UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas:
aplicações para o estudo de toxinas produzidas por
cianobactérias**

Felipe Augusto Dörr

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2011

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

D716c Dörr, Felipe Augusto
Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas :
aplicações para o estudo de toxinas produzidas por cianobactérias /
Felipe Augusto Dörr. -- São Paulo, 2011.
205p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Pinto, Ernani

1. Toxicologia ambiental 2. Espectrometria de massa : Análise :
Toxicologia 3. Cromatografia em líquido de alta eficiência :
Análise toxicológica I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.9 CDD

Felipe Augusto Dörr

**Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas:
aplicações para o estudo de toxinas produzidas por
cianobactérias**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, abril de 2011.

Olha, guri!
Repara o que estás fazendo,
Depois que fores é difícil de voltar,
Passei-te um pito e continuas remoendo,
Teu sonho moço deste rancho abandonar.

Olha, guri!
Lá no povo é diferente,
E certamente, faltará o que tens aqui,
Eu só te peço: não esqueças de tua gente,
De vez em quando, manda uma carta, guri.

Olha, guri!
Pra tua mãe, cabelos brancos,
E pra este velho que te fala sem gritar,
Pesa teus planos, eu quero que sejas franco,
Se acaso fores, pega o zaino pra enfrenar.

Olha, guri!
Leva uns cobres de reserva,
Pega uma erva pra cevar teu chimarrão,
E leva um charque, que é pra ver se tu conservas,
Uma pontinha de amor por este chão.

Se vais embora, por favor não te detenhas,
Sigas em frente e não olhes para trás,
E assim não vais ver a lágrima insistente,
Que molha o rosto do teu velho, meu rapaz...

Um pito!

Nenito Sarturi, Claudio Patias e Nelcy Vargas

Dedicatória

Dedico este trabalho a meu avô,
Armando Gross (*in memoriam*),
o maior exemplo de integridade de caráter que pude ter.

Agradecimentos

À minha irmã Fabiane, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida. Tenho muito orgulho em ser seu irmão!

Aos meus pais, Dorni e Waldir, pela educação recebida e constante apoio; e ao meu irmão Fernando, pela torcida à distância.

À Barbara, pessoa extraordinária cujo companheirismo e incentivo foram fundamentais no final desta etapa.

Ao meu orientador Ernani, pelas oportunidades profissionais e, acima de tudo, por ser um grande amigo. É impossível transcrever aqui toda minha gratidão e respeito.

Aos membros do clã Diogo e Thais, irmãos que a vida me presenteou, e Beto e Thais, pessoas fantásticas. Vocês são a prova da veracidade do ditado “Amigos são a família que se pode escolher!”.

Ao professor Maurício Yonamine, pelo apoio e oportunidades.

A todos os amigos e colegas do LTPNA e do LAT. São tantas as pessoas importantes que se torna difícil citá-las nominalmente sem o risco de esquecer alguém!

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade profissional.

Às agências de fomento, em especial ao CNPQ e FAPESP, pelas bolsas de apoio e treinamento técnico.

Aos professores Bernd Luckas e Dietrich Volmer, pela recepção na Alemanha e Inglaterra, respectivamente.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas: aplicações para o estudo de toxinas produzidas por cianobactérias

A crescente demanda por água doce de boa qualidade, associada ao aumento na frequência de florações tóxicas de cianobactérias em reservatórios utilizados para consumo humano, levou à publicação da Portaria nº. 518/04 pelo Ministério da Saúde. Entre outros parâmetros de potabilidade, as empresas fornecedoras de água tratada devem realizar o monitoramento de cianotoxinas. Para tanto, métodos analíticos rápidos e precisos para a determinação destes compostos são imprescindíveis. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo empregar a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para o estudo das principais cianotoxinas em território nacional: microcistinas, anatoxina-a(s), cilindrospermopsina e saxitoxinas. Os resultados obtidos estão distribuídos em capítulos específicos dedicados a cada grupo de toxinas. Dessa forma, o primeiro capítulo apresenta um estudo de fragmentação na fase gasosa de ânions de microcistinas em um equipamento do tipo orbitrap. É demonstrado que o modo negativo de ionização por *electrospray* fornece informações estruturais importantes e complementares ao modo positivo de ionização. Uma abertura seletiva do peptídeo cíclico é proposta e mecanismos discutidos, o que facilita a interpretação de resultados durante a caracterização de variantes desconhecidas. O modelo de fragmentação desenvolvido foi utilizado para identificar a variante [Leu¹]MC-LR em um extrato de *Microcystis* spp. O segundo capítulo descreve metodologias qualitativas de LC/MS para o monitoramento e identificação do organofosforado natural anatoxina-a(s), cuja análise é prejudicada pela ausência de padrões comerciais. A cromatografia de interação hidrofílica foi empregada e mecanismos de fragmentação na fase gasosa propostos, discutindo-se os íons característicos desta estrutura química. Tal modelo permitiu a identificação desta toxina nas cepas de *Anabaena oumiana* ITEP-25 e ITEP-26 pela primeira vez. O terceiro capítulo disserta sobre os mecanismos de fragmentação na fase gasosa da toxina cilindrospermopsina quando ionizada por *electrospray* na forma de aduto com metais alcalinos. Diferenças nas vias de fragmentação são demonstradas de acordo com o raio atômico do metal formador do aduto, com implicações práticas na sua determinação cromatográfica. Já o quarto capítulo discute os mecanismos de fragmentação de variantes sulfatadas de saxitoxinas (GTX1e4, GTX2e3, dcGTX2e3, GTX5) após ionização por *electrospray* no modo positivo e negativo. É demonstrado pela primeira vez que uma conformação estrutural específica do grupamento sulfato explica a intensa eliminação de SO₃ observada para as variantes GTX1, GTX2 e dcGTX2 no modo positivo de ionização. Por outro lado, o modo negativo de ionização apresenta vantagens uma vez que a dissociação na fonte é insignificante se comparada à dissociação observada no modo positivo. Como resultado, métodos quantitativos no modo negativo podem apresentar maior sensibilidade, permitindo a detecção destas toxinas em amostras ambientais em quantidades mais baixas. De maneira geral, conclui-se que a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é ferramenta poderosa para a análise quali e quantitativa das principais cianotoxinas, podendo ser amplamente empregada para o monitoramento de água para consumo humano.

Palavras-chave: Cianobactéria. Cianotoxinas. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. *Electrospray*.

Abstract

Liquid-chromatography coupled to mass spectrometry: applications for the study of toxins produced by cyanobacteria

The increasing occurrence of toxic cyanobacterial blooms in reservoirs used to supply drinking water for human consumption has prompted the publication of resolution 518/04 by the Brazilian Ministry of Health. Among other quality requirements, the monitoring of cyanotoxins in treated water is mandatory for companies responsible for potable water distribution. Therefore, precise and rapid analytical methods are essential. In this context, the aim of this work is to employ liquid chromatography coupled to mass spectrometry to study the most important cyanotoxins in our country: microcystins, anatoxin-a(s), cylindrospermopsis and saxitoxins. The obtained results are distributed in four chapters, each one dedicated to a single group of toxins. In this way, chapter one presents the gas-phase fragmentation behavior of deprotonated microcystins in an Orbitrap instrument. It is demonstrated that *electrospray* negative ionization can provide significant structural information about microcystins. These results are complementary to the positive ionization mode. A selective ring opening process is proposed and possible mechanisms are discussed, which may facilitate data interpretation when unknown variants are considered. The general fragmentation model was further applied to the characterization of [Leu¹]MC-LR in a *Microcystis* spp. cell extract. The second chapter describes qualitative analytical methods for the identification of anatoxin-a(s), a natural organophosphate whose determination is hampered by the lack of commercial standards. Hydrophilic interaction liquid chromatography was employed and fragmentation mechanisms proposed, identifying the characteristic product ions of this toxin. The developed methods were further used to identify anatoxin-a(s) for the first time in *Anabaena oumiana* strains ITEP-25 and ITEP-26. The third chapter presents data related to the gas-phase fragmentation behavior of cylindrospermospin when this toxin is ionized as metal adducts. Different fragmentation pathways are accessed depending on the atomic radius of the metal cation involved. Practical implications for the chromatographic analysis of this toxin are presented. The last chapter describes the fragmentation behavior of sulphate-containing saxitoxin variants (GTX1&4, GTX2&3, dcGTX2&3, GTX5) after *electrospray* ionization in both the positive and negative modes. A mechanism for the intense SO₃ elimination from [M+H]⁺ ions from GTX1, GTX2 and dcGTX2 is proposed for the first time and relies on a specific structure conformation. On the other hand, the negative ionization mode shows much less in-source dissociation when compared to the positive mode. As a consequence, methods based on negative ionization might be more sensitive for sulfate-containing variants, allowing the detection of lower amounts of these toxins in environmental samples. At the end, it can be concluded that liquid chromatography is a well-suited and powerful technique for the qualitative and quantitative analysis of cyanotoxins, being an invaluable contribution to water safety evaluation.

Keywords: Cyanobacteria. Cyanotoxins. Liquid chromatography. Mass spectrometry. *Electrospray* ionization.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química da MC-LA com numeração dos aminoácidos. Substituições nas posições 2 e 4 para as variantes estruturais mais comuns também são demonstradas.	26
Figura 2: Representação geral da abertura randômica de um peptídeo cíclico protonado em experimentos de dissociação induzida por colisão (CID). A formação de cinco peptídeos lineares isobáricos é demonstrada.	28
Figura 3: Espectros de fragmentação (CID) obtidos em <i>ion trap</i> linear para ânions $[M-H]^-$ de microcistinas. (A) MC-LR; (B) MC-YR; (C) MC-RR e (D) MC-LA.	37
Figura 4: Mecanismo proposto para a abertura do anel peptídico e eliminação neutra de 112 Da.	37
Figura 5: Espectro de MS/MS da variante $[D-Asp^3, E-Dhb^7]$ MC-RR adquirido em equipamento do tipo QTOF. A perda neutra de 98 Da é indicada.	39
Figura 6: Comparação entre os mecanismos direto e sequencial para a formação de íons característicos de uma clivagem α . Proposta adaptada de ANDREAZZA <i>et al.</i> (2009).	40
Figura 7: Espectros de MS^3 (CID) para ânions de microcistinas. (I) MC-LR; (II) MC-YR; (III) MC-RR e (IV) MC-LA.	42
Figura 8: Representação esquemática da série de íons B para MC-LA.	45
Figura 9: Espectros de MS/MS (HCD) para ânions de microcistinas. (I) MC-LR; (II) MC-YR; (III) MC-RR e (IV) MC-LA.	47

Figura 10: Representação esquemática da formação de íons A2 após abertura do peptídeo cíclico e eliminação de água. Mecanismo adaptado de BOWIE <i>et al.</i> (2002).....	48
Figura 11: Representação esquemática dos mecanismos propostos para a formação da série de íons A	49
Figura 12: Modelo geral de fragmentação de ânions de microcistinas após abertura seletiva do peptídeo cíclico na posição 3. As séries de íons A e B são demonstradas.....	51
Figura 13: Espectros obtidos para composto desconhecido após ionização por <i>electrospray</i> no modo negativo. (I) Espectro de varredura (<i>scan</i>); (II) espectro de MS ³ (CID) e (III) espectro de MS/MS (HCD).	52
Figura 14: Estrutura química da anatoxina-a(s).....	55
Figura 15: Espectros de fragmentação do íon de <i>m/z</i> 253 para o extrato PH160-B. (I) Espectro de triplo-quadrupolo; (II) Espectro de <i>ion trap</i> ; (III) Espectro de <i>ion trap</i> com valor de <i>cutoff</i> alterado para 20%, demonstrando íon de <i>m/z</i> 58.....	65
Figura 16: Mecanismos propostos para fragmentação do íon [M+H] ⁺ da anatoxina-a(s) em experimentos de dissociação induzida por colisão.....	67
Figura 17: Espectros de MS ³ para íons de (I) <i>m/z</i> 159 e (II) <i>m/z</i> 141.....	68
Figura 18: Cromatogramas obtidos para o extrato PH160-B em diferentes colunas cromatográficas. (I) fase reversa Luna C18(2); (II) HILIC sílica nua Phenomenex; (II) zwitteriônica zic-HILIC.....	69
Figura 19: Representação esquemática da fase estacionária da coluna zic-HILIC.	70

