens de metanol, onde: (1) MC-RR; (2) pico desconhecido ; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando

como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹. 59

Figura 13 – Cromatogramas do extrato da linhagem LTPNA 08 após a etapa de extração em SPE com lavagens utilizando diferentes porcentagens de metanol, onde: (1) MC-RR; (2) pico desconhecido; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹. 60

Figura 14 - Corridas cromatográficas da extração líquido-líquido. O pico 1 mostra a molécula desconhecida, indicando que ela é removida na extração com acetato de etila. Onde: (1) pico desconhecido; (2) MC-RR; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹. 61

Figura 15 – Cromatogramas gerados em sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity acoplado a espectrômetro de massas triplo-quadrupolo monitorando-se os íons produto de *m/z* 128 e 142. (a) Exemplos de cromatogramas gerados pelas cepas analisadas; (b) Cepas controle do gênero *Microcystis*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se nitrogênio como gás de colisão. 62

Figura 16 – Espectros MS das microgininas (a) 770 e (b) 756 das cepas controle. Os espectros foram obtidos por espectrômetro de massas triplo quadrupolo, *electrospray* no modo positivo utilizando-se o modo de operação *precursor ion*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm;

Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. 63

Figura 17 - Espectros de massas em MS² das duas microgininas (a – MG770 e b – MG756) das cepas controle. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-TOF. Os íons produto de *m/z* 142 e 128, característicos das microgininas, estão circulados. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). 64

Figura 18 – Espectro de massa em MS que deu origem aos espectros MS² da Figura 17. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-TOF. As microgininas 756 e 770 estão circuladas. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). 65

Figura 19 – Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (Shimadzu®) de ensaios iniciais com a ECA utilizando a metodologia de Wang *et al.* (2013) (62), onde: (a) HHL; (b) HA; (c) separação entre HHL e HA; (d) captopril inibindo a formação do produto; (e) formação de produto. A separação ocorreu em coluna de fase reversa (Luna C18(2), 150 x 3,0 mm, 3 µm; Phenomenex®, EUA) utilizando-se (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético e 0,05% trietilamina e (B) acetonitrila como fase móvel, na proporção 70:30 de A:B. A eluição utilizada foi isocrática e a formação de ácido hipúrico (HA) monitorada em comprimento de onda de 226 nm. 66

Figura 20 – Espectros de UV do (a) substrato HHL (tempo de retenção = 4,58 min) e (b) do produto HA (tempo de retenção = 5,25 min) obtidos pelo detector DAD..... 66

Figura 21 - Atividade residual da enzima e inibição em porcentagem da formação do produto HA de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013)(62). Frações em triplicata. 67

Figura 22 – Espectros gerados em sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity acoplado a espectrômetro de massas triplo-quadrupolo com fonte de ionização *electrospray* monitorando-se os íons produto de m/z 128 e 142. O espectrômetro foi operado no modo positivo utilizando-se varredura do tipo *precursor ion*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. (a) Amostra IL-349 (128-em vermelho/142-em verde) (b) Amostra AL-9.4 (128-em vermelho/142-em azul) (c) Amostra IL-428 (128-em preto/142-em roxo) 69

Figura 23 - Espectros dos íons precursores dos picos de m/z 128 e 142 encontrados na amostra AL-9.4 (a) primeiro pico (b) segundo pico (c) terceiro pico (d) quarto pico e (e) quinto pico da Figura 22. Os espectros foram obtidos por espectrômetro de massas triplo quadrupolo, *electrospray* no modo positivo utilizando-se o modo de operação *precursor ion*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. 70

Figura 24 – Gráfico dos gradientes utilizados nas corridas cromatográficas do método inicial de detecção dos compostos de interesse e do método otimizado para isolamento das microgininas. 71

Figura 25 - Cromatogramas e espectros de UV da fração de SPE de lavagem com 60% de metanol da linhagem LTPNA, onde em (a) e (b): (0) MC-LR; (1 e 2) microgininas (MG756 e MG770); (3) final do pico da microginina majoritária. Os espectros de UV (c), (d) e (e) correspondem respectivamente à

microcistina-LR e às microgininas 756 e 770. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 µm, Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 3,5 mL.min⁻¹. O pico rajado de número 2 mostra a fração que foi isolada. 72

Figura 26 - Cromatogramas e espectros de UV da fração de SPE de lavagem com 80% de metanol da linhagem LTPNA, onde em (a) e (b): (0) MC-LR; (2 e 3) microgininas (MG756 e MG770); (4) final do pico da microginina majoritária. Os espectros de UV (c), (d) e (e) correspondem respectivamente à microcistina-LR e às microgininas 756 e 770. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 µm, Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 3,5 mL.min⁻¹. O pico rajado de número 3 mostra a fração que foi isolada. 73

Figura 27 - Espectros de massas da fração de microgininas pós-isolamento. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-QTOFII . Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Onde: (a) espectro de massas da fração de microgininas (b) MG756 (c) MG770; (d) contaminante da fração. 74

Figura 28 - Cromatogramas e espectros de UV da fração de SPE de lavagem com 60% de metanol da linhagem LTPNA, onde em (a) e (b): (0) MC-LR; (1 e 2) microgininas (MG756 e MG770). Os espectros de UV (c), (d) e (e) correspondem respectivamente à microcistina-LR e às microgininas 756 e 770. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 µm, Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol

com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 3,5 mL.min⁻¹. O pico rajado de número 2 mostra a fração que foi isolada. 75

Figura 29 - Espectros de massas da fração de microgininas pós-isolamento. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-QTOFII . Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Onde: (a) espectro de massas da fração de microgininas (b) MG756 (c) MG770; (d) contaminante da fração..... 76

Figura 30 – Curva padrão obtida das soluções de tirosina nas concentrações de 1 mM, 0,4 mM, 0,1 mM, 0,01 mM em NaOH 0,1 M - Experimento 10..... 78

Figura 31 – Curva padrão obtida das soluções de tirosina nas concentrações de 1 mM, 0,4 mM, 0,1 mM, 0,01 mM em NaOH 0,1 M – Experimento 11..... 78

Figura 32 - Atividade residual da ECA (0,1 U/mL) e inibição em porcentagem da formação do produto HA de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013)(62). Foram utilizados os inibidores captopril (C), microcistina-LR (MC) e fração de microgininas (MG) em diferentes concentrações em triplicata. 80

Figura 33 - Atividade residual da ECA (0,2 U/mL) e inibição em porcentagem da formação do produto HA de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013)(62). Foram utilizados os inibidores captopril (C), microcistina-LR (MC) e fração de microgininas (MG) em diferentes concentrações em triplicata. 82

Figura 34 - Estrutura das microgininas MG756 (R=H) e MG770 (R=CH₃). Adaptado de Carneiro *et al.* (2012) (49). Onde: (1) ácido 3-amino-2-hidróxi-decanoico; (2) valina; (3) leucina; (4) homotirosina; (5) tirosina. 87

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Cianobactérias e cianopeptídeos	17
1.2 Microgininas	21
1.3 Hipertensão arterial	25
1.4 Descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	27
1.5 Análises estrutural e de atividade.....	28
1.6 Justificativa.....	30
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Experimento 1 – Contagem de células das cepas controle sabidamente produtoras de microgininas	33
3.2 Experimento 2 – Cultivo e manutenção das linhagens analisadas.....	33
3.3 Experimento 3 – Análise das linhagens por HPLC.....	34
3.4 Experimento 4 – Testes de extração e pré-fracionamento de cianopeptídeos com as cepas controle	35
3.5 Experimento 5 - Análise de microgininas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)	38
3.6 Experimento 6 - Ensaio enzimático inicial – Enzima conversora de angiotensina (ECA)	40
3.7 Experimento 7 – Avaliação de extratos de cianobactérias potencialmente produtoras de microgininas	42
3.8 Experimento 8 - Isolamento e Purificação de Microgininas	44

3.9 Experimento 9 - Quantificação das frações de microgininas por espectrofotometria.....	47
3.10 Experimento 10 - Ensaio enzimático com compostos isolados – Enzima conversora de angiotensina (ECA) (0,1 U/mL).....	48
3.11 Experimento 11 – Segundo ensaio enzimático com compostos isolados – Enzima conversora de angiotensina (ECA) (0,2 U/mL).....	50
4. RESULTADOS	53
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8. ANEXOS 1 e 2	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cianobactérias e cianopeptídeos

As cianobactérias são micro-organismos procariotos fotossintetizantes que podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes aquáticos e terrestres. Esses micro-organismos existem no planeta há 3,5 bilhões de anos, onde desempenham importante papel nos processos de ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio e oxigenação da atmosfera. Apesar da ampla distribuição geográfica das cianobactérias, os ecossistemas de água doce são os ambientes mais apropriados para seu desenvolvimento. A maioria das espécies de cianobactérias apresenta melhor crescimento em águas neutro-alcálinas (pH de 6 a 9) com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, e temperaturas entre 15 °C e 30 °C (1-3).

Apesar de contribuírem para a vida dos ecossistemas por meio da produção primária de matéria orgânica, as cianobactérias podem apresentar um sério risco ao ambiente e à saúde humana. Em ambientes aquáticos eutrofizados, onde há grande disponibilidade de nutrientes, algumas espécies de cianobactérias podem se multiplicar de maneira excessiva caracterizando um fenômeno conhecido como floração ou *bloom* (4-6). Essas florações interferem negativamente na qualidade da água alterando, por exemplo, pH, transparência, gosto e odor, além de promoverem a depleção de oxigênio e consequentemente um desequilíbrio ecológico nas comunidades aquáticas (7-9). Depois de estabelecida, a floração persiste por vários meses e em regiões tropicais elas podem, em algumas situações, tornarem-se permanentes (10-14).

As cianobactérias são produtoras de uma grande variedade de metabólitos secundários com um amplo repertório de atividades biológicas.

Esses metabólitos são representados por uma grande variedade de estruturas e já foram isolados de diversas espécies provenientes de diferentes regiões geográficas (15). O fenômeno das florações pode implicar em problemas de saúde pública quando as espécies envolvidas na floração possuem a capacidade de sintetizar metabólitos secundários tóxicos (cianotoxinas) (5, 6, 16).

Metabólitos secundários são compostos que não são utilizados pelo organismo para o metabolismo primário, ou seja, aqueles que não estão diretamente envolvidos no crescimento normal, desenvolvimento ou reprodução. Metabólitos secundários incluem os compostos que atuam como hormônios, antibióticos, aleloquímicos e toxinas e não são essenciais ao organismo (17).

O elevado grau de bioatividade dos produtos naturais produzidos por cianobactérias se dá em razão das diferentes classes de grupos funcionais e esqueletos carbônicos que eles apresentam, como: lipopeptídios, macrolídeos, amidas e outros (18).

As toxinas são metabólitos secundários que têm efeito prejudicial sobre outros tecidos, células ou organismos (17). De fato, diversas espécies de cianobactérias são conhecidas pela produção de potentes cianotoxinas como as microcistinas (19), as saxitoxinas (20), as anatoxinas (21), as cilindrospermopsinas (22), dentre outras (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química geral das principais toxinas produzidas por cianobactérias (Adda: ácido 3-amino-2-hidróxidecanoico).

Por outro lado, as cianobactérias também apresentam grande importância econômica. Algumas espécies são utilizadas na produção de alimentos com valores nutricionais elevados, na indústria de cosméticos e na conversão de energia solar em biomassa e biocombustíveis. Já na indústria farmacêutica, apresentam um potencial promissor por produzirem ativos de grande interesse (23-26). Dentre esses compostos destacam-se os peptídeos lineares e cíclicos de baixo peso molecular, conhecidos como cianopeptídeos que, aparentemente, não são tóxicos.

De acordo com a estrutura química, os principais cianopeptídeos podem ser divididos em diferentes classes como: as anabaenopeptinas (27), as cianopeptolinas (28), as microviridinas (29), as aeruginosinas (30) e as Microgininas (31) (Figura 2). Esses metabólitos secundários são produtos de biossíntese não-ribossômica (nonribosomal polypeptide synthesis – NRPS e polyketide synthase - PKS) ou de vias mistas como a policetídica e NRPS (32, 33), apresentando grande diversidade estrutural e, dessa forma, atividades biológicas variadas (34). Investigações conduzidas durante as últimas décadas identificaram substâncias com ação citotóxica, antifúngica, antibacteriana,

antiviral e anti-inflamatória (35), bem como potentes inibidores de diferentes proteases (36). Aeruginosinas são inibidoras da enzima digestiva tripsina, da trombina (30, 37) e de outros fatores de coagulação (38). As anabaenopeptinas têm sido caracterizadas como inibidoras de carboxipeptidase, serinoproteases (39, 40) e elastases (41), ao passo que cianopeptolinas inibem tripsina e quimotripsina (42, 43). Microgininas foram inicialmente caracterizadas como inibidoras de zinco metaloproteases, tais como a enzima conversora de angiotensina (ECA) (31) e leucina aminopeptidase (LAP).

Figura 2 - Estrutura química de algumas variantes das principais classes de cianopeptídeos.

Relações entre estrutura e atividade demonstraram que a ditirosina C-terminal e também os grupos amino e hidroxila do Ahda das microgininas desempenham papel importante na inibição da ECA. Além disso, microgininas

tetrapeptídicas se configuraram como sendo mais ativas que microgininas pentapeptídicas e seus fragmentos (44).

Dessa forma, as microgininas são de grande interesse por serem consideradas moléculas líderes na descoberta de novos fármacos antihipertensivos, bem como para tratamentos da insuficiência cardíaca congestiva (45). Quanto às funções fisiológicas e ecológicas, os papéis desempenhados pelos cianopeptídeos na célula e/ou ambiente ainda não foram esclarecidos. Contudo, em razão das propriedades bioativas, esforços para isolar e caracterizar esses compostos são de grande importância tanto do ponto de vista ecofisiológico como toxicológico e farmacológico. Cabe ressaltar que cepas de uma mesma espécie podem ou não serem produtoras de cianopeptídeos, uma vez que a produção é uma característica do indivíduo e não da espécie. Além disso, uma mesma cepa pode produzir diferentes variantes, o que reforça a importância da investigação individual de cada cepa (46-48).