Figura 20: Cromatogramas obtidos por cromatografia de interação hidrofílica em coluna zic-HILIC para diferentes extratos de cianobactérias. As transições recomendadas para detecção de anatoxina-a(s) foram monitoradas em um triplo-quadrupolo.	71
Figura 21: Estrutura química da cilindropermopsina.....	73
Figura 22: Espectros de fragmentação obtidos em <i>ion trap</i> para cilindropermopsina. (I) $[M+H]^+$; (II) $[M+Na]^+$	79
Figura 23: Mecanismos de fragmentação propostos para a cilindropermopsina após ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo e dissociação induzida por colisão. Três rotas distintas são demonstradas.....	80
Figura 24: Espectros de MS^3 obtidos em <i>ion trap</i> para íons B (I e II) e íons C (III) da cilindropermopsina.	81
Figura 25: Espectros de fragmentação obtidos para cilindropermopsina quando ionizada na forma de aduto com (I) lítio e (II) potássio.....	85
Figura 26: Razão entre a intensidade relativa dos íons C e B versus massa atômica do substituinte R.	86
Figura 27: Estrutura química das principais saxitoxinas. Adaptado de DELL'AVERSANO <i>et al.</i> 2001.....	89
Figura 28: Reação de oxidação para a saxitoxina, mostrando a formação do derivado fluorescente.	90
Figura 29: Espectro de varredura em <i>electrospray</i> no modo positivo para as variantes GTX2 e GTX3. A intensa eliminação de SO_3 é visível. Adaptado de ONODERA <i>et al.</i> (1997b).	93

Figura 30: Espectros de fragmentação (MS/MS) dos epímeros GTX1 e GTX4. Adaptado de Dell'Aversano <i>et al.</i> , 2001.	93
Figura 31: Espectros de varredura no modo positivo de ionização para os epímeros (A) GTX1 e (B) GTX4, obtidos em equipamento do tipo tempo de voo. A eliminação de grupamentos lábeis pode ser observada.	99
Figura 32: Cromatogramas extraídos para os íons de (A) m/z 412 e (B) m/z 332, obtidos pela separação dos epímeros por cromatografia de interação hidrofílica.	99
Figura 33: Espectros de varredura no modo positivo de ionização para as variantes (A) GTX2, (B) GTX3, (C) dcGTX2, (D) dcGTX3, (E) C1 e (F) C2... ..	100
Figura 34: Espectros de fragmentação para os íons $[M+H]^+$ de variantes sulfatadas de saxitoxinas.	101
Figura 35: Conformação estrutural assumida pela GTX2. A seta dupla indica interação entre O11 e H9.	103
Figura 36: Mecanismo proposto para eliminação facilitada de SO_3 em variantes de saxitoxinas cujo grupamento sulfato em C11 está orientado em alfa.	103
Figura 37: Espectros de varredura para variantes sulfatadas de saxitoxinas após ionização por <i>electrospray</i> no modo negativo.	105
Figura 38: Espectros de fragmentação para os íons $[M-H]^-$ de variantes sulfatadas de saxitoxinas.	106
Figura 39: Mecanismo proposto para eliminação de 43 Da de ânions de saxitoxinas sulfatadas.	107
Figura 40: Mecanismo proposto para formação do íon de m/z 122 em sulfocarbamoil toxinas.	107

Figura 41: Cromatogramas comparativos entre os modos de ionização positivo e negativo para as variantes C1/C2, GTX1/4, GTX2/3, dcGTX2/3 e B1, empregando-se *electrospray*..... 109

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais cianotoxinas encontradas em ambientes dulcícolas.....	22
Tabela 2: Resultados da medida de massa acurada obtidos para ânions de microcistinas após ionização por <i>electrospray</i> no modo negativo.....	35
Tabela 3: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de MS/MS para ânions de microcistinas após ionização por <i>electrospray</i> no modo negativo.....	39
Tabela 4: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de MS ³ para as microcistinas MC-LR, MC-YR, MC-RR e MC-LA. A série de íons B1 a B4 é demonstrada.	44
Tabela 5: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de MS/MS (HCD) para as microcistinas MC-LR, MC-YR, MC-RR e MC-LA. A série de íons A1 a A5 é demonstrada.....	50
Tabela 6: Gradientes utilizados para separação cromatográfica de extrato contendo anatoxina-a(s) em fase reversa e HILIC.	61
Tabela 7: Inibição da hidrólise da acetilcolina por extratos contendo anatoxina-a(s).	64
Tabela 8: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de fragmentação para íons [M+H] ⁺ e [M+Na] ⁺ da cilindrospermopsina.....	83
Tabela 9: Gradiente utilizado para separação de saxitoxinas por HILIC-MS ...	97

Lista de Abreviaturas

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MC: microcistinas

MdhA: metil diidroalanina

Dhb: diidrobutirina

CID: dissociação induzida por colisão

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HCD: *higher-energy collision dissociation*

QTOF: quadrupolo-tempo de voo

HILIC: cromatografia de interação hidrofílica

MS/MS: espectrometria de massas sequencial

Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Sumário	xv
Apresentação da Tese	19
1. Introdução Geral	20
1.1 Cianobactérias e cianotoxinas.....	20
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Capítulo 1: Caracterização de microcistinas por dissociação induzida por colisão após ionização por <i>electrospray</i> no modo negativo	25
3.1 Introdução	25
3.2 Objetivos	31
3.3 Materiais e métodos	32

3.3.1	Reagentes	32
3.3.2	Preparo de amostra desconhecida	32
3.3.3	Espectrometria de massas	33
3.4	Resultados e discussão	34
3.5	Conclusões.....	54
4.	Capítulo 2: Métodos para identificação de anatoxina-a(s).....	55
4.1	Introdução	55
4.2	Objetivos	58
4.3	Materiais e métodos	59
4.3.1	Reagentes	59
4.3.2	Preparo de amostra	59
4.3.3	Ensaio de inibição da acetilcolinesterase	59
4.3.4	Cromatografia líquida – espectrometria de massas.....	60
4.4	Resultados e discussão	63
4.5	Conclusões.....	72
5.	Capítulo 3: Formação de adutos com metais durante ionização da cilindrospermopsina por <i>electrospray</i> no modo positivo	73
5.1	Introdução	73
5.2	Objetivos	76
5.3	Materiais e métodos	77
5.3.1	Reagentes	77

5.3.2	Preparo de amostras	77
5.3.3	Espectrometria de massas	77
5.4	Resultados e discussão	79
5.5	Conclusões.....	87
6.	Capítulo 4: Análise de saxitoxinas sulfatadas por <i>electrospray</i> no modo negativo.....	88
6.1	Introdução	88
6.2	Objetivos	95
6.3	Materiais e métodos	96
6.3.1	Reagentes	96
6.3.2	Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC)	96
6.3.3	Espectrometria de Massas	97
6.4	Resultados e Discussão	98
6.5	Conclusões.....	110
7.	Considerações Finais.....	111
8.	Referencias Bibliográficas.....	115
9.	Anexos.....	124
9.1	Ficha do Aluno	124
9.2	Publicações originadas no período	127
9.2.1	Comparative analysis of the gas-phase reactions of cylindrospermopsin and the difference in the alkali metal cation mobility	127

9.2.2	Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to <i>electrospray</i> ionization-tandem mass spectrometry	134
9.2.3	Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil).....	143
9.2.4	Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays	154
9.2.5	Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization	166
9.2.6	Intriguing differences in the gas-phase dissociation behavior of protonated and deprotonated gonyautoxin epimers	179

Apresentação da Tese

A presente tese descreve estudos de aplicabilidade da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas na investigação de cianotoxinas importantes no cenário nacional: microcistinas, cilindrospermopsina, anatoxina-a(s) e saxitoxinas.

Visando facilitar sua apresentação, optou-se por dividir este trabalho em quatro capítulos dedicados a cada toxina ou grupo de toxinas. Estes capítulos são precedidos por uma introdução geral para contextualizar o assunto e apresentar os objetivos. Em seguida, cada capítulo é apresentado em uma estrutura semelhante a um manuscrito científico, sendo dividido em (a) introdução, (b) materiais e métodos, (c) resultados e discussão e (d) conclusões.

Dessa forma, o primeiro capítulo descreve importante contribuição para a identificação de variantes de microcistinas por meio da espectrometria de massas. O segundo capítulo contempla estratégias para a correta identificação de anatoxina-a(s), uma toxina cuja determinação analítica é prejudicada pela ausência de padrões comerciais. Já o terceiro capítulo disserta sobre os mecanismos de fragmentação na fase gasosa de cilindrospermopsina, enquanto que o quarto capítulo aborda a análise de saxitoxinas após ionização por *electrospray* no modo negativo.

Para finalizar, considerações finais são apresentadas.

1. Introdução Geral

1.1 *Cianobactérias e cianotoxinas*

Cianobactérias são microrganismos procariontes fotossintetizantes pertencentes ao domínio Bacteria. Estima-se que estes micro-organismos tenham desenvolvido a fotossíntese há mais de 3,5 bilhões de anos, tendo sido fundamentais na produção de oxigênio e formação da atmosfera oxidante atual (HAGEMANN, 2011). Sua enorme plasticidade metabólica permite que as cianobactérias habitem os mais diversos ecossistemas, onde assumem a posição de produtores primários na cadeia alimentar. Esta versatilidade metabólica traduz-se na produção de uma grande quantidade de metabólitos secundários com elevada diversidade estrutural (WELKER & VON DOHREN, 2006). Dentre os diversos compostos já isolados e caracterizados destacam-se as cianotoxinas, metabólitos com grande interesse por sua toxicidade e variedade de atividades biológicas (CARMICHAEL, 1992).

As cianotoxinas podem representar sérios riscos à saúde humana e de animais quando presentes em episódios de florações de cianobactérias em ambientes aquáticos. Florações, também conhecidas por *blooms*, são eventos caracterizados pelo desenvolvimento massivo de cianobactérias, cuja super população provoca alterações que comprometem a qualidade da água e afetam o ecossistema (DITTMANN & WIEGAND, 2006). Quando a espécie de cianobactéria responsável pela floração é capaz de produzir cianotoxinas, estes compostos podem atingir elevadas concentrações no corpo d'água, representando risco à saúde (SVRCEK & SMITH, 2004).

Sabe-se que o crescimento explosivo da população de cianobactérias é dependente, dentre outros fatores, da oferta de nutrientes, especialmente nitratos e fosfatos. Ambientes com elevada disponibilidade nutricional são conhecidos como eutróficos, sendo a eutrofização um processo lento e gradual em um ecossistema aquático. Entretanto, o lançamento indiscriminado de efluentes domésticos e industriais nos corpos d'água acelera sua eutrofização, o que leva a um aumento na frequência de florações tóxicas nestes ambientes (VAN APELDOORN *et al.*, 2007). Quando estas florações afetam reservatórios de água utilizados para captação e abastecimento, as alterações nas características da água impõem grande desafio às instituições responsáveis por sua distribuição à população, implicando em custo adicional para o seu tratamento e monitoramento de sua qualidade (SVRCEK & SMITH, 2004).

No Brasil, a ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias está bem documentada (FERRAO *et al.*, 2002; MAGALHAES *et al.*, 2003; MOLICA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005; DOS ANJOS *et al.*, 2006; FRIAS *et al.*, 2006). Um dos episódios mais importantes ocorreu em Caruaru, no estado de Pernambuco, em fevereiro de 1996. Na ocasião, 110 pacientes tiveram sintomas de hepatotoxicose após tratamento de hemodiálise de rotina, com a subsequente perda de 70 indivíduos. As mortes foram posteriormente atribuídas à utilização de água contaminada com microcistinas, cianotoxinas com elevada hepatotoxicidade. O incidente, que ficou conhecido como a Síndrome de Caruaru, ressalta a importância do monitoramento de cianotoxinas nos reservatórios de água destinados ao consumo humano (JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

As cianotoxinas, como mencionado anteriormente, formam um grande grupo de metabólitos secundários com elevada diversidade estrutural. Além disso, distintas atividades biológicas são descritas. De acordo com seu mecanismo de ação, as cianotoxinas podem ser divididas em três grandes grupos: (a) neurotoxinas (anatoxinas, saxitoxinas e beta-metilamino alanina); (b) hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina); e (c) dermatotoxinas. A **Tabela 1** contempla informações sobre as cianotoxinas comumente encontradas em ambientes de água doce.

Tabela 1: Principais cianotoxinas encontradas em ambientes dulcícolas

TOXINA	CIANO BACTERIA PRODUTORA	MECANISMO DE TOXICIDADE	DL ₅₀ (µg.kg ⁻¹ p.c.) via i.p. (camundongo)
Microcistina-LR	<i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>	Promotor de tumor hepático, inibidor de fosfatases	50
Cilindrospermopsina	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>	Inibidor da síntese proteica	2x10 ³
Saxitoxina	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>	Bloqueador de canais de sódio	10
Anatoxina-a(s)	<i>Anabaena</i>	Inibidor de colinesterase	20
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i>	Agonista nicotínico	375

Fonte: BARTRAM E CHORUS, 1999

Em virtude do trágico episódio ocorrido em Caruaru, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº. 1469/00, posteriormente substituída pela Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. Esta nova portaria estabelece os

procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Entre outras exigências, a obrigatoriedade no controle de toxinas de cianobactérias foi reforçada. Atualmente devem ser monitoradas as seguintes toxinas, cujos limites máximos permitidos estão entre parênteses: microcistinas (1,0 µg/L); cilindrospermopsina (15,0 µg/L); e saxitoxinas (3,0 µg/L). É importante destacar que uma revisão desta portaria está em curso e a anatoxina-a(s) será incluída na lista de toxinas a serem monitoradas.

Uma vez que o monitoramento da presença de cianotoxinas na água tratada para consumo humano é preconizado, métodos analíticos rápidos, precisos e específicos são imprescindíveis. Neste contexto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) surge como método de escolha para suprir tais necessidades.

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho é o emprego desta metodologia para o estudo das cianotoxinas já encontradas no território brasileiro, a saber: microcistinas, anatoxina-a(s), cilindrospermopsina e saxitoxinas.

2. Objetivos

2.1 *Objetivo Geral*

Este trabalho tem como objetivo geral o emprego da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para o estudo das principais cianotoxinas descritas em território brasileiro e cujo monitoramento é preconizado pela Portaria 518/04 do Ministério da Saúde, a saber: microcistinas, anatoxina-a(s), cilindrospermopsina e saxitoxinas.

2.2 *Objetivos específicos*

- determinar os mecanismos de fragmentação de microcistinas na fase gasosa após ionização por *electrospray* no modo negativo, visando métodos alternativos para a caracterização estrutural destes peptídeos;

- desenvolver metodologias para a análise qualitativa do organofosforado anatoxina-a(s) por cromatografia de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas, bem como estudar sua fragmentação na fase gasosa com vistas a sua identificação;

- estudar os mecanismos de fragmentação do alcalóide cilindrospermopsina quando ionizado por *electrospray* na forma de aduto de metais alcalinos, visando à proposta de rotas de fragmentação para auxiliar a identificação de metabólitos e congêneres;

- estudar os mecanismos de fragmentação de variantes sulfatadas de saxitoxinas após ionização por *electrospray* no modo positivo e negativo. Além disso, averiguar a utilidade do modo negativo de ionização para o desenvolvimento de métodos quantitativos destas toxinas.

3. Capítulo 1: Caracterização de microcistinas por dissociação induzida por colisão após ionização por *electrospray* no modo negativo

3.1 Introdução

Microcistinas (MC) são heptapeptídeos cíclicos produzidos por diversas espécies de cianobactérias, sendo comumente encontradas em episódios de florações em todo mundo. Estes metabólitos secundários são potentes inibidores de fosfatases do tipo 1 e 2A (MACKINTOSH *et al.*, 1990) e representam sério risco a saúde, seja por exposição aguda ou crônica (DÖRR *et al.*, 2010).

As microcistinas apresentam como estrutura química geral a sequência de aminoácidos *ciclo*(Ala¹-**X**²-MeAsp³-**Z**⁴-Adda⁵-Glu⁶-Mdha⁷), onde Ala refere-se a alanina, **X** é um aminoácido variável, MeAsp é ácido *eritro*-3-metilaspártico, **Z** corresponde a outro aminoácido variável, Adda é ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico, Glu é ácido glutâmico e Mdha representa N-metildehidroalanina (**Figura 1**). Os aminoácidos variáveis encontrados nas posições **X**² e **Z**⁴ são utilizados para compor os nomes das variantes de acordo com o código de uma letra para aminoácidos (CARMICHAEL *et al.*, 1988). Dessa forma, a microcistina LR, a variante encontrada com maior frequência, possui leucina (L) e arginina (R) nas posições 2 e 4 do ciclo, respectivamente. Já a MC-RR, outra variante muito comum no Brasil, apresenta arginina (R) nas duas posições. Além destas substituições de aminoácidos, modificações podem ocorrer em cada posição da estrutura cíclica, especialmente nos aminoácidos 3 e 7 (MeAsp e Mdha), onde a ausência de grupamentos metila é usualmente descrita (KRÜGER *et*

al., 2009). Em conjunto com outras substituições menos comuns, estas modificações resultam em um grande número de variantes estruturais, sendo que mais de 80 microcistinas foram descritas até o momento (FUREY *et al.*, 2008).

Figura 1: Estrutura química da MC-LA com numeração dos aminoácidos. Substituições nas posições 2 e 4 para as variantes estruturais mais comuns também são demonstradas.

O grande número de estruturas análogas de microcistinas impõem desafios analíticos consideráveis quando a determinação estrutural é almejada. A correta identificação destas toxinas é importante uma vez que suas toxicidades são variáveis, sendo a MC-LR considerada a mais tóxica (FUREY *et al.*, 2008). Usualmente, a identificação estrutural é possível pela combinação de diferentes técnicas analíticas, como degradação química e análise quiral de aminoácidos, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (BOTES *et al.*, 1984; RINEHART *et al.*, 1988; LUUKKAINEN *et al.*, 1994; RINEHART *et al.*, 1994; KRÜGER *et al.*, 2009). Neste contexto, o advento da técnica de ionização por *electrospray* acoplada à espectrometria de massas sequencial aumentou consideravelmente o número de variantes de

microcistinas identificadas (POON *et al.*, 1993; BATEMAN *et al.*, 1995; NAMIKOSHI *et al.*, 1998). Atualmente, a ionização por *electrospray* no modo positivo seguida de experimentos de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) é amplamente empregada para caracterização estrutural destas toxinas (ZWEIGENBAUM *et al.*, 2000; KUBWABO *et al.*, 2004; 2005). Como exemplo, MAYUMI *et al.* (2006) conduziram um estudo sistemático para análise do perfil de fragmentação de diferentes microcistinas em um equipamento do tipo *ion trap*. A análise dos resultados possibilitou a criação de um modelo de fragmentação que permitiu a identificação de novas variantes. Outra contribuição importante foi dada por DIEHNELT *et al.* (2005; 2006). Estes autores demonstraram a importância da espectrometria de massas de alta resolução, com avaliação da massa exata dos íons e determinação de sua composição elementar, na elucidação estrutural de variantes desconhecidas.

Embora a ionização por *electrospray* no modo positivo acoplada à espectrometria de massas sequencial tenha demonstrado seu potencial na caracterização estrutural de microcistinas e na confirmação de sua presença em amostras ambientais, uma completa elucidação estrutural baseada apenas nesta técnica não é possível (BATEMAN *et al.*, 1995; ZWEIGENBAUM *et al.*, 2000; DIEHNELT *et al.*, 2005). Por exemplo, MAYUMI *et al.* (2006) foram incapazes de determinar a localização de um grupamento metila entre as posições 1 e 2 da estrutura cíclica em uma variante da MC-LR, uma vez que íons com informações sobre a clivagem da ligação peptídica entre Ala¹ e Leu² não foram encontrados nos espectros de fragmentação desta variante. Além disso, a interpretação dos resultados foi dificultada pela presença de múltiplos

íons de mesma relação m/z , porém com sequências de aminoácidos distintas. A formação de íons lineares isobáricos em espectros de fragmentação de peptídeos cíclicos é conhecida e tem origem nas múltiplas possibilidades de abertura do ciclo, como demonstrado na **Figura 2** (NGOKA & GROSS, 1999). Considerando isto, uma possível abertura seletiva da estrutura poderia facilitar a interpretação dos resultados, evitando a formação da série de íons lineares isobáricos. Diante disso, é interessante considerar a dissociação de peptídeos quando ionizados por *electrospray* no modo negativo.

Figura 2: Representação geral da abertura randômica de um peptídeo cíclico protonado em experimentos de dissociação induzida por colisão (CID). A formação de cinco peptídeos lineares isobáricos é demonstrada.

Peptídeos possuindo resíduos ácidos como ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp) são facilmente ionizados por *electrospray* no modo negativo, gerando ânions cuja dissociação induzida por colisão fornece importantes informações estruturais. BRINKWORTH *et al.* (2001) demonstraram que estes aminoácidos induzem clivagens específicas e predominantes que permitem localizar sua posição ao longo da cadeia peptídica. Estas clivagens foram denominadas γ (gama) e δ (delta). Posteriormente, ANDREAZZA *et al.* (2009) demonstraram que estas clivagens são ainda mais pronunciadas quando o aminoácido Asp está conectado à cadeia peptídica através da cadeia lateral,

formando uma ligação chamada de *iso* (*isoAsp*), como no caso das microcistinas.

A dissociação induzida por colisão de ânions de peptídeos pode fornecer outras importantes informações estruturais através do rompimento das ligações peptídicas por clivagens denominadas α (alfa) e β (beta). Além disso, fragmentações características da cadeia lateral de determinados aminoácidos podem ser observadas, o que não ocorre no modo positivo de ionização por *electrospray*. As reações de dissociação de ânions de peptídeos são amplamente discutidas em dois importantes trabalhos de revisão por BOWIE *et al.* (2002) e BILUSICH & BOWIE (2009).

Embora as microcistinas sejam peptídeos, pouquíssimos trabalhos podem ser encontrados na literatura abordando sua dissociação em fase gasosa após ionização por *electrospray* no modo negativo. Como mencionado anteriormente, as microcistinas possuem resíduos de Glu e Asp em sua estrutura química, sendo facilmente ionizadas por abstração de um próton dos grupamentos ácidos livres. Este comportamento foi reportado pela primeira vez por YUAN *et al.* (1999b). Posteriormente, KUBWABO *et al.* (2005) relataram insucesso na caracterização de microcistinas após ionização por *electrospray* no modo negativo. Apenas perdas neutras de água puderam ser observadas pelos autores após dissociação induzida por colisão na fonte de íons (*in-source* CID). Recentemente, FERRANTI *et al.* (2009) exploraram a ionização no modo negativo para a quantificação das microcistinas hidrofóbicas MC-LW e MC-LF em lagos da Itália. Neste trabalho, os autores utilizaram estágios sequenciais de análise de massas (MS^3) nos íons $[M-H]^-$ e $[M-H-H_2O]^-$ em um equipamento

do tipo *ion trap*. Embora tenham afirmado que íons diagnósticos da estrutura destas microcistinas foram observados, nenhuma explicação sobre a identidade destes fragmentos foi fornecida. Não obstante, a utilidade da ionização por *electrospray* no modo negativo para a análise de variantes hidrofóbicas de microcistinas foi claramente demonstrada. Vale ressaltar que a análise destas variantes é dificultada no modo positivo de ionização em virtude da abundante formação de adutos com íons metálicos, especialmente sódio (DRAPER *et al.*, 2009).

Considerando o exposto acima, fica evidente que o modo negativo de ionização não recebeu a mesma atenção que o modo positivo no tocante a caracterização estrutural de microcistinas. Dessa forma, o objetivo deste capítulo é investigar sistematicamente o perfil de dissociação de microcistinas na fase gasosa após ionização por *electrospray* no modo negativo, visando um método alternativo e complementar para elucidação estrutural destes peptídeos cíclicos.

3.2 Objetivos

O objetivo deste capítulo é investigar sistematicamente o perfil de dissociação de quatro variantes de microcistinas após ionização por *electrospray* no modo negativo e uso de espectrometria de massas sequencial de alta resolução. O desenvolvimento de um modelo geral de fragmentação de ânions de microcistinas é almejado, o que auxiliaria a caracterização estrutural destes peptídeos cíclicos, tarefa dificultada pela grande variedade de análogos estruturais encontrados naturalmente.