1.2 Microgininas

As microgininas foram pela primeira vez relatadas na literatura em 1993 por Okino *et al.* (31). Desde então, 34 variantes foram relatadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência de aminoácidos dos congêneres de microgininas (Adaptado de Carneiro *et al.* (49))

Mass [M+H]	MG	Sequência dos aminoácidos*						Referência
		1	2	3	4	5	6	
575.36	91-A	ClAhda	Ile	MeLeu	Pro	-	-	(44)
585.30	AL584	ClAhda	Ala	MeVal	Tyr	-	-	(50)
609.32	91-B	Cl ₂ Ahda	Ile	MeLeu	Pro	-	-	(44)
698.38	T2	Ahda	Ala	Pro	Tyr	Tyr	-	(51)
704.46	91-C	Ahda	Ile	MeLeu	Pro	Tyr	-	(44)
712.39	711	Ahda	Hty	Ala	Pro	Tyr	-	(52)

714.26	MG	Ahda	Ala	Val	MeTyr	Tyr	-	(31)
726.41	FR5	Ahda	Val	Pro	Tyr	Tyr	-	(52)
727	FR1	Ahda	Ala	MeLeu	Tyr	Tyr	-	(52)
728.39	FR3	Ahda	Thr	Pro	Tyr	Tyr	-	(52)
728.41	Cyanotastatin A	Ahda	Ala	Val	MeTyr	Hty	-	(53)
732	T1	ClAhda	Ala	Pro	Tyr	Tyr	-	(51)
738.42	91-D	ClAhda	Ile	MeLeu	Pro	Tyr	-	(44)
740.42	FR6	MeAhda	Val	Pro	Tyr	Tyr	-	(52)
742.40	FR4	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Tyr	-	(52)
751.40	FR9	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Trp	-	(52)
754.43	Cyanotastatin B	Ahda	Melle	Pro	Tyr	Tyr	-	(53)
756.45	756	Ahda	Val	Leu	Hty	Tyr	-	(49)
756.45	755	Ahda	Val	MeVal	Tyr	Tyr	-	(44)
758.43	757	Ahda	Thr	MeLeu	Tyr	Tyr	-	(52)
765.42	764	MeAhda	Thr	Pro	Tyr	Trp	-	(52)
768.45	767	MeAhda	Tyr	Melle	Pro	Tyr	-	(52)
770.46	770	MeAhda	Val	Leu	Hty	Tyr	-	(49)
770.47	478	MeAhda	Val	MeVal	Tyr	Tyr	-	(44)
772.38	91-E	Cl ₂ Ahda	Ile	MeLeu	Pro	Tyr	-	(44)
773	99-A	ClAda	Tyr	Leu	MeTyr	Pro	-	(54)
757	299-D	Cl ₂ Ahda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	-	(54)
806	99-B	Cl ₂ Ada	Tyr	Leu	MeTyr	Pro	-	(54)
810.38	GH787	ClAhda	Tyr	Melle	Pro	Tyr	-	(55)
852	299-C	Ahda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	(54)
887	299-A	ClAhda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	(54)
917.49	51-A	Ahda	Tyr	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	(44)
921	299-B	Cl ₂ Ahda	Val	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	(54)
931.51	51-B	MeAhda	Tyr	MeVal	MeTyr	Pro	Tyr	(44)

*N-terminal para C-terminal; Ahda, 3-amino-2-hidróxi-ácido decanóico; ClAhda, 10-cloro-3-amino-2-hidróxi-ácido decanóico; Cl₂Ahda, 10-dicloro-3-amino-2-hidróxi-ácido decanóico; Me, N-metil.

Os inibidores da ECA são normalmente moléculas pequenas com menos de seis aminoácidos e apresentam aminoácidos hidrofóbicos em sua estrutura. Além disso, as porções C e N terminais geralmente se consistem de aminoácidos aromáticos e aminoácidos alifáticos ramificados, respectivamente (56). Estruturalmente, as microgininas são peptídeos lineares compostos de três a seis resíduos de aminoácidos com massa molar variando de 574 a 930 Da. Essas moléculas apresentam em sua porção N-terminal um derivado do

ácido decanóico, o ácido 3-amino-2-hidróxi-decanóico (Ahda), e o predomínio de duas unidades de tirosina na porção C-terminal (52).

Usualmente, a determinação da sequência de aminoácidos de proteínas tem sido realizada por um conjunto de metodologias clássicas como a hidrólise em meio ácido seguida pela análise de aminoácidos, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (31). Entretanto, o emprego da espectrometria de massas para o sequenciamento de peptídeos tem ganhado destaque (52).

Os espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo permitem análises em *tandem* MS. O primeiro e o terceiro quadrupolos são utilizados para seleccionar um ou mais íons ou varrer um intervalo de m/z . O segundo quadrupolo funciona como uma câmara de colisão preenchida com um gás inerte (hélio, argônio, nitrogênio). Os modos de varredura que podem ser realizados em um triplo quadrupolo são: varredura do íon produto (*Product ion scan*), varredura do íon precursor (*Precursor ion scan*), varredura de perda neutra (*Neutral loss*) e monitoramento de reações seleccionadas (SRM – *Selected Reaction Monitoring*) (57).

No modo de aquisição de varredura do íon produto, o íon de interesse é seleccionado no primeiro quadrupolo e encaminhado para a câmara de colisão (segundo quadrupolo). Na câmara, o íon interage com as moléculas de gás sofrendo fragmentação por meio de um processo denominado dissociação induzida por colisão (CID – *collision-induced dissociation*). Os íons produtos gerados são separados no terceiro quadrupolo e posteriormente detectados. Na aquisição por varredura do íon precursor, o terceiro quadrupolo é ajustado para detectar um único íon produto e o primeiro quadrupolo varre um intervalo de m/z a fim de identificar qual o íon precursor que originou o íon produto

selecionado. Esse tipo de análise pode ser utilizado para compostos que apresentam perdas características de um mesmo grupamento químico, como as microgininas. No modo de aquisição varredura de perda neutra, o primeiro e o terceiro quadrupolos varrem intervalos de m/z que permitem detectar todas as fragmentações correspondentes à perda de massa de um fragmento neutro selecionado. O monitoramento de reações selecionadas consiste em selecionar uma reação de fragmentação. O primeiro e o segundo analisador são focalizados em massas selecionadas. Trata-se de um *scan*, não há varredura (57, 58).

Recentemente, a aplicação da espectrometria de massas para a identificação de microgininas foi demonstrada por nosso grupo (49). Neste contexto, é importante ressaltar que as microgininas, quando submetidas a dissociação induzida por colisão em experimentos de espectrometria de massas sequencial (CID-MS/MS), apresentam íons de m/z 128 ou m/z 142 em seu espectro de fragmentação. Esses íons originam-se da dissociação entre o C2 e o C3 do Ahda, sendo considerados diagnósticos dessa classe de compostos e, portanto, podem ser utilizados na triagem e na identificação de possíveis variantes estruturais (Figura 3) (49, 52).

Figura 3 – Estrutura das microgininas MG756 ($R=H$) e MG770 ($R=CH_3$). Adaptado de Carneiro *et al.* (2012) (49). Onde: (1) ácido 3-amino-2-hidróxidecanoico; (2) valina; (3) leucina; (4) homotirosina; (5) tirosina.

1.3 Hipertensão arterial

O número de casos de hipertensão ou pressão arterial elevada está em ascensão em todo o mundo. Aproximadamente 972 milhões de adultos foram diagnosticados com hipertensão, em 2000, o que deverá aumentar para um total de 1,56 bilhão em 2025. Cerca de 13,5% de mortes prematuras globais são atribuídas à hipertensão arterial (56, 59). A hipertensão é um importante fator de risco para o AVC e outras doenças cardiovasculares.

Entre outras estratégias, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) são utilizados na prevenção da hipertensão e da insuficiência cardíaca congestiva. A ECA catalisa várias reações, duas das quais desempenham papéis fisiológicos importantes na regulação da pressão arterial: conversão da angiotensina inativa I em angiotensina II, um potente vasoconstritor e retentor de sal, e inativação do vasodilatador bradicinina, que favorece a redução da pressão arterial (59, 60).

Vários fatores são responsáveis pelo aumento da pressão arterial, como: doenças renais, obesidade, resistência à insulina, ingestão elevada de álcool, ingestão elevada de sal, envelhecimento, além de fatores genéticos. Uma das principais causas de hipertensão é o mau funcionamento do sistema renina-angiotensina. Esse sistema é constituído por um certo número de peptídeos que são importantes na regulação da pressão arterial, tais como a angiotensina I e II (61).

A atividade de inibição da ECA pode ser medida *in vitro* ou *in vivo*. Os estudos *in vitro* demonstram a conversão da angiotensina I em angiotensina II com a ajuda de várias técnicas de separação e espectroscópicas. Um método *in vitro* para analisar a atividade da ECA inclui a conversão de Hip-His-Leu (hipuril-histidil-leucina) em ácido hipúrico (HA) (Figura 4). Hip-His-Leu é um

análogo tripeptídico da angiotensina I. Sabe-se que a atividade da ECA é muito específica para temperatura e pH, mesmo em condições *in vitro*. Essa enzima apresenta atividade ótima a 37 °C e pH de 8,3 (61, 62).

Figura 4 - Hidrólise de Hip-His-Leu pela ECA. (Adaptado de Bhuyan e Mugesh (2011) (61)).

Os inibidores da ECA foram originalmente sintetizados a partir de compostos encontrados em veneno de cobra. Os inibidores da ECA sintéticos, tais como captopril, enalapril, lisinopril e ramipril são atualmente usados no tratamento da hipertensão em seres humanos. Embora apresentem um efeito notável no tratamento da hipertensão, esses inibidores sintéticos também causam efeitos colaterais adversos, tais como tosse, reações alérgicas, alterações do paladar e erupções cutâneas. Portanto, o desenvolvimento de inibidores seguros da ECA é necessário para o tratamento e prevenção da hipertensão (59) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura química de alguns inibidores sintéticos atualmente usados no tratamento da hipertensão em seres humanos.

1.4 Descoberta e desenvolvimento de fármacos

Historicamente, os produtos naturais têm sido fonte de muitas substâncias de uso medicinal. Produtos derivados de plantas têm dominado a farmacopéia humana por milhares de anos. Em 1897, foi criada a primeira droga sintética, a aspirina. A aspirina (ácido acetilsalicílico) foi sintetizada a partir de ácido salicílico, um ingrediente ativo de remédios analgésicos à base de plantas. Essa conquista marcou o início de uma era dominada pela indústria farmacêutica. Em 1928, a penicilina foi descoberta por Alexander Fleming, acrescentando os micro-organismos como importantes fontes de novos medicamentos. O papel dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos foi recentemente diminuído com a descoberta de novas fontes de compostos bioativos, como: a síntese orgânica guiada pela estrutura-atividade, a síntese combinatória e pela química computacional/modelagem molecular (*in silico*). Os avanços da Química, Farmacologia e Biologia Molecular a partir de

meados do século XX, aliados à introdução de novos ensaios bioquímicos, conduziram ao desenvolvimento da Química Medicinal com o planejamento racional de fármacos baseado na abordagem fisiológica. Gradativamente os produtos sintéticos ganharam posição de destaque no arsenal terapêutico. A introdução do *high-throughput screening* (HTS – triagem de alto rendimento) nos anos 1990 por parte da indústria farmacêutica e o desenvolvimento da Química Combinatória, diminuíram sensivelmente o interesse em produtos naturais entre 1984 e 2003, que se traduziu no menor volume de investimentos da Indústria Farmacêutica neste setor. Entretanto, diminuiu também, nos últimos anos, o número de novos fármacos lançados no mercado e pode-se observar um ressurgimento no interesse por produtos naturais como fonte de novas substâncias bioativas. Os avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas de produtos e a diversidade estrutural presente na natureza são os fatores responsáveis por este renovado interesse (63-65).

1.5 Análises estrutural e de atividade

Dentre as diferentes estratégias disponíveis para o isolamento e caracterização de compostos de origem natural, o fracionamento biomonitorado pode ser destacado. Ele integra os processos de separação de compostos em uma mistura com os resultados obtidos a partir de ensaios biológicos. Normalmente, esse trabalho é iniciado com a preparação da amostra, tipicamente uma extração com solvente. O extrato obtido é então avaliado quanto a sua atividade sobre algum modelo biológico, como um ensaio enzimático, por exemplo. Quando resultados positivos são obtidos, o extrato é fracionado e as frações são testadas no modelo biológico empregado. Um

refracionamento é realizado sobre as frações que são determinadas ativas, enquanto que as porções inativas são descartadas ou utilizadas em outros ensaios biológicos. Esses processos iterativos são repetidos até que compostos puros sejam obtidos ao final. Para o fracionamento, as técnicas mais comumente utilizadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em coluna aberta, cuja escolha depende da quantidade de material de partida. Um novo fracionamento pós coluna aberta pode ser necessário por HPLC que possui maior capacidade de resolução (66, 67).

Após o isolamento de uma substância pura, a tarefa de elucidar sua estrutura química pode ser realizada. Para essa finalidade, as metodologias mais poderosas disponíveis são espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS) (66-68) que são ferramentas complementares. A RMN é uma ferramenta importante para a elucidação estrutural das espécies químicas e também para a determinação quantitativa de espécies absorventes. A técnica está baseada na medida de absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência pelo núcleo dos átomos. Para que o núcleo adquira o estado de energia requerido para ocorrer a absorção é necessário colocar a amostra em um campo magnético intenso. O sinal da absorção é monitorado enquanto a frequência da fonte é variada (69). A espectrometria de massas (MS) também é uma técnica importante de análise molecular pelo seu potencial em fornecer informações de massa molar e sobre a estrutura do analito (70). MS pode ser definida como o estudo da matéria baseado na massa das moléculas e de seus fragmentos (71). Um espectrômetro de massas é um instrumento constituído basicamente de três partes (uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector) que

produz íons e os separa de acordo com suas razões massa/carga (m/z) (69). Além de RMN ser uma técnica de análise relativamente rápida e de alta reprodutibilidade, a amostra não é destruída no final do processo. Porém, quando comparada com a técnica de espectrometria de massas apresenta baixa sensibilidade (72).

1.6 Justificativa

Os peptídeos de baixo peso molecular produzidos por cianobactérias, chamados ciano-peptídeos, são compostos provindos do metabolismo secundário desses organismos e a maioria é descrita como inibidores de proteases e fosfatases. Uma ampla variedade desses metabólitos ativos tem potencial para aplicação no desenvolvimento de novos fármacos. Como exemplo, podem ser citadas as microgininas, moléculas inibidoras da enzima conversora de angiotensina. Uma vez que seu modo de ação é semelhante ao inibidor comercial captopril, as microgininas são importantes candidatas ao desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos. Até 2007, 30 variantes estruturais de microgininas eram conhecidas e alguns testes clínicos foram iniciados (73).

Trabalhos científicos que relatam ciano-peptídeos de cianobactérias isoladas de ecossistemas brasileiros, bem como a investigação da atividade biológica desses compostos, são escassos. Dentre esses, como exemplo, pode-se citar:

Carvalho *et al.* (2008) (74) identificaram a produção de ciano-peptídeos por cianobactérias presentes em um *bloom*, dominado pelas espécies *Microcystis protocystis* e *Sphaerocavum cf. brasiliensis*, ocorrido na lagoa do Violão, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Dentre os compostos encontrados

pode-se citar: anabaenopeptina F, anabaenopeptina B, microcistina-LR e microcistina-RR (MC-LR e MC-RR, respectivamente).

Pereira *et al.* (2012) (75) relataram a produção de MC-FR, [Asp³]-MC-YR, MC-RR, MC-YR, MC-WR, cianopectolina-980, cianopectolina-1014, cianopectolina-1071, microviridina-1707, microviridina-1709 e microviridina-1739 em cepas isoladas de reservatórios mineiros, Furnas e Lagoa da Pampulha, respectivamente.

Silva-Stenico *et al.* (2011) (45) rastrearam isolados brasileiros de cianobactérias para a produção de cianopectídeos e pesquisaram o potencial de atividade antimicrobiana dos extratos. Nesse mesmo estudo foi possível a identificação de cianopectídeos pertencentes aos grupos das anabaenopeptinas, aeruginosinas, cianopectolinas, dentre outros. Os autores descreveram também supostos peptídeos do tipo microgininas em duas linhagens de *Microcystis*, mas confirmação adicional das estruturas ainda é necessária.

Recentemente, Pereira e Giani (2014) (76), reportaram a produção de aeruginosinas, cianopectolinas, microcistinas e microviridina em cepas isoladas do reservatório de Furnas em Minas Gerais, Brasil.

Apesar desses relatos, a avaliação de cianobactérias brasileiras como fonte de compostos naturais com potencial farmacêutico ainda é interessante, especialmente quando a gama de atividades biológicas atribuídas a oligopeptídeos é considerada. Assim sendo, esforços para caracterizar esses peptídeos são de grande importância.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar e isolar cianopeptídeos da classe das microgininas produzidos por linhagens de cianobactérias brasileiras.