Uma vez determinado, o modelo de dissociação será empregado para caracterizar estruturalmente variantes desconhecidas de microcistinas.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Reagentes

Padrões comerciais das microcistinas MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA foram adquiridos da empresa Abraxis (Warminster, EUA) como soluções em metanol na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A variante desmetilada [D-Asp³, E-Dhb⁷]MC-RR foi fornecida pela empresa Fluka (Seelze, Alemanha). J.T.Baker (Xalostoc, México) forneceu os solventes grau HPLC. Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Direct-Q8 (Millipore, Milford, EUA). A empresa EMD Chemicals (Gibbstown, EUA) forneceu ácido trifluoracético (HPLC).

3.3.2 Preparo de amostra desconhecida

Uma amostra de material liofilizado de uma cultura de *Microcystis* spp. foi extraída, em banho de ultrassom por 15 minutos, com solução metanol/água 50/50 na relação de 1 mL de solvente extrator para 25 mg de células liofilizadas. Após centrifugação a 5000 *g* por 10 minutos a 10°C, o sobrenadante foi reservado. O procedimento foi repetido, os sobrenadantes combinados e filtrados para *vial* de HPLC. A análise foi realizada em equipamento Prominence (Shimadzu, Kioto, Japão) dotado de detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e coletor de frações. A separação cromatográfica deu-se em coluna Luna C18(2) (250 x 4.6mm, 5 μm ; Phenomenex, Torrance, EUA) segundo o gradiente descrito por LAWTON *et al.* (1994). Picos cromatográficos com espectros de absorção no UV característicos de microcistinas foram coletados para posterior análise por espectrometria de massas.

3.3.3 Espectrometria de massas

As análises foram realizadas no *Medical Research Council*, em Cambridge, Inglaterra. Utilizou-se um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com fonte de *nanospray* Triversa NanoMate (Advion, Harlow, Reino Unido), a qual foi operada no modo negativo de ionização.

As soluções de microcistinas foram analisadas por infusão direta e espectros de fragmentação adquiridos por dissociação induzida por colisão (CID) tanto no *ion trap* linear do equipamento como na câmara de colisão próxima ao orbitrap (HCD). Os íons produto gerados foram analisados no orbitrap com resolução de 100.000. Espectros de fragmentação para a variante [D-Asp³, E-Dhb⁷]MC-RR foram adquiridos em equipamento MicroTOF-QII (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

3.4 Resultados e discussão

O número significativo de trabalhos publicados sobre a caracterização de microcistinas por *electrospray* no modo positivo de ionização permitiu um acúmulo substancial de conhecimento sobre a técnica nas duas últimas décadas (ZWEIGENBAUM *et al.*, 2000; DIEHNELT *et al.*, 2005; KUBWABO *et al.*, 2005; DIEHNELT *et al.*, 2006; FRIAS *et al.*, 2006; MAYUMI *et al.*, 2006; FERRANTI *et al.*, 2009; KRÜGER *et al.*, 2009). Por outro lado, poucos são os trabalhos que abordam o modo negativo de ionização (YUAN *et al.*, 1999a; KUBWABO *et al.*, 2005; FERRANTI *et al.*, 2009). Embora o grande potencial da técnica para análise de peptídeos lineares tenha sido demonstrado por BOWIE *et al.* (2002) e BILUSICH & BOWIE (2009), nenhum estudo sistemático sobre a caracterização de ânions de microcistinas pode ser encontrado na literatura. Dessa forma, o presente trabalho investigou a aplicabilidade do modo negativo de ionização para a caracterização estrutural destas toxinas, visando fornecer dados complementares ao modo positivo.

A Tabela 2 ilustra os resultados das análises de alta resolução para os íons $[M-H]^-$ para as quatro variantes empregadas neste estudo. Como pode ser visto, o erro relativo encontrado para todas as medidas de m/z é inferior a 2 ppm, o que permite confirmar a composição elementar de todas as toxinas. Os espectros de varredura também revelaram a presença de íons duplamente carregados ($[M-2H]^{2-}$) para todas as variantes. De acordo com YUAN *et al.* (1999b), o número de cargas negativas é proporcional ao número de grupamentos ácidos livres encontrados na molécula. Dessa forma, a observação de íons duplamente carregados indica que os grupamentos ácidos

dos resíduos *isoMeAsp*³ e *isoGlu*⁶ não sofreram modificações em relação à estrutura geral das microcistinas. Esta simples observação pode indicar, além de alterações nestas posições, possíveis substituições de outros resíduos por aminoácidos de cadeia lateral acídica, como já descrito por NAMIKOSHI *et al.* (1998).

Tabela 2: Resultados da medida de massa acurada obtidos para ânions de microcistinas após ionização por *electrospray* no modo negativo.

MC	Carga	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórica	Erro (ppm)
MC-LR	[M-H] ⁻	993.5408	993.5415	-0.7
	[M-2H] ²⁻	496.2667	496.2671	-0.8
MC-YR	[M-H] ⁻	1043.5188	1043.5208	-1.9
	[M-2H] ²⁻	521.2560	521.2567	-1.4
MC-RR	[M-H] ⁻	1036.5594	1036.5585	0.9
	[M-2H] ²⁻	517.7753	517.7756	-0.7
MC-LA	[M-H] ⁻	1043.5188	1043.5208	-1.9
	[M-2H] ²⁻	521.2560	521.2567	-1.4

Já os espectros de dissociação induzida por colisão (CID) adquiridos no interior do *ion trap* linear do equipamento são dominados por perdas neutras de água, mesmo em elevadas energias de colisão, como pode ser visto na **Figura 3**. Esta perda neutra de água é característica para resíduos de Asp e Glu no modo negativo (BOWIE *et al.*, 2002) e sua predominância no espectro resulta da excitação seletiva do íon precursor no interior do *ion trap*. Neste tipo de equipamento, a energia necessária para dissociação é transferida ao íon precursor devido ao fenômeno de ressonância. Mais precisamente, a energia

adicional aplicada ao analisador de massas possui frequência semelhante à frequência de oscilação do íon precursor. Em outras palavras, apenas o íon cuja frequência de oscilação no interior do *ion trap* coincide com a frequência da energia auxiliar aplicada será excitado. Isto resulta em espectros de fragmentação com menos íons produto se comparados a espectros adquiridos no interior de células de colisão, como em equipamentos do tipo triplo-quadrupolo. Neste último caso, o íon precursor é acelerado para o interior de uma câmara preenchida com um gás de colisão inerte. Os íons produto gerados continuam a colidir com o gás e sofrem novas fragmentações, o que aumenta o número de íons observados no espectro de MS/MS.

Ainda em relação aos espectros apresentados na **Figura 3**, a perda neutra de 112 Da a partir dos precursores $[M-H]^-$ pode ser observada para todas as variantes. Uma proposta mecanística para esta perda é apresentada na **Figura 4**. Esta proposição está baseada nas clivagens γ (gama) e δ (delta) já descritas para peptídeos lineares contendo Glu, Asp e *iso*Asp (BOWIE *et al.*, 2002; ANDREAZZA *et al.*, 2009; BILUSICH & BOWIE, 2009).

Figura 3: Espectros de fragmentação (CID) obtidos em *ion trap* linear para ânions $[M-H]^-$ de microcistinas. (A) MC-LR; (B) MC-YR; (C) MC-RR e (D) MC-LA.

Figura 4: Mecanismo proposto para a abertura do anel peptídico e eliminação neutra de 112 Da.

Acredita-se que a clivagem γ seja iniciada pela formação de um íon enolato e culmine na formação de um sistema α,β -insaturado, como demonstrado para os íons **B** na **Figura 4**. Entretanto, a abertura seletiva do anel por meio de uma clássica eliminação neutra do tipo E_2 também é plausível. Em ambos os casos, o produto de abertura é o mesmo. Sugere-se que esta abertura seja seguida de um ataque nucleofílico do ânion carboxilato ao grupamento carbonila vizinho, levando à eliminação neutra do composto cíclico 3-metilfuran-2,5-diona e gerando o íon **D** $[M-H-112]^-$ (**Figura 4**).

No intuito de confirmar esta proposição, espectros de MS/MS da variante $[D-Asp^3,E-Dhb^7]MC-RR$ foram adquiridos. Esta microcistina não possui um grupamento metila na posição 3, sendo portanto denominada Asp^3 e não $MeAsp^3$. De maneira interessante, o espectro apresentado na

Figura 5 revela um íon de m/z 924,5, o mesmo encontrado no espectro de fragmentação da MC-RR. Esta perda neutra de 98 Da, ao invés de 112 Da, corrobora a teoria de abertura seletiva do anel na posição 3 do ciclo (vide **Figura 4**). A diferença de 14 Da entre as perdas neutras ocorre justamente pela ausência do grupamento metila na variante $[D-Asp^3,E-Dhb^7]MC-RR$. Por fim, os dados da medida de massa acurada para a perda de água e 122 Da ilustrados na **Tabela 3** confirmam a composição elementar dos íons em questão.

Figura 5: Espectro de MS/MS da variante $[D\text{-}Asp^3,E\text{-}Dhb^7]MC\text{-}RR$ adquirido em equipamento do tipo QTOF. A perda neutra de 98 Da é indicada.

Tabela 3: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de MS/MS para ânions de microcistinas após ionização por *electrospray* no modo negativo.

MC	Composição Elementar	m/z experimental	m/z teórica	Erro (ppm)
MC-LR	$[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$	975.5298	975.5309	-1.1
	$[M\text{-}H\text{-}C_5H_4O_3]^-$	881.5248	881.5254	-0.7
MC-YR	$[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$	1025.5088	1025.5102	-1.4
	$[M\text{-}H\text{-}C_5H_4O_3]^-$	931.5039	931.5047	-0.9
MC-RR	$[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$	1018.5465	1018.5479	-1.4
	$[M\text{-}H\text{-}C_5H_4O_3]^-$	924.5415	924.5425	-1.1
MC-LA	$[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$	890.4664	890.4669	-0.6
	$[M\text{-}H\text{-}C_5H_4O_3]^-$	796.4605	796.4615	-1.2

Um aspecto muito interessante surge quando a fragmentação de um peptídeo linear contendo *isoAsp* é considerada. De acordo com ANDREAZZA *et al.* (2009), estes peptídeos apresentam uma clivagem característica da cadeia peptídica denominada α . O mecanismo de formação destes íons proposto pelos autores é apresentado na **Figura 6**. Segundo cálculos teóricos dos próprios autores, este mecanismo de formação direta é energeticamente desfavorável. No entanto, estes íons podem ser facilmente encontrados nos espectros de MS/MS apresentados pelos autores. Curiosamente, estes íons são estruturalmente equivalentes aos íons **D** propostos na **Figura 4** deste trabalho (ver também **Figura 6**).

Figura 6: Comparação entre os mecanismos direto e sequencial para a formação de íons característicos de uma clivagem α . Proposta adaptada de ANDREAZZA *et al.* (2009).

Uma vez que estes autores investigaram apenas peptídeos lineares, as etapas sequenciais aqui apresentadas não puderam ser observadas. No caso de estruturas cíclicas como as microcistinas, a parte neutra que deveria ser eliminada em um peptídeo linear permanece conectada ao íon em sua extremidade oposta, permitindo a proposição de um mecanismo sequencial. Isto é confirmado pelo fato de íons originários de uma clivagem α direta

estarem ausentes nos espectros de fragmentação de todas as microcistinas estudadas, ou seja, a clivagem α direta não está ativa neste modelo experimental. Em virtude destas evidências, sugere-se que a clivagem α observada em espectros de CID de peptídeos lineares contendo resíduos de Asp/isoAsp seja um processo sequencial, iniciado pela energeticamente favorável clivagem γ , a qual é seguida por uma ciclização com a eliminação neutra de uma molécula de anidrido maleico (**Figura 6**).

Por outro lado, sabe-se que clivagens γ induzidas por resíduos de Asp/isoAsp são seguidas por eliminações neutras de água (BOWIE *et al.*, 2002). Dessa forma, a abertura seletiva do ciclo na posição 3 seguida pela eliminação de água poderia contribuir para a geração dos intensos íons $[M-H-18]^-$ observados nos espectros de fragmentação de todas as microcistinas analisadas. Entretanto, como discutido abaixo, uma sequência importante de íons produto sugere a cadeia lateral do Glu⁶ como outro local para a perda neutra de água.

Quando os intensos íons $[M-H-18]^-$ são submetidos a outro estágio de fragmentação e análise de massas (MS^3), íons com importantes informações estruturais são gerados. Como pode ser visto na **Figura 7**, perdas neutras características da cadeia lateral de determinados aminoácidos são observadas. No caso das microcistinas MC-LR, MC-YR e MC-RR, a eliminação neutra de $HN=C=NH$ (42 Da) da guanidina na cadeia lateral do resíduo de arginina confirma a presença deste aminoácido na estrutura destas variantes. Conforme esperado, este mesmo fenômeno não é observado para a MC-LA (**Figura 7**, Painel IV), dado que esta variante não possui arginina em sua composição.

Figura 7: Espectros de MS³ (CID) para ânions de microcistinas. (I) MC-LR; (II) MC-YR; (III) MC-RR e (IV) MC-LA.

Além da perda neutra de 42 Da, a eliminação de amônia (NH_3) também é observada na **Figura 7** ($[\text{M}-\text{H}-17]^-$). Da mesma forma, este fenômeno não ocorre com a variante MC-LA, sugerindo que a perda neutra aconteça na cadeia lateral da arginina. Embora a perda de amônia seja atribuída a resíduos de Asn e Gln (BOWIE *et al.*, 2002), os resultados aqui apresentados estão de acordo com aqueles obtidos por PU *et al.* (2010), os quais observaram perdas abundantes de amônia e $\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$ em ânions de peptídeos contendo arginina em sua composição.

De maneira geral, a observação de perdas neutras características da cadeia lateral de alguns aminoácidos pode ser bastante útil para a identificação de sua presença na estrutura em estudo. Por exemplo, sabe-se que ânions de peptídeos contendo Ser apresentam perdas pronunciadas de CH_2O (30 Da) quando submetidos a CID (BOWIE *et al.*, 2002). No caso de microcistinas contendo este aminoácido, como a $[\text{MeSer}^7]\text{MC-LR}$ (DIEHNELT *et al.*, 2006), este fenômeno deveria ser facilmente observado, auxiliando sua identificação.

Ainda em relação à **Figura 7**, uma série interessante de íons pode ser encontrada, a qual foi identificada pelas letras **B1** a **B4**. Os resultados para a medida de massa acurada destes íons estão ilustrados na **Tabela 4** e confirmam sua composição elementar. Sugere-se que esta série seja iniciada pela eliminação neutra de água do resíduo Glu⁶. Um estágio adicional de fragmentação dos íons $[\text{M}-\text{H}-18]^-$ (MS^3) levaria a abertura do ciclo na posição 3 (*isoMeAsp*) através de uma clivagem γ , como proposto na **Figura 4**.

Tabela 4: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de MS³ para as microcistinas MC-LR, MC-YR, MC-RR e MC-LA. A série de íons **B1** a **B4** é demonstrada.

Íon	MC-LR			MC-YR			MC-RR			MC-LA		
	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)
[M-H-17] ⁻	958.5036	958.5044	-0.83	1008.4826	1008.4836	-0.99	1001.5191	1001.5197	-0.60	-	-	-
[M-H-42] ⁻	933.5083	933.5091	-0.86	983.4873	983.4884	-1.12	976.5246	976.5247	-0.10	-	-	-
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda-(Glu-H ₂ O)-Mdha-Ala] ⁻	B1 845.4193	845.4203	-1.18	845.4192	845.4203	-1.30	845.4193	845.4203	-1.18	760.3557	760.3563	-0.8
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda-(Glu-H ₂ O)-Mdha] ⁻	B2 774.3821	774.3832	-1.42	774.3821	774.3832	-1.42	774.3824	774.3832	-1.03	689.3185	689.3192	-1.0
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda-(Glu-H ₂ O)] ⁻	B3 691.3453	691.3461	-1.16	691.3451	691.3461	-1.45	691.3455	691.3461	-0.87	606.2817	606.2821	-0.7
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda] ⁻	B4 580.3135	580.3141	-1.03	580.3133	580.314	-1.20	580.3134	580.3140	-1.03	495.2498	495.2501	-0.6

O peptídeo linear formado, cuja porção C-terminal está na forma de amida (ver **Figura 4**), elimina este aminoácido para dar origem aos íons **B1**. De fato, como pode ser visto na **Figura 7** e na **Tabela 4**, o valor de m/z para os íons **B1** das variantes MC-LR, MC-YR e MC-RR é o mesmo, confirmando que o aminoácido variável na posição 2 (**X**) está sendo eliminado. É válido lembrar que é justamente este aminoácido que diferencia estas variantes. Como esperado, íons **B1** para a MC-LA apresentam um valor de m/z inferior em 85 unidades devido à substituição da arginina por uma alanina na posição 4. Os demais íons da série, **B2**, **B3** e **B4**, correspondem a perdas de $\text{Ala}^1\text{-X}^2\text{-NH}_2$, $\text{Mdha}^7\text{-Ala}^1\text{-X}^2\text{-NH}_2$ e $\text{isoGlu}^6\text{(-H}_2\text{O)-Mdha}^7\text{-Ala}^1\text{-X}^2\text{-NH}_2$, respectivamente. A representação esquemática para estes íons considerando a MC-LA encontra-se na **Figura 8**.

Figura 8: Representação esquemática da série de íons **B** para MC-LA.

Considerando-se os mecanismos de fragmentação de peptídeos no modo negativo, esta série de íons é intrigante. Como já mencionado, acredita-se que a clivagem da ligação peptídica seja iniciada pela formação de um enolato, onde um próton é abstraído do carbono alfa de um aminoácido (ver **Figura 6**) (BILUSICH & BOWIE, 2009). No caso das microcistinas, o resíduo Mdha na

posição 7 do ciclo não possui um próton disponível para ser abstraído, o que torna a clivagem da ligação entre Mdha⁷ e Ala¹ inesperada. Entretanto, íons **B2**, originários desta clivagem, são abundantes nos espectros de todas as variantes analisadas (**Figura 7**). Embora os resultados de medida de massa acurada confirmem a composição elementar destes íons, os mecanismos envolvidos em sua formação não são claros.

A análise da **Figura 7** revela ainda a formação de outra série de íons, denominada **A2** a **A4**. Devido à baixa intensidade relativa de alguns destes íons, novos espectros de fragmentação foram adquiridos na câmara de colisão vizinha ao orbitrap, em um processo chamado *Higher Energy Collision Induced Dissociation* (HCD). Se comparados a espectros do *ion trap* linear, estes espectros apresentam um número maior de íons produto, assemelhando-se a espectros de fragmentação gerados por equipamentos do tipo triplo-quadrupolo. Além disso, não possuem o *cutoff* de massas baixas, fenômeno comum verificado em analisadores de massa do tipo *ion trap*.

Os resultados para a fragmentação dos íons [M-H]⁻ para as quatro variantes de microcistinas analisadas encontram-se ilustrados na **Figura 9**. Como pode ser visto, um número considerável de íons produto é gerado em um único estágio de fragmentação (MS/MS), permitindo a aquisição de diversas informações estruturais importantes. Quando estes resultados são combinados com aqueles obtidos utilizando-se o *ion trap* linear, a interpretação da série **A1-A5** é possível.

Figura 9: Espectros de MS/MS (HCD) para ânions de microcistinas. (I) MC-LR; (II) MC-YR; (III) MC-RR e (IV) MC-LA.

Sugere-se que a série **A** seja iniciada pela abertura seletiva do ciclo na posição 3. A subsequente eliminação neutra de 112 Da, como já discutido anteriormente (**Figura 4**), levaria à formação de íons **A1**. A perda do próximo aminoácido na posição 4, no caso o resíduo variável **Z**, dá origem aos íons **A2**. É muito importante ressaltar que estes íons também podem ser formados quando a eliminação de água ocorre na posição 3 (*isoMeAsp*), após a abertura seletiva do ciclo. Neste caso, a eliminação simultânea do aminoácido variável **Z** com a porção restante do *isoMeAsp* também resulta em íons **A2**. A **Figura 10** apresenta uma representação esquemática para a formação destes íons segundo um mecanismo adaptado de BOWIE *et al.* (2002). A formação de íons **A2** a partir dos íons $[M-H-18]^-$ é fundamental para explicar a presença de íons da série **A** nos espectros de MS^3 de todas as microcistinas analisadas.

Figura 10: Representação esquemática da formação de íons **A2** após abertura do peptídeo cíclico e eliminação de água. Mecanismo adaptado de BOWIE *et al.* (2002).

Os íons **A2** podem posteriormente decompor-se nos íons **A3'** e **A3**, conforme ilustrado na **Figura 11**. Esta figura apresenta um esquema geral para a formação de todos os íons da série **A**. A formação sequencial dos íons **A3** é proposta em virtude do aminoácido exótico Adda ser um beta-aminoácido. Já

os íons **A3** podem originar os íons **A4** por meio de uma ciclização, decorrente do ataque nucleofílico do amideto à carbonila da cadeia lateral do resíduo *iso*Glu. Neste processo, a transferência de carga para o ácido cíclico formado justifica os intensos íons de m/z 128 encontrados nos espectros de todas as variantes. Outro ataque nucleofílico à carbonila poderia explicar a origem dos íons **A5**. Os resultados de medida de massa acurada para os íons da série **A** encontram-se na **Tabela 5** e confirmam sua composição elementar.

Figura 11: Representação esquemática dos mecanismos propostos para a formação da série de íons **A**.

Tabela 5: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de MS/MS (HCD) para as microcistinas MC-LR, MC-YR, MC-RR e MC-LA. A série de íons **A1** a **A5** é demonstrada.

	MC-LR			MC-YR			MC-RR			MC-LA		
	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)
A2	725.4232	725.4243	-1.53	775.4022	775.4035	-1.77	768.4404	768.4414	-1.25	-	725.4243	-
A3'	468.2455	468.2464	-1.82	518.2247	518.2256	-1.76	511.2624	511.2634	-1.96	468.2453	468.2464	-2.2
A3	412.2195	412.2201	-1.55	462.1987	462.1994	-1.51	455.2363	455.2372	-1.96	412.219	412.2201	-2.8
A4	311.172	311.1725	-1.61	361.1513	361.1517	-1.11	354.1889	354.1895	-1.69	311.1717	311.1725	-2.6
A5	200.1404	200.1404	-0.20	250.1195	250.1197	-0.80	243.1571	243.1575	-1.60	200.1401	200.1404	-1.7
128	128.0354	128.0353	0.78	128.0354	128.0353	0.78	128.0354	128.0353	0.78	128.0353	128.0353	0.0

De maneira geral, a combinação dos resultados obtidos nos diferentes experimentos realizados permitiu a criação de um modelo de fragmentação baseado na abertura seletiva do peptídeo cíclico na posição 3 do anel, como esquematizado na **Figura 12** para a MC-LR. Uma abertura seletiva é de grande interesse uma vez que reduz a complexidade dos espectros de fragmentação de microcistinas, um problema que sabidamente afeta o sequenciamento de peptídeos cíclicos. O modelo de fragmentação desenvolvido foi posteriormente aplicado para a identificação de uma variante desconhecida de microcistina, presente em um extrato de células de *Microcystis* spp..

Figura 12: Modelo geral de fragmentação de ânions de microcistinas após abertura seletiva do peptídeo cíclico na posição 3. As séries de íons A e B são demonstradas.

Os resultados obtidos para o composto desconhecido são demonstrados na Figura 13 e revelam um íon $[M-H]^-$ com m/z 1035.5892 e seu correspondente $[M-2H]^{2-}$ em m/z 517,2909 (Painel I). A presença do íon duplamente carregado sugere que os grupamentos ácidos estejam livres, ou seja, não apresentam modificações se a estrutura geral das microcistinas é considerada. Os espectros de MS/MS obtidos no interior do *ion trap* linear apresentaram a esperada perda de água, além da eliminação neutra de 112 Da. Este último resultado sugere que o resíduo *isoMeAsp* também esteja inalterado.

Figura 13: Espectros obtidos para composto desconhecido após ionização por *electrospray* no modo negativo. (I) Espectro de varredura (*scan*); (II) espectro de MS^3 (CID) e (III) espectro de MS/MS (HCD).