2.2 Objetivos específicos

- (i) Cultivar em laboratório espécies de cianobactérias brasileiras;
- (ii) investigar a presença de microgininas nas amostras por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), por meio de experimentos de varredura de íons precursores (*precursor ion scan*), monitorando-se os íons diagnósticos de m/z 128 e m/z 142;
- (iii) preparar extratos hidro-alcoólicos das espécies selecionadas e realizar pré-fracionamento por extração em fase sólida (SPE) em coluna de fase reversa;
- (iv) testar as frações em ensaios de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento 1 – Contagem de células das cepas controle sabidamente produtoras de microgininas

Materiais

- Lâminas e lamínulas de vidro. Tubos de plástico de 2 mL (Eppendorf®). Câmara de Fuchs-Rosenthal, 0,200mm de profundidade e 0,0625mm² de área, acompanhada de lamínulas de 20 x 26 x 0.4 mm. Microscópio Primo Star, modelo 415500-0011-00 (Zeiss®). Óleo de imersão para lentes de microscópio para aumento de 1000x. Solução de iodo a 20% para fixação das células.

Métodos

Duas cepas de *Microcystis* sp. pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA) foram determinadas como controle positivo. Sabe-se que essas cepas, LTPNA08 e LTPNA09, são produtoras de microgininas (49).

Uma alíquota de cultivos em triplicata das cepas controle foi retirada de três em três dias para contagem das células em microscópio utilizando lâmina de Fuchs-Rosenthal. Após 21 dias, o crescimento foi interrompido e as cepas submetidas ao processo de liofilização. Foram contadas no mínimo 400 células por amostra para a realização da curva de crescimento e distinção das fases de crescimento exponencial e estacionária para se verificar o comportamento das linhagens.

3.2 Experimento 2 – Cultivo e manutenção das linhagens analisadas

Materiais

- Erlenmeyers de diferentes capacidades (100 mL, 1000 mL, 2000 mL), balões volumétricos, pipetas graduadas, analíticas e Pasteur, algodão, gaze e

barbante. pHmetro modelo 827 (Metrohn®). Agitador magnético modelo Te-085 com aquecimento (Tecnal®). Bancada de fluxo laminar vertical. Estufa incubadora modelo NT-780 (Novatecnica®) com controle de fotoperíodo da marca Coel®. Autoclave vertical modelo AV Plus (Pheonix Luferco®). Reagentes para o preparo das soluções estoques do meio ASM-1. Balança analítica Série Cubis modelo MSU (Sartorius®).

Métodos

Foram utilizadas 10 linhagens que já se encontram no laboratório do grupo, 9 cepas doadas pela professora Alessandra Giani da UFMG e 40 cepas doadas pela professora Marli Fiore da USP - Piracicaba. As cepas investigadas e as duas cepas controle foram cultivadas em condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C), fotoperíodo (12 h) e irradiância ($22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), em meio de cultura ASM-1, descrito por Gorham *et al.* (1964) (77), pH inicial 8,0, sem aeração. No final de cada experimento, fase estacionária de crescimento, o material foi liofilizado e utilizado nas análises bioquímicas.

3.3 Experimento 3 – Análise das linhagens por HPLC

Materiais

- Geladeira (Eletrolux®) e Freezer – 20 °C (Eletrolux®). Centrífuga modelo 5804-R (Eppendorf®). Liofilizador modelo L101 da Liotop®. Concentrador TE-019 (Tecnal®). Tubos de plástico de 50 mL da marca Falcon®. Tubos de vidro. Solventes orgânicos metanol e acetonitrila da marca JTBacker®. Filtros com diâmetro de 0,45 μm da marca Millex®. Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer (OMNI International®). Seringas de plástico com capacidade de 1 mL da marca Becton Dickinson®. *Vials* (Agilent®) e *inserts* (Flow Supply®). HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) Prominence (Shimadzu®). O HPLC é

constituído por uma controladora (CBM-20A), duas bombas binárias (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20A_{HT}) todos da marca Prominence da Shimadzu[®]. Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ[®], Millipore[®]). Ácido trifluoroacético (TFA) (EMD[®]). Padrões analíticos de microcistinas (MC) MC-RR, MC-YR, MC-LA e MC-LR (10 µg.mL⁻¹) (Abraxis[®]).

Métodos

O material celular das culturas em fase estacionária de crescimento foi concentrado por centrifugação (4000 g, 6 min) e o *pellet* obtido foi liofilizado. O material seco foi extraído três vezes com metanol 75%. Os extratos secos foram reconstituídos em metanol 75% e analisados em HPLC-DAD (Shimadzu[®]). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex[®]), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹. A análise foi conduzida em gradiente, seguindo metodologia descrita por Lawton *et al.* (1994) (78). Os cromatogramas gerados foram monitorados em $\lambda_{\text{máx}}$ 276 nm e entre 200 a 700 nm no detector DAD. Uma corrida com a mistura de 4 padrões comerciais de microcistinas foi realizada para auxiliar na identificação das variantes dessa cianotoxina pela comparação dos tempos de retenção e espectro no UV-VIS.

3.4 Experimento 4 – Testes de extração e pré-fracionamento de cianopeptídeos com as cepas controle

Materiais

- Geladeira (Eletrolux[®]) e Freezer -20 °C (Eletrolux[®]). Centrífuga modelo 5804-R (Eppendorf[®]). Liofilizador modelo L101 da Liotop[®]. Concentrador TE-019 (Tecnal[®]). Tubos de plástico de 50 mL da marca Falcon[®]. Tubos de vidro. Solventes orgânicos metanol, acetonitrila da marca JTBacker[®]. Filtros com diâmetro de 0,45 µm da marca Millex[®]. Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer (OMNI International[®]). Seringas de plástico com capacidade de 1 mL da marca Becton Dickinson[®]. *Vials* (Agilent[®]) e *inserts* (Flow Supply[®]). HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) Prominence (Shimadzu[®]). O HPLC é constituído por uma controladora (CBM-20A), duas bombas binárias (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20A_{HT}) todos da marca Prominence da Shimadzu[®]. Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ[®], Millipore[®]). Ácido trifluoroacético (TFA) (EMD[®]). Solventes orgânicos (acetato de etila e n-butanol) da marca Vetec[®]. Colunas para extração em fase sólida C18 (Sep-Pak[®] de 500 mg 3cc). Sistema para extração em fase sólida (SPE) e cuba de vidro da marca Phenomenex[®]. Bomba de vácuo TE 058 (Tecnal[®]). Filtros com diâmetro de 0,45 µm da marca Millex[®]. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Métodos

Testes de extração e purificação dos analitos de interesse para diminuir a complexidade da amostra foram realizados. A partir da extração descrita anteriormente (experimento 3), o extrato bruto foi reconstituído em MeOH:H₂O 5:95 e aplicado em coluna de extração em fase sólida (Sep Pak C18 3cc, Waters Assoc.), previamente condicionada pela passagem de 6 mL de metanol e 6 mL de água. O solvente de aplicação e uma primeira lavagem com 6 mL de MeOH:H₂O 5:95 foram reunidos, caracterizando a primeira fração, considerada

polar. Em seguida, 6 mL de MeOH:H₂O 50:50 foram aplicados e o solvente coletado, caracterizando a segunda fração, de polaridade intermediária. Por fim, 6 mL de MeOH:H₂O 95:5 foram aplicados e o solvente coletado, caracterizando a terceira fração, considerada apolar. As frações também foram analisadas em HPLC-DAD, segundo metodologia descrita por Lawton *et al.* (1994) (78).

Outro teste de fracionamento por SPE foi realizado a partir de material seco extraído três vezes com metanol 75%, seguindo a metodologia descrita por Lawton e Edwards (2001) (79). Dessa vez o extrato foi eluído com gradiente de metanol 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Os extratos secos foram ressuspensos em metanol 75% e analisados em HPLC-DAD, segundo metodologia descrita por Lawton *et al.* (1994) (78). O extrato bruto foi reconstituído e aplicado em coluna de extração em fase sólida (Sep Pak C18 3cc, Waters Assoc.) previamente condicionada com 6 mL de metanol e 6 mL de água. Após a passagem do solvente de aplicação, 6 mL de água foram aplicados seguidos de aplicações de 6 mL de metanol 20%, 40%, 60%, 80% e 100% para obtenção de frações de diferentes polaridades que foram coletadas. As frações foram analisadas por HPLC-DAD do mesmo modo que o apresentado para a primeira análise dos extratos brutos extraídos com metanol 75% previamente descrito (experimento 3). As frações obtidas no processo de pré-fracionamento foram concentradas sob fluxo de nitrogênio gasoso (N₂ (g)).

Foi realizada uma extração líquido-líquido para teste de limpeza da amostra (*clean up* do extrato bruto) visando facilitar a extração quando da utilização de grande biomassa. Foram utilizados os solventes: acetato de etila e *n*-butanol para tentativa de remoção dos pigmentos apolares (clorofila e carotenóides). O extrato bruto em metanol 75% foi seco e ressuspendido

primeiro em acetato de etila e depois foi adicionado água em uma razão acetato de etila:água (1:1). O mesmo foi feito para *n*-butanol:água (1:1). O material foi centrifugado a 5.000 *g* por 10 min. As frações dos solventes orgânicos foram coletadas e secas sob fluxo de N₂ (g). Após a concentração das frações (acetato de etila e *n*-butanol) até a sua total secagem, ambas foram ressuspensas em metanol 100% e posteriormente analisadas cromatograficamente. As frações aquosas também foram analisadas. Além disso, um teste com extração sequencial apenas com acetato de etila e *n*-butanol, sem a utilização de água, também foi realizado. Em seguida, os extratos foram analisados por HPLC-DAD, segundo metodologia descrita por Lawton *et al.* (1994) (78).

3.5 Experimento 5 - Análise de microgininas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)

Materiais

- Equipamento de HPLC com bombas LC 1250 Bin Pump VL, auto-injetora 1260 HiP ALS, (todos da Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos) acoplado em um espectrômetro de massas 6460-Triplo Quadrupolo LC/MS (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos). O MS é equipado com uma fonte ESI que foi operada no modo positivo. As análises foram realizadas a partir do software MassHunter (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos) e os dados coletados a partir do modo *Precursor Ion Scan* (PIS). Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker®). A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ®, Millipore®). Formiato de amônio (Fluka® Analytical HPLC) e ácido fórmico (Fluka® Analytical grau MS).

Métodos

Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μm ; Phenomenex[®], EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L^{-1} de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min^{-1} . O espectrômetro foi operado no modo de varredura de íons precursores (*precursor ion scan*) no intervalo de m/z 200-2000, monitorando-se os íons produto de m/z 128 e 142. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se nitrogênio como gás de colisão. Neste experimento, compostos que geraram íons produto de m/z 128 ou 142 em seus espectros de dissociação foram tratados como possíveis variantes de microgininas. Os parâmetros utilizados no equipamento foram: capilar a 3500 V, temperatura do gás: 300 °C, vazão do gás: 5 L.min^{-1} , nebulizador: 45 psi, temperatura do *sheath gas*: 300 °C, vazão do *sheath gas*: 8 L.min^{-1} , *fragmentor*: 100, energia de colisão: 60 e voltagem da agulha: 1000 V.

Materiais

- Equipamento de HPLC com detecção por UV-Visível (SPD-M20A) acoplado em espectrômetro de massas Micro TOF-QII, Bruker Daltonics[®]. O HPLC é constituído por uma controladora (CBM-20A), uma bomba quaternária (LC-20AB) ou binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20AC) todos da marca Prominence da Shimadzu[®]. O espectrômetro é equipado com uma fonte ESI, que foi operada no modo positivo. Os dados foram coletados a partir do modo *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de m/z de 50-1600. Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker[®]). A água (H₂O)

utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ[®], Millipore[®]). Formiato de amônio (Fluka[®] Analytical HPLC) e ácido fórmico (Fluka[®] Analytical grau MS).

Métodos

Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex[®], EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Os parâmetros utilizados no equipamento foram: capilar a 4000 V, temperatura do gás: 200 °C, vazão do gás: 5 L.min⁻¹, nebulizador: 35 psi, energia de colisão: 10.

3.6 Experimento 6 - Ensaio enzimático inicial – Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Materiais

- Thermomixer comfort (Eppendorf[®]). Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) 0.25 U (Sigma-Aldrich[®]). Fração enriquecida de ECA de pulmão de boi. Hipuril-Histidil-Leucina (Sigma-Aldrich[®]). Ácido hipúrico e Captopril (Sigma-Aldrich[®]). Frações de peptídeos de 40%, 60% e 80% das cepas controle. HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) Prominence (Shimadzu[®]). O HPLC é constituído por uma controladora (CBM-20A), duas bombas binárias (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20A_{HT}) todos da marca Prominence da Shimadzu[®]. Ácido trifluoracético (TFA) (EMD[®]). Trietilamina (Fisher[®]). Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker[®]). Todos os solventes

utilizados na cromatografia são grau analítico. Tampão borato 100 mM (NaOH e ácido bórico) pH 8,3 contendo 300 mmol.L⁻¹ NaCl.

Métodos

A capacidade de inibição da ECA foi avaliada de acordo com o método descrito por Wang *et al.* (2013) (62), que emprega o tripeptídeo hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu ou HHL) como substrato e avalia a formação de ácido hipúrico por cromatografia em fase líquida (HPLC-DAD). Em resumo, a enzima comercial e o substrato Sigma-Aldrich são dissolvidos em tampão borato (NaOH e ácido bórico) 100 mmol.L⁻¹ pH 8,3 contendo 300 mmol.L⁻¹ NaCl (0,1 U/mL e 5 mmol.L⁻¹, respectivamente). A enzima é então pré-incubada na presença ou ausência de inibidor (frações de peptídeos das cepas controle ou captopril) por 30 minutos a 37 °C, sendo a reação iniciada pela adição de substrato. Após 30 minutos, a reação é interrompida pela adição de 250 µL de ácido clorídrico e a amostra diretamente injetada no sistema cromatográfico.

A separação ocorreu em coluna de fase reversa (Luna C18(2), 150 x 3,0 mm, 3 µm; Phenomenex[®], EUA) utilizando-se (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético e 0,05% trietilamina e (B) acetonitrila como fase móvel, na proporção 70:30 de A:B. A eluição utilizada foi isocrática e a formação de ácido hipúrico (HA) monitorada em comprimento de onda de 226 nm.

O sistema de reação compreende: 10µL HHL (5 mmol.L⁻¹), 10 µL ECA (0,1 U/mL), 40 µL inibidor e 40 µL de tampão borato 100 mM (pH = 8,3).

Como inibidor foram utilizadas as frações de peptídeos de 40%, 60% e 80% das cepas controle ou o captopril (1 mg.mL⁻¹)

Nos primeiros testes foi utilizada uma fração enriquecida de ECA de pulmão de boi, gentilmente cedida pelo Fernando G. de Almeida do ICB-USP e pela Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass da UFSCAR.

3.7 Experimento 7 – Avaliação de extratos de cianobactérias potencialmente produtoras de microgininas

Para aumentar o número de controles positivos e também de novas possíveis variantes de microgininas, foi estabelecida uma cooperação com o Prof. Shmuel Carmeli, da Universidade de Tel Aviv, a fim de caracterizar extratos de cianobactérias com informações prévias da produção dessa classe de oligopeptídeos.

Materiais

- Equipamento de HPLC com bombas LC 1250 Bin Pump VL, auto-injetora 1260 HiP ALS, (todos da Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos) acoplado em um espectrômetro de massas 6460-Triplo Quadrupolo LC/MS (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos). O MS é equipado com uma fonte ESI que foi operada no modo positivo. As análises foram realizadas a partir do software MassHunter (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos) e os dados coletados a partir do modo *Precursor Ion Scan* (PIS). Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker®). A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ®, Millipore®). Formiato de amônio (Fluka® Analytical HPLC) e ácido fórmico (Fluka® Analytical grau MS).

Métodos

Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O

espectrômetro foi operado no modo de varredura de íons precursores (*precursor ion scan*) no intervalo de m/z 200-2000, monitorando-se os íons produto de m/z 128 e 142. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se nitrogênio como gás de colisão. Neste experimento, compostos que geraram íons produto de m/z 128 ou 142 em seus espectros de dissociação foram tratados como possíveis variantes de microgininas. Os parâmetros utilizados no equipamento foram: capilar a 3500 V, temperatura do gás: 300 °C, vazão do gás: 5 L.min⁻¹, nebulizador: 45 psi, temperatura do *sheath gas*: 300 °C, vazão do *sheath gas*: 8 L.min⁻¹, *fragmentor* : 100, energia de colisão: 60 e voltagem da agulha: 1000 V.

Materiais

- Equipamento de HPLC com detecção por UV-Visível (SPD-M20A) acoplado em espectrômetro de massas Micro TOF-QII, Bruker Daltonics®. O HPLC é constituído por uma controladora (CBM-20A), uma bomba quaternária (LC-20AB) ou binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20AC) todos da marca Prominence da Shimadzu®. Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker®). A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ®, Millipore®). Formiato de amônio (Fluka® Analytical HPLC) e ácido fórmico (Fluka® Analytical grau MS).

Métodos

Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de auto MS/MS no intervalo de m/z de 50-

1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Os parâmetros utilizados no equipamento foram: capilar a 4000 V, temperatura do gás: 200 °C, vazão do gás: 5 L.min⁻¹, nebulizador: 35 psi, energia de colisão: 10.

3.8 Experimento 8 - Isolamento e Purificação de Microgininas

Materiais

- Frasco com capacidade de 20 L da marca Pyrex®. Balões volumétricos, pipetas graduadas, analíticas e Pasteur, algodão, gaze e barbante. pHmetro modelo 827 (Metrohn®). Agitador magnético modelo Te-085 com aquecimento (Tecnal®). Bancada de fluxo laminar vertical. Estufa incubadora modelo NT-780 (Novatecnica®) com controle de fotoperíodo da marca Coel®. Autoclave vertical modelo AV Plus (Pheonix Luferco®). Reagentes para o preparo das soluções estoques do meio ASM-1. Balança analítica Série Cubis modelo MSU (Sartorius®)

Métodos

A cepa controle LTPNA 08 foi cultivada em condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C), fotoperíodo (12 h) e irradiância (22 µmoles.fótons.m⁻².s⁻¹), em meio de cultura ASM-1, descrito por Gorham *et al.* (1964) (77), pH inicial 8,0, sem aeração. No final do experimento, fase estacionária de crescimento, o material foi liofilizado e utilizado nas análises bioquímicas.

Materiais

- Geladeira (Eletrolux®) e Freezer -20 °C (Eletrolux®). Centrífuga modelo 5804-R (Eppendorf®). Liofilizador modelo L101 da Liotop®. Concentrador TE-019 (Tecnal®). Tubos de plástico de 50 mL da marca Falcon®. Solventes orgânicos

metanol da marca JTBacker®. Filtros com diâmetro de 0,45 µm da marca Millex®. Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer (OMNI International®). Seringas de plástico com capacidade de 1 mL da marca Becton Dickinson®. *Vials* (Agilent®) e *inserts* (Flow Suply®). O HPLC é constituído por uma controladora (CBM-20A), uma bomba binária (LC- 20AT), degaseificador (DGU-20A₅), um amostrador automático (SIL-20AC), um coletor de frações (FRC-10A) e um detector de arranjo de diodo (DAD) (SPD-M20A) todos da marca Prominence da Shimadzu®. Colunas analíticas: Luna C18(2) (250 mm x 3 mm, 5 µm, Phenomenex®) e Luna C18(2) (250 mm x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex®) e coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 µm, Phenomenex®). Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ®, Millipore®). Ácido Fórmico (Fluka® Analytical grau MS). Colunas para extração em fase sólida C18 (Sep-Pak® de 10 g 35cc). Sistema para extração em fase sólida (SPE) e cuba de vidro da marca Phenomenex®. Bomba de vácuo TE 058 (Tecnal®). Os testes foram realizados em triplicatas.

Métodos

Para obtenção de biomassa, foram cultivados 20 litros da linhagem LTPNA 08. Após um mês de cultivo foi realizado a centrifugação do material (4000 g, por 6 min) e o concentrado celular foi liofilizado, obtendo 3 gramas de biomassa seca. O material seco foi dividido em duas amostras de 1,5 g para a realização de dois ensaios com a ECA. O material seco foi extraído três vezes com metanol 70%.

A separação e a otimização cromatográficas foram realizadas em colunas: Luna C18(2) (250 mm x 3 mm, 5 µm, Phenomenex®), Luna C18(2) (250 mm x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex®) e coluna semi preparativa Luna

C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 μ m, Phenomenex®).utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (A) água com 0,1% de ácido fórmico (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹ para as colunas analíticas e 3,5 mL.min⁻¹ para a coluna semi preparativa. A análise foi conduzida em gradiente, seguindo metodologia descrita por Lawton *et al.* (1994) (78) e modificado de acordo com o perfil dos picos nas corridas de otimização. Os cromatogramas gerados foram monitorados em $\lambda_{\text{máx}}$ 276 nm e entre 200 a 700 nm no detector DAD.

Materiais

- Equipamento de HPLC com detecção por UV-Visível (SPD-M20A) acoplado em espectrômetro de massas Micro TOF-QII, Bruker Daltonics®. O HPLC é constituído por uma controladora (CBM-20A), uma bomba quaternária (LC-20AB) ou binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20AC) todos da marca Prominence da Shimadzu®. O espectrômetro é equipado com uma fonte ESI, que foi operada no modo positivo. Os dados foram coletados a partir do modo *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker®). A água (H₂O) utilizada como fase móvel é ultra pura (MilliQ®, Millipore®). Formiato de amônio (Fluka® Analytical HPLC) e ácido fórmico (Fluka® Analytical grau MS).

Métodos

Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O

espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de m/z de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Os parâmetros utilizados no equipamento foram: capilar a 4000 V, temperatura do gás: 200 °C, vazão do gás: 5 L.min⁻¹, nebulizador: 35 psi, energia de colisão: 10.

3.9 Experimento 9 - Quantificação das frações de microgininas por espectrofotometria

Materiais

- Espectrofotômetro modelo Evolution 260 Bio (Thermo Scientific®). Cubetas de quartzo. Padrão de L-Tirosina (Sigma Aldrich®). Solução de NaOH 1 M. Frações de microgininas isoladas.

Métodos

Determinou-se a concentração das duas frações de microgininas (isolados das duas amostras de 1,5 g cada) por espectrofotometria com base na quantificação relativa do aminoácido L-tirosina (Sigma-Aldrich, apresentando 99% de pureza). As curvas de calibração foram realizadas com a leitura da absorbância de soluções de tirosina nas concentrações de 1 mM, 0,4 mM, 0,1 mM e 0,01 mM em NaOH 0,1 M. O comprimento de onda utilizado foi o de 293 nm, $\lambda_{\text{máx}}$ da tirosina. Utilizou-se a solução de NaOH 0,1 M como branco.

As frações de microgininas secas obtidas pós-isolamento foram ressuspensas em 5 mL de MeOH 100% e retirado 200 µL. Esse volume das frações, 200 µL, foi seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 1,5 mL de NaOH 0,1 M para ser realizada sua análise no espectrofotômetro. A leitura foi

realizada em triplicata e a média das absorbâncias foi utilizada para o cálculo da concentração.

O cálculo utilizado para a quantificação relativa de microginina foi baseado na equação da reta obtida com a curva de calibração. O resultado final foi expresso em mg de microgininas em equivalentes de tirosina.

3.10 Experimento 10 - Ensaio enzimático com compostos isolados – Enzima conversora de angiotensina (ECA) (0,1 U/mL)

Materiais

- Thermomixer comfort (Eppendorf®). Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) 0.25 U (Sigma-Aldrich®). Hipuril-Histidil-Leucina (Sigma-Aldrich®). Captopril (Sigma-Aldrich®). Padrão analítico de Microcistina-LR ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Abraxis®, Canadá). Microgininas obtidas por isolamento. HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) Prominence (Shimadzu®). HPLC constituído por uma controladora (CBM-20A), duas bombas binárias (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20A_{HT}) todos da marca Prominence da Shimadzu®. Ácido trifluoracético (TFA) (EMD®). Trietilamina (Fisher®). Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker®). Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Tampão borato 100 mM (NaOH e ácido bórico) pH 8,3 contendo $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl.

Métodos

A capacidade de inibição da ECA foi avaliada de acordo com o método descrito por Wang *et al.* (2013) (62), que emprega o tripeptídeo hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu ou HHL) como substrato e avalia a formação de ácido hipúrico por cromatografia em fase líquida (HPLC-DAD). Em resumo, a enzima comercial e o substrato Sigma-Aldrich são dissolvidos em tampão borato

(NaOH e ácido bórico) 100 mmol.L^{-1} pH 8,3 contendo 300 mmol.L^{-1} NaCl ($0,1 \text{ U/mL}$ e 5 mmol.L^{-1} , respectivamente). A enzima é então pré-incubada na presença ou ausência de inibidor (microgininas isoladas, padrão de microcistina-LR ou captopril) por 30 minutos a 37°C , sendo a reação iniciada pela adição de substrato. Após 30 minutos, a reação é interrompida pela adição de $250 \mu\text{L}$ de ácido clorídrico e a amostra diretamente injetada no sistema cromatográfico. As concentrações dos inibidores escolhidas para o experimento foram: $0,005 \mu\text{M}$, $0,01 \mu\text{M}$, $0,02 \mu\text{M}$ e $0,04 \mu\text{M}$ para o captopril (Sigma® - $\text{IC}_{50} = 0.021 \pm 0.013 \mu\text{M}$), $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as microgininas e $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o padrão de microcistina-LR. A separação ocorreu em coluna de fase reversa (Luna C18(2), $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; Phenomenex®, EUA) utilizando-se (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético e 0,05% trietilamina e (B) acetonitrila como fase móvel, na proporção 70:30 de A:B. A eluição utilizada foi isocrática e a formação de ácido hipúrico (HA) monitorada em 226 nm. O sistema de reação compreende: $10 \mu\text{L}$ HHL (5 mmol.L^{-1}), $10 \mu\text{L}$ ECA ($0,1 \text{ U/mL}$), $40 \mu\text{L}$ inibidor e $40 \mu\text{L}$ de tampão borato 100 mM (pH = 8,3).

O experimento seguiu o protocolo abaixo:

<p><u>Em tampão</u></p> <p>HHL – 2 mg – em 1 mL de tampão → 5 mM</p> <p>Enzima – $18 \mu\text{L}$ → 1 mg/mL (estoque) – para $0,1 \text{ U/mL}$ → retirar $2,5 \mu\text{L}$ para $350 \mu\text{L}$</p>
<p><u>Em água</u></p> <p>Captopril (Sigma - $\text{IC}_{50} = 0.021 \pm 0.013 \mu\text{M}$) – 3 mg em 1,5 mL → 2 mg/mL ($9,2 \mu\text{M}$)</p> <p>Intermediário → $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ → $108 \mu\text{L}$ de $9,2 \mu\text{M}$ para 1 mL</p> <p>$0,04 \mu\text{M}$ ($8,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) → $20 \mu\text{L}$ de $1 \mu\text{M}$ para $500 \mu\text{L}$</p> <p>$0,02 \mu\text{M}$ ($4,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) → $250 \mu\text{L}$ de $0,04 \mu\text{M}$ para $500 \mu\text{L}$</p>

0,01 μM (2,1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) $\rightarrow$ 250 μL de 0,02 μM para 500 μL 0,005 μM (1,08 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) $\rightarrow$ 250 μL de 0,01 μM para 500 μL
Microginina $\rightarrow$ 2,6 mg 800 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 3250 μL 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 312 μL de 800 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 500 μL 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 100 μL de 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 500 μL 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 250 μL de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 500 μL 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 100 μL de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 500 μL 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 250 μL de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 500 μL
Microcistina-LR $\rightarrow$ 10 μg $\rightarrow$ 200 μL $\rightarrow$ 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 40 μL de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 200 μL 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $\rightarrow$ 50 μL de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para 100 μL

O tampão foi incubado por 5 minutos no thermomixer a 37°C, logo após esse tempo, foram adicionados o inibidor (microgininas isoladas, padrão de microcistina-LR ou captopril) e a enzima e mais 5 minutos foram esperados. Após esse período, o substrato foi adicionado para o início da reação.

3.11 Experimento 11 – Segundo ensaio enzimático com compostos isolados – Enzima conversora de angiotensina (ECA) (0,2 U/mL)

Materiais

- Thermomixer comfort (Eppendorf®). Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) 0.25 U (Sigma-Aldrich®). Hipuril-Histidil-Leucina (Sigma-Aldrich®). Captopril (Sigma-Aldrich®). Padrão analítico de Microcistina-LR (10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) (Abraxis®, Canadá). Microgininas obtidas por isolamento. HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) Prominence (Shimadzu®). HPLC constituído por uma controladora (CBM-20A), duas bombas binárias (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃) e um amostrador automático (SIL-20A_{HT}) todos da marca Prominence da Shimadzu®. Ácido trifluoracético (TFA) (EMD®).

Trietilamina (Fisher®). Acetonitrila (ACN) (J.T.Baker®). Todos os solventes utilizados na cromatografia são grau analítico. Tampão borato 100 mM (NaOH e ácido bórico) pH 8,3 contendo 300 mmol.L⁻¹ NaCl.

Métodos

A capacidade de inibição da ECA foi avaliada de acordo com o método descrito por Wang *et al.* (2013) (62), que emprega o tripeptídeo hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu ou HHL) como substrato e avalia a formação de ácido hipúrico por cromatografia em fase líquida (HPLC-DAD). Em resumo, a enzima comercial e o substrato Sigma-Aldrich são dissolvidos em tampão borato (NaOH e ácido bórico) 100 mmol.L⁻¹ pH 8,3 contendo 300 mmol.L⁻¹ NaCl (0,2 U/mL e 5 mmol.L⁻¹, respectivamente). A enzima é então pré-incubada na presença ou ausência de inibidor (microgininas isoladas, padrão de microcistina-LR ou captopril) por 30 minutos a 37 °C, sendo a reação iniciada pela adição de substrato. Após 30 minutos, a reação é interrompida pela adição de 250 µL de ácido clorídrico e a amostra diretamente injetada no sistema cromatográfico. As concentrações dos inibidores escolhidas para o experimento foram: 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM e 0,8 µM para o captopril (Sigma® - IC₅₀ = 0.021 ± 0.013 µM), 5 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹ e 800 µg.mL⁻¹ para as microgininas e 5 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ para o padrão de microcistina-LR. A separação ocorreu em coluna de fase reversa (Luna C18(2), 150 x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex®, EUA) utilizando-se (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético e 0,05% trietilamina e (B) acetonitrila como fase móvel, na proporção 70:30 de A:B. A eluição utilizada foi isocrática e a formação de ácido hipúrico (HA) monitorada em 226 nm. O sistema de reação compreende: 10µL HHL (5 mmol.L⁻¹), 10 µL ECA (0,2 U/mL), 40 µL inibidor e 40 µL de tampão borato 100 mM (pH = 8,3).