Quando os espectros de MS^3 são analisados, perdas neutras de 17 e 42 Da indicam a presença de uma arginina na estrutura. Já a série de íons **B** apresenta íons semelhantes aos íons **B** da variante MC-LR, com exceção do íon **B1**. É válido lembrar que os íons **B1** são originários da perda do aminoácido na posição 2 do ciclo, após a abertura do anel peptídico (ver Figura 8). Considerando-se a série **A** deste composto (Figura 13, Painel III) e a série **A** para a MC-LR (Figura 9, Painel I) uma diferença de 42 unidades é observada. Tomados em conjunto, estes dados permitem sugerir que a modificação responsável pela diferença de 42 Da encontra-se na posição 1 do ciclo. Em outras palavras, pelo fato de os íons **B2** serem equivalentes aos íons **B2** da MC-LR, pode-se inferir que o resíduo responsável pela diferença entre estas

variantes está na posição 1 ou 2 do ciclo, uma vez que estes são os aminoácidos eliminados para originar os íons em questão. No entanto, dado que os íons **B1** são diferentes, conclui-se que o resíduo responsável pela diferença encontra-se na posição 1. No caso hipotético de os íons **B1** serem equivalentes para as duas variantes, concluir-se-ia que a modificação está presente na posição 2 do ciclo.

Na estrutura geral das microcistinas, a posição 1 é ocupada por uma alanina (Figura 1). Somando-se 42 Da à massa deste resíduo, um aminoácido cujo resíduo possui 113 Da deve substituir a alanina na variante desconhecida. Dentre os aminoácidos naturais, apenas os isóbaros leucina e isoleucina atendem a esta exigência. Sua presença na posição 1 do ciclo é também confirmada pelos íons **A5** (m/z 242), de composição Leu/Ile-Leu-NH₂ (113+113+16). Dessa forma, conclui-se que a variante desconhecida é [Leu¹]MC-LR, uma microcistina isolada no Brasil e descrita por MATTHIENSEN *et al.* (2000). Experimentos no modo positivo de ionização por *electrospray* corroboram este resultado, assim como as medidas de massa acurada, que revelaram um erro relativo menor que 1 ppm para a fórmula molecular C₅₂H₈₀O₁₂N₁₀.

3.5 Conclusões

Neste capítulo, o perfil de fragmentação de microcistinas após ionização por *electrospray* no modo negativo foi sistematicamente estudado empregando-se a espectrometria de massas de alta resolução. Os resultados obtidos neste estudo inédito permitem concluir que:

- a predominante clivagem γ observada em peptídeos lineares contendo *isoAsp* também ocorre quando ânions de microcistinas são submetidos a dissociação induzida por colisão, o que resulta em uma abertura seletiva do ciclo peptídico;

- a formação de íons característicos de uma clivagem α é um processo sequencial iniciado por uma clivagem γ e não um processo direto, como descrito na literatura;

- a abertura seletiva da estrutura cíclica diminui a complexidade dos espectros de fragmentação, facilitando a interpretação dos resultados;

- duas séries complementares de íons, chamadas de **A** e **B**, foram identificadas, o que permitiu o desenvolvimento de um modelo geral de fragmentação para o sequenciamento de microcistinas;

- o modelo desenvolvido teve sua aplicabilidade demonstrada pela identificação da variante [Leu¹]MC-LR em um extrato celular de *Microcystis* spp.

- para finalizar, conclui-se que o modo negativo de ionização pode fornecer importantes informações estruturais que, associadas aos resultados no modo positivo de ionização, permitem a identificação das microcistinas.

4. Capítulo 2: Métodos para identificação de anatoxina-a(s)

4.1 Introdução

A anatoxina-a(s) é um organofosforado produzido por algumas cepas de *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii* (ONODERA *et al.*, 1997a). Sua estrutura química foi descrita por MATSUNAGA *et al.* (1989) como um éster metílico de fosfato de uma N-hidroxiguanidina cíclica, de massa molecular 252 Da (**Figura 14**).

Figura 14: Estrutura química da anatoxina-a(s).

Estudos farmacológicos demonstraram que animais tratados com esta toxina apresentam sintomas característicos de uma excessiva estimulação colinérgica, como salivação, lacrimejamento, incontinência urinária, fasciculação muscular e paralisia respiratória. A salivação viscosa e abundante observada deu origem ao “s” em seu nome (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986). Posteriormente foi demonstrado que a anatoxina-a(s) é um potente e irreversível inibidor de colinesterases, atuando de maneira semelhante a organofosforados sintéticos (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1987a; b). Esta característica explica os sintomas apresentados pelos animais tratados, dado que a inibição da acetilcolinesterase (AChE) impede a hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, levando ao acúmulo deste neurotransmissor e à consequente hiperestimulação colinérgica. É importante destacar que esta

toxina é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, de maneira que os sintomas resultam da inibição periférica de colinesterases (COOK *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1989a; COOK *et al.*, 1989b).

Mesmo sendo incapaz de atingir o sistema nervoso central, a anatoxina-a(s) está envolvida em incidentes toxicológicos que resultaram na morte de animais, como cães, suínos e pássaros (MAHMOOD *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1989a; HENRIKSEN *et al.*, 1997). No Brasil, a ocorrência de cianobactérias produtoras desta toxina foi documentada por MOLICA *et al.* (2005) e BECKER *et al.* (2010).

Embora a presença de espécies de cianobactérias possivelmente produtoras de anatoxina-a(s) seja reconhecida em diversas partes do mundo, a frequência de sua detecção é baixa se comparada à frequência de aparecimento de outras cianotoxinas, como microcistinas. Este fenômeno pode ser explicado pela grande instabilidade desta toxina em pH alcalino (MATSUNAGA *et al.*, 1989), o que poderia levar a sua rápida degradação durante intensas florações. Nestes ambientes, a grande atividade fotossintética diminui a quantidade de CO₂ dissolvido na água, elevando seu pH (PAERL & USTACH, 1982).

Por outro lado, a ausência de padrões comerciais de anatoxina-a(s) dificulta o desenvolvimento de metodologias analíticas específicas, reduzindo as chances de sua detecção. Atualmente, os métodos utilizados são baseados na sua capacidade de inibição da AChE. Ensaios colorimétricos como o de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) são amplamente empregados devido a sua sensibilidade e baixo custo, porém apresentam como desvantagem a reação

cruzada com qualquer inibidor de AChE que esteja presente na amostra a ser analisada.

Diante do exposto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas surge como excelente alternativa para a determinação desta toxina devido a sua sensibilidade, especificidade e poder de identificação. Embora um trabalho publicado por HILLER *et al.* (2007) apresente um método de LC-MS para triagem de várias cianotoxinas, incluindo a anatoxina-a(s), nenhum método específico dedicado a esta toxina pode ser encontrado na literatura.

Uma vez que um padrão de referência não está disponível, o desenvolvimento de um método por LC-MS para o monitoramento de anatoxina-a(s) requer a compreensão dos mecanismos de fragmentação desta toxina, identificando-se corretamente os íons produtos formados que possam ser utilizados como diagnóstico. Dessa forma, o objetivo deste capítulo é investigar o perfil de dissociação da anatoxina-a(s) na fase gasosa após ionização por *electrospray* no modo positivo, visando estratégias para a correta identificação desta toxina em amostras ambientais.

4.2 Objetivos

O objetivo deste capítulo é investigar sistematicamente o perfil de dissociação induzida por colisão da anatoxina-a(s) após ionização por *electrospray* no modo positivo. A identificação dos íons produto característicos desta toxina é almejada, de maneira a permitir a criação de um modelo de fragmentação que possibilite identificar esta toxina em amostras ambientais, mesmo na ausência de um padrão de referência.

Além disso, tem-se como objetivo o desenvolvimento, apresentação e discussão de metodologias de cromatografia líquida que permitam a separação e análise desta toxina, em conjunto com a espectrometria de massas.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Reagentes

Iodeto de acetilticolina (ASCh), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), Triton X-100, formiato de amônio e ácido fórmico foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Reagentes grau HPLC, etanol, metanol, acetonitrila e ácido acético foram fornecidos pela empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Heparina foi adquirida da empresa Roche (Rio de Janeiro, Brasil).

4.3.2 Preparo de amostra

Material celular liofilizado de quatro culturas de cianobactérias foi utilizado: *Anabaena lemmermannii* PH-160B, isolada do lago Knud Sø, Dinamarca, por HENRIKSEN *et al.* (1997); *Anabaena oumiana* ITEP-024, ITEP-025 e ITEP-026, isoladas do lago Tapacurá, Brasil, por MOLICA *et al.* (2005). O material celular (50 mg) foi extraído com 5 mL de etanol/ácido acético 0,1M (20:80) por 1 minuto em sonda de ultrassom sob gelo, sendo em seguida centrifugado a 5000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi aplicado em cartucho de extração em fase sólida C18 (Sep-Pak, Waters, EUA) previamente condicionado pela passagem de 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de etanol/ácido acético 0,1M (20:80). O eluato obtido pela aplicação da amostra foi recolhido e concentrado em evaporador do tipo SpeedVac (Thermo Scientific, EUA), sendo em seguida reconstituído em 1 mL de metanol e filtrado em filtro de 0,45 µm de poro (Millex, Millipore, EUA).

4.3.3 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase

A inibição da enzima acetilcolinesterase foi avaliada *in vitro* de acordo com WOREK *et al.* (1999), com modificações. Basicamente, 1 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), 50 µL de DTNB (10 mM), 250 µL de sangue hemolizado (sangue total diluído 1:100 em tampão fosfato e Triton X-100) e 20 µL de extrato bruto de anatoxina-a(s) foram incubados por 5 minutos a 37°C antes da adição de 30 µL de acetiltiocolina (28,4 mM). A alteração na absorbância em 436 nm foi monitorada a cada 30 segundos por 3 minutos em um espectrofotômetro U200 (Hitachi Co., Japão). A inibição foi expressa em termos percentuais, sendo uma amostra controle (20 µL solvente extrator) considerada como 100% de atividade.

4.3.4 Cromatografia líquida – espectrometria de massas

Diferentes colunas e metodologias foram testadas para separação dos componentes dos extratos. Para fase reversa, uma coluna Luna C18(2) (150 x 2,0 mm, 3 µm; Phenomenex, EUA) foi empregada. A separação ocorreu sob gradiente (**Tabela 6**) a uma vazão de 200 µL/min, onde a fase A é água e fase B metanol/água 95:5, ambos contendo 2 mM de formiato de amônio e 50 mM de ácido fórmico. Para cromatografia de interação hidrofílica foi utilizada uma coluna de sílica nua (250 x 2,0 mm, 5 µm; Phenomenex, EUA), operada em modo isocrático a 200 µL/min com fase móvel de metanol/água 80:20, contendo 5 mM de formiato de amônio e 0,01% ácido fórmico. Alternativamente, testou-se uma coluna zwiteriônica zic-HILIC (150 x 4,6 mm, 5 µm; Sequant, Suécia). A separação ocorreu sob gradiente (**Tabela 6**) a uma vazão de 700 µL/min, onde a fase A é água/acetonitrila 20:80, contendo 5 mM

formiato de amônio e 2 mM ácido fórmico, e a fase B é água contendo 10 mM formiato de amônio e 10 mM ácido fórmico.

Tabela 6: Gradientes utilizados para separação cromatográfica de extrato contendo anatoxina-a(s) em fase reversa e HILIC.

Luna C18(2)		Zic-HILIC	
Tempo (min)	% B	Tempo (min)	% B
0	0	0	20
1	50	5	35
5	50	10	40
7	90	11	65
12	90	14	65
13	0	15	20
23	0	30	20

Experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) foram realizados em um equipamento do tipo *ion trap* (Esquire HCT, Bruker Daltonics, EUA) equipado com fonte de *electrospray* e acoplado a cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu Co., Japão). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (15 psi) e gás secante (5 L/min, 350°C) e hélio como gás de colisão (4×10^{-6} mbar). A fonte foi operada no modo positivo a 3500 V. A energia de colisão foi alterada para que a intensidade relativa do íon precursor ficasse entre 5 e 20% em relação ao pico base.

Um equipamento do tipo triplo-quadrupolo também foi utilizado para análise dos extratos (API 4000QTRAP, Sciex, EUA), o qual esteve acoplado a cromatógrafo líquido Agilent modelo 1100 (Agilent, EUA). A fonte de ionização foi operada no modo positivo a 4500 V. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (70 psi), *curtain gas* (15 psi), gás secante (550°C) e auxiliar. As

transições iônicas 253>159, 253>98, 253>96 e 253>58 foram selecionadas para experimentos de monitoramento múltiplo de reações (MRM).