O experimento seguiu o protocolo abaixo:

<p><u>Em tampão</u></p> <p>HHL – 2 mg – em 1 mL de tampão → 5 mM</p> <p>Enzima – 18 μL → 1 mg/mL (estoque) – para 0,2 U/mL → retirar 7,2 μL para 500 μL</p>
<p><u>Em água</u></p> <p>Captopril (Sigma - $\text{IC}_{50} = 0.021 \pm 0.013 \mu\text{M}$) – 3 mg em 1,5 mL → 2 mg/mL (9,2 μM)</p> <p>Intermediário → 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 108 μL de 9,2 μM para 1 mL</p> <p>0,8 μM → 400 μL de 1 μM para 500 μL</p> <p>0,4 μM → 250 μL de 0,8 μM para 500 μL</p> <p>0,2 μM → 250 μL de 0,4 μM para 500 μL</p> <p>0,1 μM → 250 μL de 0,2 μM para 500 μL</p>
<p>Microginina → 2,2 mg</p> <p>800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 3250 μL</p> <p>500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 312 μL de 800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 500 μL</p> <p>100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 100 μL de 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 500 μL</p> <p>50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 250 μL de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 500 μL</p> <p>10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 100 μL de 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 500 μL</p> <p>5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 250 μL de 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 500 μL</p>
<p>Microcistina-LR → 10 μg → 200 μL → 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$</p> <p>10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 40 μL de 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 200 μL</p> <p>5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ → 50 μL de 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para 100 μL</p>

O tampão foi incubado por 5 minutos no thermomixer a 37°C, logo após esse tempo, foram adicionados o inibidor (microgininas isoladas, padrão de microcistina-LR ou captopril) e a enzima e mais 5 minutos foram esperados. Após esse período, o substrato foi adicionado para o início da reação.

4. RESULTADOS

Experimento 1 – Contagem de células das cepas controle

Os cultivos realizados em triplicata das duas cepas controle correspondem a duas linhagens do gênero *Microcystis* que tiveram o crescimento acompanhado pela contagem dos organismos de três em três dias (Figura 6).

Figura 6 – Curvas de crescimento das cepas LTPNA 08 e LTPNA 09, respectivamente.

Experimentos 2 e 3 – Cultivo e manutenção das linhagens analisadas e Análise das linhagens por HPLC

As análises por HPLC-DAD das cepas controle revelaram a presença de duas microcistinas, MC-RR e MC-LR, duas microgininas (MG770 e MG756) e um pico desconhecido (Figura 7). Assim sendo, as duas cepas apresentam o mesmo perfil de produção de peptídeos. Os espectros de absorção em UV-VIS dos picos estão representados na Figura 8. Além disso, foi realizada uma corrida com uma mistura de 4 padrões comerciais de microcistinas para auxiliar na identificação das variantes dessas cianotoxinas pela comparação dos tempos de retenção (Figura 9) e espectros no UV-VIS.

Figura 7 – Cromatograma obtido na análise por HPLC-DAD (Shimadzu®) de extrato bruto das linhagens (a) LTPNA 08 e (b) LTPNA 09. Os picos numerados correspondem a diferentes compostos, onde: (1) MC-RR; (2) pico desconhecido; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. As duas cepas apresentam o mesmo perfil de produção de compostos. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 μ m ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹.

Figura 8 - Espectros de absorção obtidos do cromatograma da Figura 7 pelo detector DAD nas faixas de 200 a 700 nm, onde: (a) MC-RR; (b) MC-LR; (c e d) microgininas 756 e 770; (e) pico desconhecido.

Figura 9 - Corrida cromatográfica de uma mistura de padrões comerciais de microcistinas, onde: (A) MC-RR; (B) MC-YR; (C) MC-LR; (D) MC-LA. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluorácetico (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluorácetico (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹.

As espécies analisadas para a verificação da produção de microgininas pertencem aos gêneros: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Radiocystis*, *Sphaerocavum*, *Sphaerospermopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Leptolyngbya*, *Pleurocapsa*, *Chroococcidiopsis*, *Nostoc*, *Brasilonema*, *Desmonostoc*, *Oculatella* e *Limnothrix*, além de outras espécies das famílias *Pseudanabaenaceae*,

Nostocaceae e *Michochaetaceae* que não tiveram suas identificações concluídas. Nas análises por HPLC-DAD não foram encontrados picos com espectros de UV característicos de microgininas nas 59 cepas avaliadas (Figuras 10 e 11). Algumas linhagens se revelaram produtoras de variantes do cianopeptídeo microcistina, possuindo absorção UV máxima em 238 nm. Em todos os testes as cepas 08 e 09 foram utilizadas como comparativo.

Figura 10 – Cromatogramas em HPLC-DAD (Shimadzu®), em 276 nm de representantes das 59 cepas analisadas, segundo metodologia descrita por Lawton *et al.*(1994) (78). A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹.

Figura 11 – Espectros de absorção no UV-VIS característicos de (a) microcistinas e (b) microgininas obtidos em HPLC-DAD (Shimadzu®).

Experimento 4 – Testes de extração e pré-fracionamento de cianopeptídeos com as cepas controle

Nos primeiros testes de extração e purificação em que foram analisadas três frações de polaridades diferentes, a MC-LR foi identificada na fração metanólica 50% e os demais compostos na fração 95% (Figura 12).

Figura 12 – Cromatogramas do extrato da linhagem LTPNA 08 após a etapa de extração em SPE com lavagens de diferentes porcentagens de metanol, onde: (1) MC-RR; (2) pico desconhecido ; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 μ m ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹.

No outro teste de fracionamento, os compostos foram encontrados nas frações metanólicas de 40%, 60% e 80% (Figura 13).

Figura 13 – Cromatogramas do extrato da linhagem LTPNA 08 após a etapa de extração em SPE com lavagens utilizando diferentes porcentagens de metanol, onde: (1) MC-RR; (2) pico desconhecido; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 μ m ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹.

Nos testes de limpeza da amostra com extração líquido-líquido utilizando-se acetato de etila e água, os interferentes e o pico desconhecido, assim como pequenas quantidades de microgininas, foram encontrados na fração orgânica (Figura 14).

Figura 14 - Corridas cromatográficas da extração líquido-líquido. O pico 1 mostra a molécula desconhecida, indicando que ela é removida na extração com acetato de etila. Onde: (1) pico desconhecido; (2) MC-RR; (3 e 4) microgininas (MG756 e MG770); (5) MC-LR. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna Luna C18 (250 mm x 3 mm I.D., 5 µm ODS Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e (B) acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). A vazão utilizada foi a de 0,5 mL.min⁻¹.

Experimento 5 - Análise de microgininas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)

As análises de microgininas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial corroboraram os resultados obtidos pelo HPLC-DAD da não detecção de microgininas nas amostras (Figura 15).

Figura 15 – Cromatogramas gerados em sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity acoplado a espectrômetro de massas triplo-quadrupolo monitorando-se os íons produto de m/z 128 e 142. (a) Exemplos de cromatogramas gerados pelas cepas analisadas; (b) Cepas controle do gênero *Microcystis*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se nitrogênio como gás de colisão.

As cepas controle quando analisadas no espectrômetro de massas triplo quadrupolo no modo *precursor ion* revelam a presença das microgininas 770 e 756 (Figura 16).

Figura 16 – Espectros MS das microgininas (a) 770 e (b) 756 das cepas controle. Os espectros foram obtidos por espectrômetro de massas triplo quadrupolo, *electrospray* no modo positivo utilizando-se o modo de operação *precursor ion*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹.

As cepas controle foram também analisadas em espectrômetro de massas Micro-TOF para identificação dos cianopeptídeos de interesse. A Figura 18 apresenta os espectros de massas (MS) das duas microgininas presentes nas cepas controle e a Figura 17 apresenta os espectros de massas (MS²). As

variantes apresentam $m/z = 770.5$ e 756.5 . Nos espectros MS^2 é possível verificar a presença dos íons 128 e 142.

Figura 17 - Espectros de massas em MS^2 das duas microgininas (a – MG770 e b – MG756) das cepas controle. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-TOF. Os íons produto de m/z 142 e 128, característicos das microgininas, estão circulados. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de m/z de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%).

Figura 18 – Espectro de massa em MS que deu origem aos espectros MS² da Figura 17. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-TOF. As microgininas 756 e 770 estão circuladas. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 µm; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de *m/z* de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%).

Experimento 6 - Ensaio enzimático – Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Foram realizados ensaios enzimáticos iniciais com a enzima ECA seguindo a metodologia de Wang *et al.* (2013) (62) (Figura 19). Foi possível verificar a transformação de HHL em HA sob a ação da ECA. Na presença do inibidor comercial Captopril a transformação não ocorreu.

Além disso, foram realizadas corridas individuais com os padrões de HHL e HA e conjuntamente para se conhecer os tempos de retenção e espectros UV característicos (Figura 20).

Figura 19 – Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (Shimadzu®) de ensaios iniciais com a ECA utilizando a metodologia de Wang *et al.* (2013) (62), onde: (a) HHL; (b) HA; (c) separação entre HHL e HA; (d) captopril inibindo a formação do produto; (e) formação de produto. A separação ocorreu em coluna de fase reversa (Luna C18(2), 150 x 3,0 mm, 3 μ m; Phenomenex®, EUA) utilizando-se (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético e 0,05% trietilamina e (B) acetonitrila como fase móvel, na proporção 70:30 de A:B. A eluição utilizada foi isocrática e a formação de ácido hipúrico (HA) monitorada em comprimento de onda de 226 nm.

Figura 20 – Espectros de UV do (a) substrato HHL (tempo de retenção = 4,58 min) e (b) do produto HA (tempo de retenção = 5,25 min) obtidos pelo detector DAD.

Nos primeiros ensaios com a ECA foi possível perceber o potencial de inibição das frações de diferentes polaridades dos extratos das cepas LTPNA 08 e 09 (Figura 21). A fração de 40% que contém a microcistina-LR apresentou o maior potencial de inibição da formação do produto. As frações que contêm as microgininas também se mostraram ativas.

Figura 21 - Atividade residual da enzima e inibição em porcentagem da formação do produto HA de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013)(62). Frações em triplicata.

Experimento 7 – Avaliação de extratos de cianobactérias potencialmente produtoras de microgininas

Foram enviados gentilmente pelo Prof. Shmuel Carmeli três extratos/frações de *Microcystis aruginosa* procedentes de florações de cianobactérias em Israel: IL-349, AL-9.4 e IL-428. Em dois dos extratos foi confirmada a presença de microgininas pelo grupo do Prof. Carmeli, o terceiro extrato é suspeito de conter microgininas.

O extrato de IL-349, segundo o Prof. Carmeli, contém a microginina SD755 publicada em 2001 (80) e possivelmente microgininas menores adicionais.

A Fração AL-9.4, segundo o Prof. Carmeli, contém a mistura de possivelmente cinco microgininas inéditas com as seguintes sequências:

NMe-Ahda-Tyr-NMe-Leu-Pro-Tyr
 Cl-NMe-Ahda-Tyr-NMe-Leu-Pro-Tyr
 Cl-NMe-Ahda-Tyr-NMe-Leu-Pro-Tyr-OMe
 Cl₂-NMe-Ahda-Tyr-NMe-Leu-Pro-Tyr
 Cl-NMe-Ahda-Tyr-NMe-Leu-Pro

O extrato de IL-428, segundo o Prof. Carmeli, possivelmente contém microgininas. As três amostras contêm de 1-10 mg de material.

As amostras foram submetidas análise de *precursor ion* no espectrômetro de massas triplo quadrupolo. Não foi possível a detecção dos íons produto de m/z 128 e 142 nas amostras IL-328 e IL-428. A amostra AL-9.4 apresentou 5 picos gerados pelos íons produtos pesquisados, sendo um do íon 128 e 4 do íon 142 (Figura 22).

Figura 22 – Espectros gerados em sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity acoplado a espectrômetro de massas triplo-quadrupolo com fonte de ionização *electrospray* monitorando-se os íons produto de m/z 128 e 142. O espectrômetro foi operado no modo positivo utilizando-se varredura do tipo *precursor ion*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. (a) Amostra IL-349 (128-em vermelho/142-em verde) (b) Amostra AL-9.4 (128-em vermelho/142-em azul) (c) Amostra IL-428 (128-em preto/142-em roxo)

De acordo com as sequências das possíveis microgininas da amostra AL-9.4 fornecidas pelo Prof. Carmeli, podemos deduzir as seguintes massas: 768, 802.4, 816.4, 836.8, 639.2. Porém, os picos dos íons produtos 128 e 142 gerados nos espectros de *precursor ion* (Figura 22(b)) vieram de íons precursores de massas diferentes como apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Espectros dos íons precursores dos picos de m/z 128 e 142 encontrados na amostra AL-9.4 (a) primeiro pico (b) segundo pico (c) terceiro pico (d) quarto pico e (e) quinto pico da Figura 22. Os espectros foram obtidos por espectrômetro de massas triplo quadrupolo, *electrospray* no modo positivo utilizando-se o modo de operação *precursor ion*. Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹.

Foi realizada também análise das amostras no espectrômetro de massas Micro-QTOFII no modo auto MS/MS para ver se os íons das massas fornecidas pelo Prof. Carmeli geravam os íons m/z 128 e 142, mas esses fragmentos não foram encontrados.

Experimento 8 - Isolamento e Purificação de Cianopeptídeos

A corrida cromatográfica inicialmente utilizada para detecção e estudo dos compostos foi conduzida seguindo a metodologia de Lawton *et al.* (1994) (78) em coluna analítica. A fim de ser realizado o isolamento dos compostos de interesse (microgininas) em escala semipreparativa (coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 μ m, Phenomenex®), o método de Lawton foi otimizado para que fosse possível diminuir o tempo da corrida e utilizar uma fase móvel de melhor custo/benefício.

Foram testados diferentes gradientes e fases móveis utilizando: metanol, acetonitrila, ácido fórmico e ácido trifluoracético (TFA), variando as condições. A corrida em gradiente foi otimizada de 55 min para 24 min e utilizando metanol 100% na fase móvel B e ácido fórmico 0,1% como acidificante tanto para água

quanto para o metanol (Figura 24). Essas foram as condições utilizadas para isolamento das microgininas em coluna semipreparativa.

Figura 24 – Gráfico dos gradientes utilizados nas corridas cromatográficas do método inicial de detecção dos compostos de interesse e do método otimizado para isolamento das microgininas.

Após a otimização do método, procedeu-se a escolha mais adequada dos parâmetros do coletor de frações, chegando-se ao final em um valor de *slope*: 4000 $\mu\text{V}/\text{sec}$ e de *level*: 65000 μV .

1,5 gramas dos 3 g de biomassa seca obtidos foram extraídos com metanol 70% e purificados em coluna de SPE realizando-se as lavagens de metanol 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Foi verificado que os picos das microgininas foram encontrados nas frações de lavagens de metanol 60% e 80%. Sendo assim, a partir dessas frações, procedeu-se o isolamento (Figuras 25 e 26).

Figura 25 - Cromatogramas e espectros de UV da fração de SPE de lavagem com 60% de metanol da linhagem LTPNA 08, onde em (a) e (b): (0) MC-LR; (1 e 2) microgininas (MG756 e MG770); (3) final do pico da microginina majoritária. Os espectros de UV (c), (d) e (e) correspondem respectivamente à microcistina-LR e às microgininas 756 e 770. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 μ m, Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 3,5 mL.min⁻¹. O pico rajado de número 2 mostra a fração que foi isolada.

Figura 26 - Cromatogramas e espectros de UV da fração de SPE de lavagem com 80% de metanol da linhagem LTPNA 08, onde em (a) e (b): (0) MC-LR; (2 e 3) microgininas (MG756 e MG770); (4) final do pico da microginina majoritária. Os espectros de UV (c), (d) e (e) correspondem respectivamente à microcistina-LR e às microgininas 756 e 770. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 μ m, Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 3,5 mL.min⁻¹. O pico rajado de número 3 mostra a fração que foi isolada.

Os picos referentes às microgininas (m/z 770, 756) foram coletados. Os dados de UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 276 nm, Figuras 25 e 26), bem como a análise de MS (Figura 27) das frações realizada após a etapa de isolamento confirmaram o isolamento das moléculas e a identidade dos picos.

No espectro de massas da fração de microgininas, pode-se observar a presença das duas variantes: Microginina m/z 756 e Microginina m/z 770. A Figura 27 evidencia a maior concentração da MG770 em relação a MG756 na

fração pós-isolamento. Ao final do processo, foi possível obter uma fração de microgininas enriquecida com as duas variantes ($m/z=756$ e 770).

Figura 27 - Espectros de massas da fração de microgininas pós-isolamento. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-QTOFII . Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de m/z de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Onde: (a) espectro de massas da fração de microgininas (b) MG756 (c) MG770; (d) contaminante da fração.

Os outros 1,5 gramas dos 3 g de biomassa seca obtidos também foram extraídos com metanol 70% e purificados em coluna de SPE realizando-se as lavagens de metanol 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Foi verificado que os picos das microgininas foram encontrados nas frações de lavagens de metanol 60%

e 80%. No entanto, procedeu-se o isolamento a partir apenas da fração de 60% para tentar obter um isolado mais puro que o dos primeiros 1,5 g (Figura 28).

Figura 28 - Cromatogramas e espectros de UV da fração de SPE de lavagem com 60% de metanol da linhagem LTPNA 08, onde em (a) e (b): (0) MC-LR; (1 e 2) microgininas (MG756 e MG770). Os espectros de UV (c), (d) e (e) correspondem respectivamente à microcistina-LR e às microgininas 756 e 770. A separação cromatográfica foi realizada em HPLC-DAD (Shimadzu®), coluna semi preparativa Luna C18(2) (250 mm x 10 mm, 5 µm, Phenomenex®), utilizando como fase móvel (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico. A vazão utilizada foi a de 3,5 mL.min⁻¹. O pico rajado de número 2 mostra a fração que foi isolada.

O pico 2 referente às microgininas (m/z 770, 756) foi coletado. Os dados de UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 276 nm, Figura 28), bem como a análise de MS (Figura 29) das frações realizada após a etapa de isolamento confirmaram o isolamento das moléculas e a identidade dos picos.

No espectro de massas, observou-se a presença das duas variantes: Microginina m/z 756 e Microginina m/z 770. A Figura 29 evidencia a maior

concentração da MG770 em relação a MG756 na fração pós-isolamento. Ao final do processo, foi possível obter uma fração de microgininas enriquecida com as duas variantes ($m/z=756$ e 770).

Figura 29 - Espectros de massas da fração de microgininas pós-isolamento. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas Micro-QTOFII . Foi utilizada coluna Fusion-RP (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex®, EUA) empregando-se (A) 5 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como solventes, sob eluição a 0,2 mL.min⁻¹. O espectrômetro foi operado no modo de *full scan* (varredura total de íons) no intervalo de m/z de 50-1600. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização, utilizando-se argônio como gás de colisão (35%). Onde: (a) espectro de massas da fração de microgininas (b) MG756 (c) MG770; (d) contaminante da fração.

Experimento 9 - Quantificação da fração de microgininas por espectrofotometria

A quantificação das frações de microgininas dos experimentos 10 e 11 foi realizada por equivalentes de tirosina com a técnica de espectrofotometria. As tabelas 2 e 3 apresentam a leitura das absorvências das soluções dos padrões de *L*-tirosina nas concentrações de: 1 mM, 0,4 mM, 0,1 mM e 0,01 mM, e também a leitura realizada das amostras, todas realizadas em triplicata. As Figuras 30 e 31 mostram as curvas padrão obtidas.

Tabela 2 - Medida das absorvências das soluções de tirosina por espectrofotometria (média das determinações para cada concentração; n = 3) – Experimento 10.

Amostras	Absorvância (293 nm)
Solução de Tyr 1 mM	2,296
Solução de Tyr 0,4 mM	0,939
Solução de Tyr 0,1 mM	0,228
Solução de Tyr 0,01 mM	0,033
Fração de Microgininas	0,436

Tabela 3 - Medida das absorvências das soluções de tirosina por espectrofotometria (média das determinações para cada concentração; n = 3) – Experimento 11.

Amostras	Absorvância (293 nm)
Solução de Tyr 1 mM	2,373
Solução de Tyr 0,4 mM	0,996
Solução de Tyr 0,1 mM	0,243
Solução de Tyr 0,01 mM	0,021
Fração de Microgininas	0,393

Figura 30 – Curva padrão obtida das soluções de tirosina nas concentrações de 1 mM, 0,4 mM, 0,1 mM, 0,01 mM em NaOH 0,1 M - Experimento 10.

Figura 31 – Curva padrão obtida das soluções de tirosina nas concentrações de 1 mM, 0,4 mM, 0,1 mM, 0,01 mM em NaOH 0,1 M – Experimento 11.

Após a leitura das soluções de tirosina em NaOH 0,1 M, no comprimento de onda de 293 nm, foi possível construir as curvas padrão e, dessa forma, obter as equações das retas: $y = 2,2914x + 0,009$ e $y = 2,3738x + 0,0121$, que apresentaram coeficientes de correlação linear de: $(R^2) 0,9999$ e $(R^2) = 0,9995$,

respectivamente. Os cálculos utilizados para a determinação das massas de microgininas estão descritos abaixo.

CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO PELA EQUAÇÃO DA RETA:

$$y = 2,2914x + 0,009 \text{ (equação da reta)}$$

$$0,436 \text{ (leitura da absorbância da amostra)} = 2,2914x + 0,009$$

$$x = 0,1864 \text{ mM de tirosina}$$

$$\boxed{\text{Microginina} - \text{homotirosina} + \text{tirosina}}$$

$$0,1864 \div 2 = 0,0932 \text{ mM de microginina}$$

$$1 \text{ M} = 769 \text{ g.L}^{-1} \text{ (peso molecular da microginina)}$$

$$1 \text{ mM} = 769 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$0,0932 \text{ mM} \times 769 \text{ mg.L}^{-1} = 71,7 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{Em } 1500 \text{ mL} = (71,7 \times 1,5) \div 1000 = 0,11 \text{ mg}$$

$$\rightarrow 0,11 \text{ mg de } 200 \text{ uL}$$

$$\text{Em } 4,8 \text{ mL} = (0,11 \times 4800) \div 200 = 2,6 \text{ mg}$$

Portanto, obteve-se uma massa de microginina de 2,6 mg de equivalentes de tirosina em 1,5 g de biomassa seca que foi utilizada no experimento 10.

CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO PELA EQUAÇÃO DA RETA:

$$y = 2,3738x + 0,0121 \text{ (equação da reta)}$$

$$0,393 \text{ (leitura da absorbância da amostra)} = 2,3738x + 0,0121$$

$$x = 0,1605 \text{ mM de tirosina}$$

$$\boxed{\text{Microginina} - \text{homotirosina} + \text{tirosina}}$$

$$0,1605 \div 2 = 0,0802 \text{ mM de microginina}$$

$$1 \text{ M} = 769 \text{ g.L}^{-1} \text{ (peso molecular da microginina)}$$

$$1 \text{ mM} = 769 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$0,0802 \text{ mM} \times 769 \text{ mg.L}^{-1} = 61,7 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{Em } 1500 \text{ mL} = (61,7 \times 1,5) \div 1000 = 0,09 \text{ mg}$$

→ 0,09 mg de 200 uL

Em 4,8 mL = $(0,09 \times 4800) \div 200 = 2,2 \text{ mg}$

Portanto, obteve-se uma massa de microginina de 2,2 mg de equivalentes de tirosina dos outros 1,5 g de biomassa seca que foi utilizada no experimento 11.

Experimento 10 - Ensaio enzimático com compostos isolados – Enzima conversora de angiotensina (ECA) (0,1 U/mL)

Para o ensaio de inibição da atividade enzimática da ECA, foi utilizado como controle positivo o captopril e como os possíveis inibidores as frações de microgininas e um padrão de MC-LR comercial.

O cálculo utilizado para informar a atividade da ECA é baseado na área dos picos de HHL e HA nos cromatogramas. A Figura 32 mostra o percentual de inibição da ECA para cada uma das frações, nas diferentes concentrações testadas.

Figura 32 - Atividade residual da ECA (0,1 U/mL) e inibição em porcentagem da formação do produto HA de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013)(62). Foram utilizados os inibidores captopril (C), microcistina-LR (MC) e fração de microgininas (MG) em diferentes concentrações em triplicata.

Após o ensaio de inibição da enzima ECA pelas frações testadas, pôde-se observar que somente o captopril, utilizado como controle positivo, inibiu a formação do produto em todas as concentrações testadas. A fração de MC-LR comercial apresentou percentual de inibição da enzima de conversão da angiotensina maior que 60% considerando-se a margem de erro. A fração de microgininas apresentou potencial de inibição, mas os resultados não se mostraram dose-dependentes.

Experimento 11 – Ensaio enzimático com compostos isolados – Enzima conversora de angiotensina (ECA) (0,2 U/mL)

Para o ensaio de inibição da atividade enzimática da ECA, foi utilizado como controle positivo o captopril e como os possíveis inibidores as frações de microgininas e um padrão de MC-LR comercial.

O cálculo utilizado para informar a atividade da ECA é baseado na área dos picos de HHL e HA nos cromatogramas. A Figura 33 mostra o percentual de inibição da ECA para cada uma das frações, nas diferentes concentrações testadas.

Figura 33 - Atividade residual da ECA (0,2 U/mL) e inibição em porcentagem da formação do produto HA de acordo com método descrito por Wang *et al.* (2013)(62). Foram utilizados os inibidores captopril (C), microcistina-LR (MC) e fração de microgininas (MG) em diferentes concentrações em triplicata.

Após o ensaio de inibição da enzima ECA pelas frações testadas, pôde-se observar que tanto a fração de MC-LR comercial quanto a fração de microgininas apresentaram percentual de inibição, mas os resultados não se mostraram dose-dependentes.

5. DISCUSSÃO

A cromatografia de fase reversa com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) tem sido amplamente utilizada para análise de cianotoxinas. Essa técnica permite detectar variantes de microcistina com base no seu espectro de UV característico e o uso de gradiente permite que as variantes sejam separadas. Em razão das duplas conjugadas e anel aromático presentes no aminoácido Adda, há um cromóforo específico com comprimento de onda de absorção máximo característico em 238 nm (78). Além disso, o aminoácido Adda está presente em todas as variantes de microcistinas, sendo um excelente alvo para a confirmação da presença de microcistinas por UV-VIS e espectrometria de massas.

Para as microgininas, os dados de UV característicos ($\lambda_{\text{máx}}$ 224, 276 nm) indicam a presença de um aminoácido aromático (81), em praticamente todas as variantes há a presença dos aminoácidos tirosina ou homotirosina (tabela 1). Sendo assim, todas as 59 cepas foram analisadas em HPLC-DAD com detector em 276 nm. Nenhum dos picos registrados apresentou espectro UV característico de microgininas. Apesar dos indícios da não ocorrência da molécula pesquisada nas amostras, as cepas foram também avaliadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.

Dados de validação interlaboratoriais apoiam a abordagem cromatográfica combinada com concentração e *clean-up* por SPE (C18). Vários componentes da matriz e substâncias co-extraídas fazem da limpeza, identificação e quantificação do analito uma tarefa difícil. Microcistinas são geralmente concentradas em cartuchos de extração em fase sólida em fase reversa (SPE C18) (82), melhorando os limites de detecção (83). A extração em fase sólida (SPE) é utilizada para concentrar o conteúdo peptídico e

também como etapa de purificação por meio da ligação seletiva de componentes da matriz e pelo fracionamento durante o processo de eluição (84).

O fracionamento por SPE com metanol:água 5%, 50% e 95% não se mostrou eficiente, uma vez que compostos de interesse foram eluídos juntamente com impurezas e pigmentos na fração metanol:água 95%. O experimento com diferentes porcentagens de metanol:água demonstrou que compostos de interesse foram eluídos nas frações metanólicas de 40%, 60% e 80%. Portanto essas concentrações foram adotadas.

Para obtenção de maior quantidade de peptídeos, para a realização de bioensaios, por exemplo, a otimização dos processos de extração em grande escala é necessária para produzir métodos eficientes e rápidos em que os rendimentos possam ser maximizados (84).

A extração líquido-líquido se baseia na transferência de um soluto de uma fase líquida para outra de acordo com a sua solubilidade/polaridade. Se forem escolhidos os solventes de extração adequados, essa técnica pode ser usada para separar seletivamente uma substância de uma mistura ou para remover impurezas de uma solução. Normalmente uma das fases utilizada é a água ou uma solução aquosa ácida, básica ou tamponada e a outra um solvente orgânico que é imiscível em água (85).

No teste de limpeza da amostra com extração líquido-líquido foram utilizados: água e os solventes orgânicos: acetato de etila e n-butanol. Em ordem crescente de polaridade temos: acetato de etila < n-butanol < água. Substâncias polares, com coeficiente de partição menor (Log P baixo) ficam na fase de maior polaridade. Portanto, a extração líquido-líquido de extratos

aquosos com solventes apolares pode ser usada para reduzir a concentração das substâncias lipofílicas em relação às microcistinas (82).

O emprego da extração líquido-líquido sequencial se mostrou eficiente e poderia ter sido utilizada, uma vez que o acetato de etila retira pigmentos e interferentes (mais apolares) e os compostos de interesse ficam na fração butanólica. Porém, foi também possível observar um baixo rendimento, uma vez que parte dos compostos de interesse é transferida para a porção de acetato de etila e é perdida. A extração líquido-líquido não foi utilizada quando se procedeu os experimentos em escala semipreparativa em razão da obtenção de quantidade relativamente pequena de biomassa (3 g).

As microgininas são moléculas inibidoras da enzima conversora de angiotensina e seu modo de ação é semelhante ao inibidor comercial captopril. Sendo assim, essas moléculas se configuram como importantes candidatas ao desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos (31, 44).

O método de Wang *et al.* (2013) (62) para ensaios de bioatividade da ECA é conveniente por ser realizado no modo isocrático, rápido e promover uma boa separação dos compostos. Apesar disso, a presença da trietilamina na fase móvel faz com que o condicionamento da coluna demore cerca de 40 minutos.

Pelos ensaios de inibição da ECA com as frações de diferentes polaridades foi verificado que tanto as frações que continham microgininas, quanto a fração que continha microcistina-LR inibiram a formação do produto HA. Não foram encontrados na literatura artigos que evidenciassem essa correlação, portanto, essa pode ser uma nova linha de pesquisa a ser investigada.

Não é sabida a função das cianotoxinas na ecologia e fisiologia das cianobactérias. Várias hipóteses sobre as funções destes peptídeos têm sido discutidas como: proteção contra predação (86-88), alelopatia (89, 90), *quorum sensing* (91) e metabolismo interno (92). Também não é conhecida a função dos cianopeptídeos para as cianobactérias. Neumann *et al.* (1997) (81) reportaram a produção de microginina FR1 em altas concentrações em um *bloom* de *Microcystis* sp. Foi sugerida por esses pesquisadores a possibilidade desse cianopeptídeo inibir o crescimento de possíveis competidores.