4.4 Resultados e discussão

Como discutido anteriormente, a anatoxina-a(s) é uma potente toxina cuja ocorrência pode estar subestimada em virtude de sua instabilidade e falta de métodos analíticos específicos para sua determinação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo apresentar métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas para auxiliar na correta identificação desta toxina em amostras ambientais, mesmo na ausência de padrões analíticos de referência.

Para tanto, material celular de quatro cepas diferentes de cianobactérias foi utilizado. A cepa PH160-B, isolada na Dinamarca, foi caracterizada como produtora de anatoxina-a(s) por diferentes metodologias analíticas, inclusive ressonância magnética nuclear (ONODERA *et al.*, 1997a), sendo aqui utilizada como controle positivo ou amostra de referência. Já as cepas ITEP-024, ITEP-025 e ITEP-026, isoladas do lago Tapacurá, apresentaram capacidade de inibição da acetilcolinesterase, mas apenas na ITEP-024 foi confirmada a presença de anatoxina-a(s) (MOLICA *et al.*, 2005).

O protocolo de extração desenvolvido neste estudo é uma adaptação do trabalho de HENRIKSEN *et al.* (1997). Após a passagem da amostra em uma coluna de extração em fase sólida para a remoção de pigmentos, o eluato foi evaporado e reconstituído em metanol. Esta modificação é importante, pois reduz o número de interferentes dado que uma quantidade considerável de material permanece insolúvel no tubo de extração, enquanto que a anatoxina-a(s) é solubilizada. Dessa forma, sais do meio de cultura e outros compostos iônicos são separados da toxina. De fato, cromatogramas obtidos após a reconstituição em metanol apresentam um menor número de picos se

comparados a cromatogramas obtidos após reconstituição em água. Por outro lado, quando o material insolúvel em metanol é posteriormente reconstituído em água, quantidades desprezíveis de anatoxina-a(s) são detectadas, indicando que o metanol é um solvente eficiente para a solubilização da toxina.

Em relação à capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase, os resultados obtidos para os quatro extratos encontram-se na **Tabela 7**. Como esperado, todos os extratos inibiram consideravelmente a atividade da toxina. Embora o método empregado utilize sangue total e a atividade de outras esterases sanguíneas não pode ser excluída, a elevada inibição verificada está de acordo com os resultados de HENRIKSEN *et al.* (1997) e MOLICA *et al.* (2005).

Tabela 7: Inibição da hidrólise da acetiltiocolina por extratos contendo anatoxina-a(s).

Amostra	Inibição (%) ^a
PH160-B	53
ITEP-024	88
ITEP-025	92
ITEP-026	94

^a em relação ao controle (sem toxina). Amostras analisadas em triplicata.

Uma vez confirmada a presença de um composto inibidor de colinesterases nos quatro extratos, estes foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. De maneira interessante, as quatro amostras apresentaram um íon com m/z 253, o que está de acordo com o íon protonado $[M+H]^+$ esperado para a anatoxina-a(s). Considerando as porções básicas na estrutura química desta toxina - uma guanidina e uma

dimetilamina, espera-se que a protonação ocorra facilmente em condições de *electrospray* no modo positivo.

Com o intuito de determinar o perfil de fragmentação da anatoxina-a(s) em experimentos de dissociação induzida por colisão, o extrato referência PH160-B foi investigado. Tanto no *ion trap* como no triplo-quadrupolo, a fragmentação do íon de m/z 253 gerou os mesmos íons produto, como pode ser visto **Figura 15**.

Figura 15: Espectros de fragmentação do íon de m/z 253 para o extrato PH160-B. (I) Espectro de triplo-quadrupolo; (II) Espectro de *ion trap*; (III) Espectro de *ion trap* com valor de *cutoff* alterado para 20%, demonstrando íon de m/z 58.

Um aspecto importante a ser destacado na **Figura 15** é o fenômeno de *cutoff* de massas baixas, inerente aos analisadores de massa do tipo *ion trap*. Neste fenômeno, íons produto com um valor de m/z inferior a um terço da m/z do íon precursor não podem ser detectados em espectros de MS/MS. No caso específico da antoxina-a(s), íons com m/z inferior a 68 não serão visualizados se o *cutoff* permanecer em seu valor padrão, que é 27% para o Esquire HCT. Dessa forma, para observar o íon de m/z 58, o valor de *cutoff* deve ser alterado manualmente para pelo menos 20%, como pode ser visto na **Figura 15**, Painel III.

A aquisição de espectros adicionais de MS³ permitiu a identificação dos íons produto e a consequente proposição de mecanismos de fragmentação, os quais estão esquematizados na **Figura 16**. Nesta figura, os íons **B** (m/z 235) demonstrados são originários da eliminação de água do grupamento fosfato. Já a perda de CH₃PO₃ do grupamento fosfato origina os íons **C** (m/z 159) que, quando submetidos a estágio subsequente de fragmentação e análise de massas, formam íons característicos de m/z 58 (íons **G**; **Figura 17**, Painel I). Íons **G** também podem ser formados diretamente de **A** (m/z 253) e **D** (m/z 141). Estes últimos são originários da eliminação completa do grupamento metilfosfato da molécula protonada e, quando analisados em MS³, originam os íons **F** (m/z 96) e **E** (m/z 98), como pode ser visto na **Figura 17**, Painel II.

Figura 16: Mecanismos propostos para fragmentação do íon $[M+H]^+$ da anatoxina-a(s) em experimentos de dissociação induzida por colisão.

Figura 17: Espectros de MS³ para íons de (I) m/z 159 e (II) m/z 141.

De acordo com os resultados obtidos e acima demonstrados, as transições iônicas 253>58, 253>159 e 253>98 são recomendadas para experimentos de monitoramento múltiplo de reações (MRM) em equipamentos do tipo triplo-quadrupolo. A primeira transição, 253>58, pode ser utilizada para quantificação devido à natureza intensa, estável e característica do íon de m/z 58. As demais transições, embora com íons de intensidade relativa menor, podem ser utilizadas como qualificadores por serem características desta estrutura química. Apesar da natureza estável destas transições iônicas, visto que aparecem em diferentes equipamentos em diferentes condições analíticas, a intensidade relativa dos íons menos abundantes pode variar. De qualquer forma, o íon de m/z 58 será o pico base, desde que o valor do *cutoff* seja alterado em equipamentos do tipo *ion trap*.

Em relação aos experimentos de separação cromatográfica, diferentes colunas foram avaliadas, e os resultados obtidos para o extrato PH160-B são apresentados na **Figura 18**. O Painel I demonstra um cromatograma obtido com coluna de fase reversa C18. Denota-se que a toxina tem um tempo de retenção muito baixo, eluindo com outros componentes da amostra que são

fracamente retidos. Estes componentes podem interferir no processo de ionização da anatoxina-a(s) na fonte de *electrospray*, fenômeno chamado de efeito matriz, e prejudicar sua determinação. Dessa forma, uma separação cromatográfica mais eficiente é necessária. Considerando a polaridade desta toxina, a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) surge como alternativa.

Figura 18: Cromatogramas obtidos para o extrato PH160-B em diferentes colunas cromatográficas. (I) fase reversa Luna C18(2); (II) HILIC sílica nua Phenomenex; (II) zwitteriônica zic-HILIC.

O Paine II da **Figura 18** representa um cromatograma obtido em coluna de sílica nua (não modificada) em condições isocráticas de HILIC. Nestas condições, a anatoxina-a(s) apresentou um tempo de retenção adequado, sendo possível separá-la dos interferentes da amostra. Esta separação

isocrática é atrativa se a purificação da toxina é almejada, pois um aumento na escala de separação pode ser facilmente obtido.

Alternativamente, testou-se a coluna zwiteriônica zic-HILIC. Esta coluna é empacotada com sílica quimicamente modificada com grupamentos sulfoalquilbetaína (**Figura 19**), permitindo a separação simultânea de compostos aniônicos e catiônicos. Como pode ser visto no Painel III da **Figura 18**, a anatoxina-a(s) apresenta um tempo de retenção adequado com um bom perfil cromatográfico (formato do pico), sendo este método escolhido para a análise dos demais extratos.

Figura 19: Representação esquemática da fase estacionária da coluna zic-HILIC.

A **Figura 20** apresenta os cromatogramas obtidos para diferentes extratos de cianobactérias empregando-se a coluna zic-HILIC e as transições iônicas recomendadas (253>58; 253>159; 253>98) em um equipamento do tipo triplo-quadrupolo. Nota-se que as amostras ITEP-024, ITEP-025 e ITEP-026 apresentam picos cromatográficos intensos em tempo de retenção semelhante ao pico encontrado para a amostra referência PH160-B. Da mesma forma, a área relativa entre os picos cromatográficos correspondentes às diferentes transições iônicas monitoradas é semelhante entre todas as amostras, confirmando a estabilidade dos íons previamente identificados e sua utilidade como critério de identificação.

Estes resultados, tomados em conjunto com aqueles obtidos nos ensaios de inibição de colinesterases, permitem confirmar a presença da anatoxina-a(s) nos extratos ITEP-025 e ITEP-026 pela primeira vez.

Figura 20: Cromatogramas obtidos por cromatografia de interação hidrofílica em coluna zic-HILIC para diferentes extratos de cianobactérias. As transições recomendadas para detecção de anatoxina-a(s) foram monitoradas em um triplo-quadrupolo.

4.5 Conclusões

Neste capítulo, o perfil de fragmentação da anatoxina-a(s) em experimentos de dissociação induzida por colisão foi investigado e métodos cromatográficos para sua determinação foram propostos. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a anatoxina-a(s) é facilmente ionizada por *electrospray* no modo positivo;
- os íons produto de m/z 58, 159, 98 e 96 são adequados para experimentos de monitoramento múltiplo de reações (MRM);
- cuidado deve ser tomado quando equipamentos do tipo *ion trap* são empregados para análise, pois o *cutoff* de massas baixas deste tipo de analisador de massas pode impedir a detecção do íon de m/z 58.
- a cromatografia de interação hidrofílica é alternativa viável para separação cromatográfica de extratos contendo anatoxina-a(s);
- as cepas ITEP-025 e ITEP-026 são produtoras de anatoxina-a(s);
- por fim, pode-se concluir que os métodos apresentados permitem detectar esta toxina em amostras ambientais.

5. Capítulo 3: Formação de adutos com metais durante ionização da cilindropermopsina por *electrospray* no modo positivo

5.1 Introdução

A cilindropermopsina é um alcaloide originalmente isolado da cianobactéria *Cylindropermopsis raciborskii* (OHTANI *et al.*, 1992). Entretanto, outros gêneros de cianobactérias já foram descritos como produtores desta toxina, como *Anabaena* (SPOOF *et al.*, 2006), *Aphanizomenon* (BANKER *et al.*, 1997; PREUSSEL *et al.*, 2006), *Lyngbya* (SEIFERT *et al.*, 2007), *Raphidiopsis* (LI *et al.*, 2001) e *Umezakia* (HARADA *et al.*, 1994).

Quimicamente, a cilindropermopsina é uma molécula zwitteriônica composta por uma porção uracil e uma porção tricíclica de guanidina, as quais são conectadas por um carbono hidroxilado (**Figura 21**). Esta hidroxila, assim como a porção uracil, é fundamental para sua atividade tóxica (NORRIS *et al.*, 1999; BANKER *et al.*, 2001).

Figura 21: Estrutura química da cilindropermopsina.

A cilindropermopsina é classificada como uma citotoxina, sendo sua toxicidade decorrente primariamente da inibição da síntese proteica (RUNNEGAR *et al.*, 1995; RUNNEGAR *et al.*, 2002; FROSCIO *et al.*, 2003). Dessa forma, esta toxina causa danos ao fígado, rins, baço e coração, entre outros órgãos (HUMPAGE & FALCONER, 2003). Em virtude de sua toxicidade, sugeriu-se um limite superior de 1 µg/L para sua presença em água para consumo humano (HUMPAGE & FALCONER, 2003).

A avaliação da presença desta toxina em amostras ambientais é normalmente realizada por meio de métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (TOROKNE *et al.*, 2004) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EAGLESHAM *et al.*, 1999; DELL'AVERSANO *et al.*, 2004; KIKUCHI *et al.*, 2007; BLAHOVA *et al.*, 2009; GALLO *et al.*, 2009), que oferece vantagens por sua sensibilidade e especificidade.