Uma vantagem de cianobactérias como fonte para a descoberta de drogas reside na economia do seu cultivo em comparação com outros micro-organismos, uma vez que exigem apenas nutrientes inorgânicos simples para o crescimento. Apesar de suas atividades biológicas, muito poucos compostos de cianobactérias entraram em ensaios clínicos ou foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) (18).

Dos novos medicamentos aprovados entre 1983 e 1994, até 80% dos medicamentos anti-bacterianos e anti-cancerígenos foram derivadas de produtos naturais. Produtores de drogas microbianas tradicionais como *actinomycetes* e *hyphomycetes* estiveram no foco da investigação farmacêutica por décadas. Agora que a taxa de descoberta de compostos de interesse nestes organismos de origem clássica está diminuindo, as cianobactérias, por seu potencial, se configuram como uma importante linha de pesquisa (34).

O aumento da preocupação quanto à presença de espécies tóxicas em lagos de água potável e reservatórios leva a novos estudos de metabólitos de cianobactérias. Esse processo resulta nos isolamentos de novos e promissores metabólitos bioativos, especialmente compostos peptídicos com atividade inibitória de enzimas (15, 18, 25).

O reconhecimento das cianobactérias como fonte de metabólitos bioativos faz com que seja necessário o desenvolvimento de métodos confiáveis para detecção e quantificação desses compostos. Uma das principais dificuldades associadas à detecção dessas moléculas é a falta de material padronizado de referência. A classe de cianopeptídeos das microgininas, quando submetidas à dissociação induzida por colisão em experimentos de espectrometria de massas sequencial (CID-MS/MS), apresentam íons de m/z 128 ou m/z 142 em seu espectro de fragmentação (Figura 34). Esses íons originam-se da dissociação entre o C2 e o C3 do Ahda, sendo considerados diagnósticos dessa classe de compostos e, portanto, podem ser utilizados na identificação de possíveis variantes estruturais (49, 52).

Figura 34 - Estrutura das microgininas MG756 (R=H) e MG770 (R=CH₃). Adaptado de Carneiro *et al.* (2012) (49). Onde: (1) ácido 3-amino-2-hidróxi-decanoico; (2) valina; (3) leucina; (4) homotirosina; (5) tirosina.

Diferentemente do que ocorrem com as cepas controle, as 59 cepas analisadas não revelaram nenhum pico com fragmentação em 128 ou 142. O fato do Ahda ser uma região conservada das microgininas reforça a confiabilidade do método de triagem aqui proposto, que é seletivo para essas variantes.

Não foi possível identificar a molécula descrita como desconhecida. A molécula desconhecida pode ser um novo cianopeptídeo ou outro metabólito

secundário produzido pelas cepas estudadas, necessitando de outras análises espectroscópicas para sua identificação.

Em um processo de purificação típico, células de cianobactérias são extraídas, o extrato resultante é concentrado e purificado por técnicas de separação de amostra, embora o número de passos e métodos empregados variem muito. Nesse trabalho, metanol aquoso foi utilizado para a extração de cianopeptídeos, seguido por extração em fase sólida para a remoção de pigmentos e grandes moléculas interferentes, além de uma prévia separação dos compostos na amostra (84).

Para a cromatografia por HPLC, o ácido trifluoroacético (TFA) é muitas vezes utilizado como um modificador na fase móvel. A adição de TFA, não só mantém um pH baixo, de modo a protonar grupos de ácido carboxílico em peptídeos, mas também atua como um agente de pareamento iônico, aumentando a retenção de peptídeos que não apresentam regiões conservadas. Analitos com pequena diferença estrutural muitas vezes co-eluem em separações por HPLC. O uso de TFA parece ser ideal em sistemas preparativos, apresenta volatilidade e elimina a necessidade de uma fase de dessalinização. No entanto, isso não tem sido amplamente adotado, possivelmente, devido a problemas durante a etapa final de concentração (79, 93).

Os solventes orgânicos mais comumente utilizados para as fases móveis em cromatografia reversa são acetonitrila e metanol. A acetonitrila possui custo elevado, particularmente com a pureza necessária para uso em cromatografia (grau LC). No entanto, as condições analíticas indicadas em materiais de referência e pelos fabricantes de LC frequentemente utilizam acetonitrila como fase móvel. Além de mais barato e menos tóxico que a acetonitrila, quando o

metanol é misturado com a água, libera calor, o que tende a facilitar a liberação de bolhas. Em contraste, a acetonitrila diminui a temperatura de absorção de calor, de modo que as bolhas de ar são geradas mais tarde, quando a fase móvel volta gradualmente à temperatura ambiente. Por conseguinte, mais cuidado é necessário com relação à degaseificação. Devido ao custo/benefício, foi estabelecida uma otimização do método original para se proceder a troca da escala analítica para a semipreparativa utilizando-se como fase móvel: (A) água + 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol + 0,1% de ácido fórmico. O ácido fórmico foi escolhido por ser mais volátil e, portanto, mais fácil de eliminar no passo de concentração da amostra (94-96).

No decurso deste trabalho, o método desenvolvido para o isolamento e purificação de microgininas foi otimizado. A mesma fase estacionária foi utilizada, C18, no entanto em uma coluna de tamanho maior (coluna semipreparativa Luna C18(2) 250 mm x 10 mm, 5 μ m, Phenomenex®), permitindo-se que mais material fosse injetado e separado de cada vez. Um total de 4,8 mg de microgininas isoladas foi obtido. Esse valor condiz com a eficiência de isolamento de outros autores: Okino *et al.* em 1993 isolou 36mg de microginina de 27g de biomassa seca de cianobactéria, já Ishida *et al.* em 2000 isolou 19,4 mg de 27,6 g e 26,8 mg de 75,3 g (31, 44).

A análise revelou uma maior produção da microginina *m/z* 770 do que da microginina *m/z* 756 pela cepa LTPNA 08. Por terem tempos de retenção muito próximos, não foi obtida separação total das microgininas, sendo assim, os picos foram isolados combinados para análise de inibição da ECA.

A quantificação relativa da fração de microginina por equivalência de tirosina foi realizada como alternativa por não existir padrão comercial de microginina e a falta de tempo hábil para sintetizar quimicamente o composto.

A escolha da tirosina foi baseada na presença de uma tirosina e uma homotirosina na estrutura das moléculas de microginina (15). Esses aminoácidos apresentam mesmo ϵ , uma vez que possuem o mesmo cromóforo no anel aromático e, por isso, é possível a quantificação indireta por espectrofotometria usando tirosina pura.

Não foi possível detectar os íons produto de m/z 128 e 142 nas amostras IL-328 e IL-428 doadas pelo Prof. Carmeli, possivelmente devido à baixa quantidade do analito na amostra. No entanto, na análise *scan* é possível verificar a presença da microginina SD755. Ela deveria gerar o íon m/z 142 por apresentar um Ahda metilado.

A amostra AL-9.4 apresentou 5 picos gerados pelos íons produtos pesquisados, sendo um do íon 128 e 4 do íon 142. Amostras cloradas não geram os íons produtos 128 ou 142, o que demonstra a possibilidade da presença de outras microgininas na amostra. Isso foi confirmado pelo fato da massa dos íons precursores dos picos encontrados não coincidirem com a massa das estruturas fornecidas pelo prof. Carmeli. Sem os íons fragmento característicos, a identificação desses metabólitos como sendo microgininas se torna mais difícil, pois o método aqui proposto de *precursor ion* dos m/z 128 e 142 não detecta variações no Ahda além de metilação e desmetilação.

A fração de lavagem de 40% de metanol da SPE utilizada no experimento prévio continha a microcistina-LR e apresentou potencial de inibição ECA. Por isso, foi utilizado um padrão de microcistina-LR para verificação de seu potencial de inibição quando o composto está puro.

É descrito na literatura que a microginina é um potente inibidor de zinco metaloproteases, dentre elas a ECA (31, 44, 51, 54, 81). Os percentuais de inibição obtidos podem estar associados ao fato da fração de microginina ser

composta pelas duas variantes e uma estar presente em maior proporção, o que pode influenciar na inibição da ECA. A sequência dos aminoácidos que compõe a estrutura de uma microginina pode favorecer ou não a inibição enzimática. Estudos mostram que a variante estrutural e sua conformação estereoquímica são os responsáveis pela atividade de inibição (44). Por exemplo, as microgininas 299-A, -B, -C e -D são inibidoras de Leucina Aminopeptidase M (LAM), porém não inibem ECA, papaína, tripsina, trombina, plasmina, quimotripsina e elastase (54, 97). Já as microgininas 99-A e 99-B e microgininas 478 e 51-B não inibem LAM a 100 µg/mL (44). Microginina FR1 apresentou atividade inibidora para ECA a 16 µg/mL (81).

Relações estrutura-atividade demonstraram que a ditirosina C-terminal é importante para a inibição da ECA. Além disso, microgininas tetrapeptídicas se mostraram mais ativas que microgininas pentapeptídicas (44). Embora a atividade biológica ainda não tenha sido determinada nessas variantes de microgininas, tanto o histórico comprovado destes peptídeos para propriedades vasodilatadoras bem como as relações estrutura-atividade fazem a bioatividade desses congêneres provável.

Os resultados mostram que a fração de microcistina comercial também tem o potencial de inibição da enzima ECA. Ainda não há estudos que relatem a inibição da ECA pelas microcistinas, portanto, essa pode ser uma nova linha de pesquisa que necessita de mais experimentos para avaliar de maneira mais concisa esse potencial de inibição, pois tratam-se de peptídeos cíclicos.

Os critérios utilizados para a escolha das concentrações testadas foram baseados na literatura e no que já havia sido descrito para a inibição da ECA (tabela 4). A escolha das concentrações do Captopril foi com base na sua IC₅₀ (Sigma® - IC₅₀ = 0.021 ± 0.013 µM).

Tabela 4 – Atividades inibitórias da ECA por algumas microgininas

Peptídeo	ECA (IC ₅₀ mg (mol)/mL)	Referência
MG 478	10 (13.2 mM)	(44)
MG 51-A	>100	(44)
MG 51-B	>100	(44)
MG 91-A	>100	(44)
MG 91-B	>100	(44)
MG	7 µg/mL	(31)
MG T1	5 µg/mL	(51)
MG T1	7 µg/mL	(51)
A-Mg 478	700 (865.2 mM)	(44)
Cyanostatins A	110 µg/mL	(53)
Cyanostatins B	130 µg/mL	(53)

A partir desses resultados foi possível uma avaliação prévia do potencial inibitório das microgininas e da microcistina-LR, no entanto, mais estudos são necessários para se determinar o tipo de inibidor e o mecanismo de inibição dessas moléculas. Além de novos ensaios enzimáticos utilizando outros métodos por HPLC e métodos espectrofotométricos devem ser realizados para a confirmação da atividade inibitória das variantes de microgininas desse trabalho e das microcistinas (98-105).

As microgininas e as microcistinas podem ser consideradas como novas moléculas a serem estudadas para o desenvolvimento de fármacos inibidores da ECA. A inibição desses compostos ocorre na concentração de nanomolar a micromolar, o que seria uma vantagem da utilização desses metabólitos para o tratamento de patologias cardiovasculares e renais frente a outros fármacos sintéticos. Inibidores da ECA são um dos tratamentos mais eficazes para a hipertensão arterial e falha cardíaca congestiva (59, 60). Contudo, deve-se

considerar a toxicidade das microcistinas, conhecidas pela atividade hepatotóxicas. Além disso, ensaios para se avaliar a toxicidade das microgininas também devem ser realizados.

6. CONCLUSÕES

- NÃO FOI POSSÍVEL A DETECÇÃO DE MICROGININAS NAS 59 CEPAS ANALISADAS PELO MÉTODO DE TRIAGEM PROPOSTO QUE É SELETIVO PARA VARIANTES CONTENDO O AMINOÁCIDO AHDA OU MEAHDA.
- AS DUAS CEPAS CONTROLE, LTPNA 08 E LTPNA 09, APRESENTAM O MESMO PERFIL DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS E PRODUZEM MAJORITARIAMENTE DUAS VARIANTES DE MICROCISTINA (MC-RR E MC-LR) E DUAS MICROGININAS ($m/z = 756,5$ E $770,5$).
- A ELUIÇÃO DOS CARTUCHOS DE SPE COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE METANOL DEMONSTROU QUE COMPOSTOS DE INTERESSE DA CEPA CONTROLE LTPNA 08 FORAM SEPARADOS E ELUÍDOS NAS FRAÇÕES METANÓLICAS DE 40%, 60% E 80%.
- FOI DESENVOLVIDO UM MÉTODO POR HPLC EM ESCALA SEMIPREPARATIVA PARA SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DAS MICROGININAS 756 E 770 EM QUE HOVE DIMINUIÇÃO NO TEMPO DE CORRIDA E UTILIZAÇÃO DE SOLVENTES COM MELHOR CUSTO/BENEFÍCIO NA FASE MÓVEL.
- A MELHORIA NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS E A ALTERAÇÃO DESSA EXTRAÇÃO PARA UMA ESCALA MAIOR FACILITOU O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR HPLC EM ESCALA SEMIPREPARATIVA.

- O MÉTODO DE *ELECTROSPRAY* PARA OS ÍONS DE m/z 128 E 142 PODE SER UTILIZADO PARA DIAGNOSTICAR A PRESENÇA DE MICROGININAS NÃO CLORADAS NO AMINOÁCIDO AHDA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS. ELE SE CONFIGURA COMO UM TESTE RÁPIDO E EFICIENTE DE TRIAGEM.
- O RENDIMENTO ALCANÇADO, MASSA DO COMPOSTO ISOLADO EM RELAÇÃO À BIOMASSA TOTAL, SE IGUALA A OUTROS RENDIMENTOS OBTIDOS NA LITERATURA. 4,8 MG DE MICROGININAS FORAM CONSEGUIDOS COM O ISOLAMENTO A PARTIR DE 3 G DE BIOMASSA SECA.
- AS MICROGININAS m/z 756 E 770 E A MICROCISTINA-LR APRESENTAM UM POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ECA QUE DEVE SER EXPLORADO.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* 2003;154(3):157-164.
2. Calijuri MdC, editor. *Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais* São Paulo: Rima; 2006.
3. Raven P, Evert R, Eichhorn S. *Biologia Vegetal*. 7ª ed: Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro; 2007.
4. Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;203(3):264-272.
5. Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*: Spon Press; 1999.
6. Botana LM. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. 2 ed. Lugo, Spain.: CRC Press; 2008.
7. Carmichael WW. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2001;7(5):1393-1407.
8. Codd GA. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology* 1995;32(4):149-156.
9. Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology* 1999;34(4):405-415.
10. Figueredo CC, Giani A. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 2009;39(4):264-272.

11. Fontana L, Albuquerque A, Brenner M, Bonotto D, Sabaris TP, Pires MF, et al. The eutrophication history of a tropical water supply reservoir in Brazil. *Journal of Paleolimnology* 2014;51(1):29-43.
12. Costa IAS, Azevedo SMFO, Senna PAC, Bernardo RR, Costa SM, Chellappa NT. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 2006;66:211-219.
13. Werner VR, Laughinghouse IV HD, Fiore MF, Sant'Anna CL, Hoff C, de Souza Santos KR, et al. Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms. *Phycologia* 2012;51(2):228-238.
14. De Oliveira DE, Ferragut C, De Campos Bicudo D. Relationships between environmental factors, periphyton biomass and nutrient content in Garças Reservoir, a hypereutrophic tropical reservoir in southeastern Brazil. *Lakes & Reservoirs: Research & Management* 2010;15(2):129-137.
15. Welker M, von Dohren H. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2006;30(4):530-563.
16. Wiegand C, Pflugmacher S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;203(3):201-218.
17. Carmichael W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 1992;72(6):445-459.
18. Singh RK, Tiwari SP, Rai AK, Mohapatra TM. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of antibiotics* 2011;64(6):401-412.
19. Rinehart KL, Namikoshi M, Choi BW. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green-algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology* 1994;6(2):159-176.
20. Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo S, Oshima Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium

Cylindrospermopsis raciborskii, isolated from Brazil. *Toxicon* 1999;37(10):1359-1373.

21. Namikoshi M, Murakami T, Watanabe MF, Oda T, Yamada J, Tsujimura S, et al. Simultaneous production of homoanatoxin-a, antitoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 2003;42(5):533-538.
22. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society* 1992;114(20):7941-7942.
23. Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, de Mattos MJT. Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 2009;20(3):257-263.
24. Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2007;146(1–2):60-78.
25. Kreitlow S, Mundt S, Lindequist U. Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology* 1999;70(1–3):61-63.
26. Thajuddin N, Subramanian G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 2005;89(1):47-57.
27. Harada K-i, Fujii K, Shimada T, Suzuki M, Sano H, Adachi K, et al. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Tetrahedron Letters* 1995;36(9):1511-1514.
28. Martin C, Oberer L, Ino T, König WA, Busch M, Weckesser J. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp PCC 7806. *Journal of Antibiotics* 1993;46(10):1550-1556.

29. Ishitsuka MO, Kusumi T, Kakisawa H, Kaya K, Watanabe MM. Microviridin - a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. Journal of the American Chemical Society 1990;112(22):8180-8182.
30. Murakami M, Okita Y, Matsuda H, Okino T, Yamaguchi K. Aeruginosin 298-A, A thrombin and trypsin-inhibitor From the blue-green-alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). Tetrahedron Letters 1994;35(19):3129-3132.
31. Okino T, Matsuda H, Murakami M, Yamaguchi K. Microginin, an angiotensin-converting enzyme-inhibitor from the blue-green-alga *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron Letters 1993;34(3):501-504.
32. Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. Phytochemistry 2007;68(7):954-979.
33. Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K, et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. Journal of Bacteriology 1999;181(13):4089-4097.
34. Singh S, Kate BN, Banerjee UC. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. Critical Reviews in Biotechnology 2005;25(3):73-95.
35. Gademann K, Portmann C. Secondary metabolites from cyanobacteria: Complex structures and powerful bioactivities. Current Organic Chemistry 2008;12(4):326-341.
36. Namikoshi M, Rinehart KL. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 1996;17(5-6):373-384.
37. Prager NA, Abendschein DR, McKenzie CR, Eisenberg PR. Role of thrombin compared with factor Xa in the procoagulant activity of whole-blood clots. Circulation 1995;92(4):962-967.
38. Pfau R. Structure-based design of thrombin inhibitors. Current Opinion in Drug Discovery & Development 2003;6(4):437-450.

39. Murakami M, Shin HJ, Matsuda H, Ishida K, Yamaguchi K. A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry* 1997;44(3):449-452.
40. Shin HJ, Matsuda H, Murakami M, Yamaguchi K. Anabaenopeptins E and F, two new cyclic peptides from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204). *Journal of Natural Products* 1997;60(2):139-141.
41. Bubik A, Sedmak B, Novinec M, Lenarcic B, Lah TT. Cytotoxic and peptidase inhibitory activities of selected non-hepatotoxic cyclic peptides from cyanobacteria. *Biological Chemistry* 2008;389(10):1339-1346.
42. Choi H, Oh SK, Yih W, Chin J, Kang H, Rho J-R. Cyanopeptoline CB071: A cyclic depsipeptide isolated from the freshwater cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2008;56(8):1191-1193.
43. Gademann K, Portmann C, Blom JF, Zeder M, Jutnner F. Multiple toxin production in the cyanobacterium *Microcystis*: isolation of the toxic protease inhibitor cyanopeptolin 1020. *J Nat Prod* 2010;73(5):980-984.
44. Ishida K, Kato T, Murakami M, Watanabe M, Watanabe MF. Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 2000;56(44):8643-8656.
45. Stenico ME, Lorenzi AS, Silva CS, Rigonato J, Fiore MF. Inibidores de proteases produzidos por cianobactérias: uma revisão. *Oecologia Australis* 2012.
46. Welker M, Brunke M, Preussel K, Lippert I, von Dohren H. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. *Microbiology-Sgm* 2004;150:1785-1796.
47. Fastner J, Erhard M, von Dohren H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 2001;67(11):5069-5076.

48. Fujii K, Sivonen K, Naganawa E, Harada K. Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* 2000;56(5):725-733.
49. Carneiro RL, Dorr FA, Dorr F, Bortoli S, Delherbe N, Vasquez M, et al. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. *Fems Microbiology Ecology* 2012;82(3):692-702.
50. Gesner-Apter S, Carmeli S. Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* 2008;64(28):6628-6634.
51. Kodani S, Suzuki S, Ishida K, Murakami M. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). *Fems Microbiology Letters* 1999;178(2):343-348.
52. Welker M, Marsalek B, Sejnohova L, von Doehren H. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides* 2006;27(9):2090-2103.
53. Sano T, Takagi H, Morrison LF, Metcalf JS, Codd GA, Kaya K. Leucine aminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. *Phytochemistry* 2005;66(5):543-548.
54. Ishida K, Matsuda H, Murakami M, Yamaguchi K. Microginins 299-A and -B, leucine aminopeptidase inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-299). *Tetrahedron* 1997;53(30):10281-10288.
55. Lifshits M, Zafrir-Ilan E, Raveh A, Carmeli S. Protease inhibitors from three fishpond water blooms of *Microcystis* spp. *Tetrahedron* 2011;67(22):4017-4024.
56. Lau CC, Abdullah N, Shuib AS, Aminudin N. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach identified by LC-MS/MS. *Food Chemistry* 2014;148(0):396-401.
57. (BrMASS) SBdEdM. Espectrometria de Massas: Principios e Aplicações.

58. Cardozo KHM. Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas : aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) [Tese de Doutorado em Bioquímica]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
59. Jao C-L, Huang S-L, Hsu K-C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. *BioMedicine* 2012;2(4):130-136.
60. Chel-Guerrero L, Domínguez-Magaña M, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D. Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Protein Hydrolysates with ACE-I Inhibitory Activity. *Food & Nutrition Sciences* 2012;3(4).
61. Bhuyan BJ, Mugesh G. Angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *Current Science* 2011;101(7):881-887.
62. Wang W, Wang N, Zhang Y, Cai Z, Chen Q, He G. A Convenient RP-HPLC Method for Assay Bioactivities of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *ISRN Biotechnology* 2013;2013:5.
63. Schmidt B, Ribnicky DM, Poulev A, Logendra S, Cefalu WT, Raskin I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism* 2008;57:S3-S9.
64. Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *The American journal of cardiology* 2008;101(10):S43-S49.
65. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 2012;75(3):311-335.
66. Jamil M. Screening of Selected Plant Species of Pakistan for Their Pharmacological Activities: GRIN Verlag; 2011.
67. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis: Taylor & Francis; 2011.
68. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 2004;67(12):2141-2153.

69. Holler FJ, Skoog DA, Crouch SR, Pasquini C, DA UNICAMP E. Princípios de análise instrumental: Bookman; 2009.
70. Collins CH, Braga G, Bonato PS. Fundamentos de cromatografia: Editorada Unicamp; 2006.
71. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation: Wiley; 2008.
72. Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas-Oates J. Metabolomic applications of hplc–lc–ms. *Mass spectrometry reviews* 2010;29(5):671-684.
73. Kramer D, inventor Univ Berlin Humboldt; Cyano Biotech Gmbh, assignee. New nucleic acid encoding microginin synthetase enzyme complex having activities: adenylation domain, acyl carrier protein, or aminotransferase, useful producing a microginin synthetase enzyme, which can be used in therapeutics patent EP1792981-A1; WO2007062867-A1; EP1957639-A1; JP2009517058-W; US2009220962-A1; US7846686-B2; US2011034680-A1; EP1957639-B1. 2007.
74. Carvalho LRd, Pipole F, Werner VR, Laughinghouse I, Dail H, Camargo ACMd, et al. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008;39(4):761-769.
75. Pereira DA, Pimenta AMC, Giani A. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiological Research* 2012;167(7):413-421.
76. Pereira DA, Giani A. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *Fems Microbiology Ecology* 2014:n/a-n/a.
77. Gorham P, McLachlan J, Hammer U, Kim W. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh Int Verein Theor Angew Limnol* 1964:796-804.

78. Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 1994;119(7):1525-1530.
79. Lawton LA, Edwards C. Purification of microcystins. *Journal of chromatography A* 2001;912(2):191-209.
80. Reshef V, Carmeli S. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 2001;57(14):2885-2894.
81. Neumann U, Forchert A, Flury T, Weckesser J. Microginin FR1, a linear peptide from a water bloom of *Microcystis* species. *FEMS Microbiology Letters* 1997;153(2):475-478.
82. Meriluoto JA, Spoof LE. Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. In: *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs*: Springer; 2008. p. 483-499.
83. Lawton LA, Edwards C. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. In: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*: Springer; 2008. p. 513-537.
84. PEPCY. Toxic and Bioactive Peptides in Cyanobacteria. In: (PEPCY): final report.; 2002.
85. Vogel A. A text-book of practical organic chemistry. 3 ed: Longmans; 1956.
86. Schwarzenberger A, Sadler T, Von Elert E. Effect of nutrient limitation of cyanobacteria on protease inhibitor production and fitness of *Daphnia magna*. *The Journal of experimental biology* 2013;216(19):3649-3655.
87. Rohrlack T, Christoffersen K, Hansen PE, Zhang W, Czarnecki O, Henning M, et al. Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *Journal of chemical ecology* 2003;29(8):1757-1770.
88. Agrawal MK, Zitt A, Bagchi D, Weckesser J, Bagchi SN, Von Elert E. Characterization of proteases in guts of *Daphnia magna* and their inhibition by

Microcystis aeruginosa PCC 7806. Environmental toxicology 2005;20(3):314-322.

89. Figueredo CC, Giani A, Bird DF. Does allelopathy contribute to *cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion?. Journal of Phycology 2007;43(2):256-265.

90. Pflugmacher S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. Environmental toxicology 2002;17(4):407-413.

91. Sharif DI, Gallon J, Smith CJ. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. The ISME journal 2008;2(12):1171-1182.

92. Lyck S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. Journal of Plankton Research 2004;26(7):727-736.

93. Spoof L, Karlsson K, Meriluoto J. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C 18 and amide C 16 sorbents. Journal of Chromatography A 2001;909(2):225-236.

94. Settineri T. Going for greener LC–MS. The Column 2012;8:2-6.

95. Shimadzu. Tips for practical HPLC analysis -Separation Know-how-. LC World Talk;Volume 2(Special Issue).

96. Isco T. Acetonitrile/Methanol Substitution in C18 Reverse Phase on CombiFlash Rf Systems. Chromatography Application Note AN57 2012.

97. Ishida K, Matsuda H, Murakami M. Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron 1998;54(44):13475-13484.

98. Cushman D, Cheung H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 1971;20(7):1637-1648.
99. Doig M, Smiley J. Direct injection assay of angiotensin-converting enzyme by high-performance liquid chromatography using a shielded hydrophobic phase column. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1993;613(1):145-149.
100. Neels HM, Scharpe SL, van Sande ME, Verkerk R, Van Acker K. Improved micromethod for assay of serum angiotensin converting enzyme. *Clinical chemistry* 1982;28(6):1352-1355.
101. Wu J, Aluko RE, Muir AD. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 2002;950(1):125-130.
102. Meng QC, Balcells E, Dell'Italia L, Durand J, Oparil S. Sensitive method for quantitation of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in tissue. *Biochemical Pharmacology* 1995;50(9):1445-1450.
103. Hyun C-K, Shin H-K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry* 2000;36(1):65-71.
104. Santos R, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension* 1985;7(2):244-252.
105. Hayakari M, Kondo Y, Izumi H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry* 1978;84(2):361-369.

8. ANEXOS 1 e 2

Anexo 1 - **Relação das 59 linhagens analisadas**

Linhagem	Identificação
CENA350	<i>Leptolyngbya sp.</i>
CENA351	<i>Pleurocapsa sp.</i>
CENA352	<i>Nostocaceae</i>
CENA353	<i>Chroococcidiopsis sp.</i>
CENA354	<i>Michochaetaceae</i>
CENA355	<i>Pseudanabaenaceae</i>
CENA356	<i>Nostoc sp.</i>
CENA357	<i>Nostocaceae</i>
CENA358	<i>Nostocaceae</i>
CENA359	<i>Pseudanabaenaceae</i>
CENA360	<i>Brasilonema sp.</i>
CENA361	<i>Brasilonema sp.</i>
CENA362	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA363	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA364	<i>Leptolyngbya sp.</i>
CENA365	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA366	<i>Brasilonema sp.</i>
CENA367	<i>Chroococcidiopsis sp.</i>
CENA368	<i>Nostocaceae</i>
CENA369	<i>Nostocaceae</i>
CENA370	<i>Oculatella sp.</i>
CENA371	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA372	<i>Leptolyngbya sp.</i>
CENA373	<i>Nostocaceae</i>
CENA374	<i>Pseudanabaenaceae</i>
CENA375	<i>Leptolyngbya sp.</i>
CENA376	<i>Nostocaceae</i>
CENA377	<i>Leptolyngbya sp.</i>
CENA378	<i>Pseudanabaenaceae</i>
CENA379	<i>Nostocaceae</i>

CENA380	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA381	<i>Brasilonema sp.</i>
CENA382	<i>Brasilonema sp.</i>
CENA383	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA384	<i>Pseudanabaenaceae</i>
CENA385	<i>Pseudanabaenaceae</i>
CENA386	<i>Desmonostoc sp.</i>
CENA387	<i>Leptolyngbya sp.</i>
CENA388	<i>Nostocaceae</i>
CENA389	<i>Nostocaceae</i>
LTPNA 01	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 02	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA 03	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 06	<i>Limnothrix redekei</i>
LTPNA 07	<i>Limnothrix redekei</i>
LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>
ITEP 18	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
ITEP 25	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>
ITEP 24	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>
ITEP 26	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>
1	<i>Miscrocystis novacekii</i>
2	<i>Miscrocystis panniformis</i>
6	<i>Miscrocystis panniformis</i>
8	<i>Miscrocystis panniformis</i>
20	<i>Miscrocystis aeruginosa</i>
75	<i>Radiocystis sp</i>
76	<i>Radiocystis sp</i>
108	<i>Microcystis wesenbergii</i>
124	<i>Sphaerocavum brasiliense</i>

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8445025/1 - Fernanda Cristina Rodrigues de Paiva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5817-1/4	A Prática da Cromatografia Líquida e Eletroforese Capilar	18/02/2013	28/04/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/1	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	04/03/2013	17/03/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/7	Aprimoramento Didático	19/03/2013	15/04/2013	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0520 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/08/2013	10/12/2013	-	3	0	-	-	-
BIE5705-5/1	Ecologia de Reservatórios (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/08/2013	25/11/2013	90	6	87	A	N	Concluída
QBQ5778-4/1	Proteômica: Bases e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	04/10/2013	07/11/2013	30	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	10	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 27/03/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 03/03/15 09:11:06