No tocante ao acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas, todos os métodos descritos na literatura para determinação de cilindrospermopsina empregam a técnica de *electrospray* para sua ionização. Apesar de esta técnica ser bastante apropriada para a análise de compostos polares facilmente protonáveis, a possibilidade de formação de adutos com metais não pode ser excluída. No caso específico da cilindrospermopsina, a grande disponibilidade de pares eletrônicos para coordenação com metais torna a formação de adutos bastante provável.

Por outro lado, sabe-se que a análise comparativa do perfil de fragmentação de compostos protonados e cationizados pode fornecer importantes informações estruturais. Esta estratégia foi utilizada por CUI *et al.* (2001) para a caracterização estrutural de ginsenosídeos quando ionizados na forma de adutos com lítio, sódio, potássio e prata. Da mesma forma, estudos comparativos de fragmentação possibilitaram a caracterização estrutural do antibiótico monensina A (LOPES *et al.*, 2002a; LOPES *et al.*, 2002b). Demonstrou-se que a molécula cationizada com sódio origina um número maior de íons produto em experimentos de fragmentação, o que fornece maior

informação estrutural. Recentemente, LIU *et al.* (2010) reportaram a caracterização estrutural de derivados glicosilados de ácido tartárico através da análise comparativa dos espectros de fragmentação de moléculas cationizadas com metais alcalinos.

Considerando a formação de adutos de sódio observada em experimentos preliminares com cilindropermopsina e a possibilidade de utilização deste fenômeno para caracterização estrutural desta toxina, o presente capítulo tem por objetivo estudar seu perfil de fragmentação quando ionizada na forma de aduto com metais alcalinos.

5.2 Objetivos

O objetivo deste capítulo é investigar sistematicamente o perfil de dissociação da cilindropermopsina quando ionizada por *electrospray* na forma de aduto com metais alcalinos do grupo 1A. A identificação dos íons produto característicos desta toxina e a compreensão do efeito do metal sobre o perfil de fragmentação são almejados.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Reagentes

Um padrão de cilindropermopsina foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Metanol grau HPLC foi fornecido pela empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultrapura foi produzida em laboratório em um equipamento Direct-Q8 (Millipore, Milford, EUA). A empresa Vetec (Duque de Caxias, Brasil) forneceu cloreto de sódio, cloreto de lítio e cloreto de potássio.

5.3.2 Preparo de amostras

O padrão de cilindropermopsina foi diluído em metanol/água 1:1 para a concentração de 0,5 µg/mL. Esta solução foi diretamente infundida no espectrômetro de massas. Para estudos com metais, uma solução contendo a toxina (0,5 µg/mL) e um excesso de 4 equivalentes do respectivo sal foi preparada.

5.3.3 Espectrometria de massas

Análises de MSⁿ foram realizadas em um equipamento do tipo *ion trap* (Esquire HCT, Bruker Daltonics, EUA) equipado com um fonte de *electrospray*, a qual foi operada no modo positivo a 3500 V. As amostras foram introduzidas por meio de infusão direta a 5 µL/min com o auxílio de uma bomba de infusão (Cole-Parmer, EUA). Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador (15 psi) e gás secante (5 L/min, 250 °C) e hélio como gás de colisão (4×10^{-6} mbar). A energia de colisão foi ajustada até que a intensidade relativa do íon precursor permanecesse entre 5 e 20%.

As análises de alta resolução/acurácia de massa foram conduzidas em um equipamento híbrido do tipo QTOF (UltrO-TOF, Bruker Daltonics, EUA) equipado com uma fonte de *electrospray*, a qual foi operada no modo positivo a 4500 V. As amostras foram introduzidas da mesma maneira como descrito acima. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador (2 bar), gás secante (4 L/min, 160 °C) e como gás de colisão. Os demais parâmetros utilizados no equipamento foram: *Capillary exit*: 300 V; *Skimmer 1*: 55 V; *Skimmer 2*: 25 V; *Hexapole DC*: 22 V; *Deflector*: 290 V; *Hex RF*: 500 V; *Funnel RF*: 174 V; *Funnel 1 DC*: 200 V; *Funnel 2 DC*: 35 V; *Source Focus Lens*: 50 V; *Coll. Exit Gate*: 80 μ s; *Transfer*: 90 μ s; *Cycle period*: 1 ms; *Spectrum interval*: 2 s. A calibração do equipamento foi obtida através da infusão de uma solução de trifluoracetato de sódio (10 mg/mL).

5.4 Resultados e discussão

Os espectros de varredura obtidos por infusão direta de uma solução de cilindropermopsina em pH neutro revelaram a presença de íons correspondentes a molécula protonada (m/z 416) e cationizada por sódio (m/z 438). A capacidade de formação de adutos com sódio, mesmo quando apenas traços deste elemento estão em solução, é esperada se o grupamento sulfato, rico em pares de elétrons, é considerado. Quando estes íons são submetidos à dissociação induzida por colisão, um número semelhante de íons produto pode ser observado para os dois casos (**Figura 22**). Os íons produto foram identificados com as letras **A** até **F**.

Figura 22: Espectros de fragmentação obtidos em *ion trap* para cilindropermopsina. (I) $[M+H]^+$; (II) $[M+Na]^+$

Com o auxílio de experimentos adicionais de isolamento e dissociação induzida por colisão, uma proposta para três diferentes vias de fragmentação pôde ser elaborada, a qual está ilustrada na **Figura 23**.

Figura 23: Mecanismos de fragmentação propostos para a cilindropermopsina após ionização por *electrospray* no modo positivo e dissociação induzida por colisão. Três rotas distintas são demonstradas.

A via de fragmentação **1** é caracterizada pela eliminação de toda a porção uracil da molécula em um processo independente da carga e semelhante a uma eliminação do tipo 1,6. Esta via gera os íons denominados **B**, de m/z 274 para a molécula protonada $[M+H]^+$ e m/z 296 para a molécula cationizada $[M+Na]^+$. Quando os íons **B** sofrem novo estágio de fragmentação e análise de massas, a eliminação de SO_3 ou $H_2SO_4/NaHSO_4$ é observada, gerando os íons **D** e **F**, respectivamente (**Figura 24**, Painéis I e II).

Figura 24: Espectros de MS³ obtidos em *ion trap* para íons **B** (I e II) e íons **C** (III) da cilindropermopsina.

A segunda via de fragmentação proposta ocorre pela eliminação de SO_3 diretamente dos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gerando os íons produto **C** de m/z 336 e m/z 358, respectivamente. Estágios adicionais de análise de massas demonstram que os íons **C** perdem a porção uracil da molécula e originam exclusivamente os íons **D** (**Figura 24**, Painel III). Este resultado contradiz as propostas de fragmentação apresentadas por DELL'AVERSANO *et al.* (2004) e GALLO *et al.* (2009). Segundo estes autores, os íons **E** de m/z 318 seriam formados a partir dos íons de m/z 336 pela eliminação de água, o que não pôde ser observado neste estudo. Para explicar a formação de íons **E** de m/z 318, uma terceira via de fragmentação precisa estar ativa. Esta via ocorre pela eliminação de H_2SO_4 ou NaHSO_4 diretamente dos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}+\text{Na}]^+$, respectivamente. Como esperado, íons **E** eliminam a porção uracil e formam íons **F** (m/z 176).

Para confirmar a identidade dos íons produto e as vias de fragmentação propostas na **Figura 23**, a espectrometria de massas de alta resolução/acurácia foi empregada. Os resultados apresentados na **Tabela 8** indicam erros experimentais relativos adequados para um equipamento do tipo tempo de voo e, dessa forma, corroboram as propostas mecanísticas.

Tabela 8: Resultados da medida de massa acurada obtidos em espectros de fragmentação para íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ da cilindrospermopsina.

Íon Produto	$[M+H]^+$			$[M+Na]^+$		
	Exp.	Teórico	Erro (ppm)	Exp.	Teórico	Erro (ppm)
B	274.0874	274.0862	4.3	296.0653	296.0675	7.4
C	336.1652	336.1666	4.1	358.1500	358.1486	3.9
D	194.1296	194.1293	1.5	216.1096	216.1107	5.0
E	318.1581	318.1566	4.7	318.1584	318.1566	5.6
F	176.1196	176.1182	7.9	176.1197	176.1182	8.5

Por outro lado, uma análise cuidadosa dos espectros de fragmentação apresentados na **Figura 22** revela que a intensidade relativa dos íons produto é diferente, especialmente se os pares **B/C** e **D/F** forem considerados. De fato, uma inversão pode ser observada. Para a molécula cationizada com sódio, os íons **B** e **F** possuem intensidade relativa maior que os íons **C** e **D**. O contrário ocorre para a molécula protonada: íons **C** e **D** são mais intensos que íons **B** e **F**. O mesmo comportamento pode ser observado nos espectros de MS^3 apresentados na **Figura 24**, confirmando que moléculas cationizadas eliminam preferencialmente $NaHSO_4$ ao invés de SO_3 .

Considerando os mecanismos de formação destes íons apresentados na **Figura 23**, é interessante destacar que a migração do substituinte **R** ligado ao grupamento sulfato é necessária para a eliminação de SO_3 e formação dos íons **C** e **D**. Dessa forma, os resultados acima descritos permitem concluir que existe uma diferença entre a mobilidade do H^+ e do Na^+ durante o processo de

eliminação de SO_3 . Este comportamento pode ser atribuído ao fato de os substituintes **R** possuírem propriedades atômicas distintas, que são fundamentais para determinar a força de ligação com o oxigênio do grupamento sulfato. Neste contexto, a ligação sódio-oxigênio tem caráter iônico e, quando somada à capacidade de coordenação do sódio, torna sua migração menos favorável durante o processo de eliminação de SO_3 . Como consequência, moléculas cationizadas com sódio seguem preferencialmente a via de fragmentação 1 (**Figura 23**), o que explica a maior intensidade relativa dos íons **B** e **F** observada nos espectros da **Figura 22**. Por outro lado, devido a maior mobilidade do H^+ , moléculas protonadas seguem preferencialmente a via de fragmentação 2, justificando a maior intensidade dos íons **C** e **D**. É válido destacar também que a via de fragmentação 3 é independente da migração de **R** e está igualmente ativa nos dois casos.

Esta diferença de mobilidade entre H^+ e do Na^+ estimulou a investigação do perfil de fragmentação da cilindrospermopsina quando ionizada na forma de aduto com outros metais alcalinos, como lítio e potássio. Os resultados obtidos estão ilustrados na **Figura 25** e mostram que adutos com lítio apresentam um número maior de íons produto se comparados aos espectros obtidos com o aduto de sódio. Já adutos com potássio apresentam um perfil de fragmentação menos complexo, contendo menos íons produto. Resultados semelhantes foram obtidos por CUI *et al.* (2001) para a caracterização estrutural de ginsenosídeos. Neste trabalho, adutos de lítio mostraram-se mais adequados para a caracterização estrutural dos açúcares ligados à aglicona, dado que produziram um número maior de íons produto.

Figura 25: Espectros de fragmentação obtidos para cilindrospermopsina quando ionizada na forma de aduto com (I) lítio e (II) potássio.

Considerando-se os íons **B** e **C** nos espectros da **Figura 22** e da **Figura 25**, uma inversão gradual pode ser observada, indicando que a via de fragmentação 1 torna-se mais importante a medida que a massa atômica do grupamento **R** aumenta ($H^+ < Li^+ < Na^+ < K^+$). Esse comportamento é claramente demonstrado na **Figura 26**, onde a razão entre a intensidade relativa dos íons **C** e **B** é apresentada versus a massa atômica do substituinte **R**. A relação inversa entre estes dois parâmetros revela que um aumento na massa atômica do substituinte **R** dificulta sua migração, o que leva a menor formação de íons **C**. De fato, a razão entre as intensidades é muito baixa para moléculas cationizadas com potássio, indicando que a via de fragmentação 1 é predominante, enquanto que a via de fragmentação 2 é dominante para moléculas protonadas e cationizadas com lítio.

Figura 26: Razão entre a intensidade relativa dos íons **C** e **B** versus massa atômica do substituinte **R**.

Este comportamento pode ser explicado pela diminuição da eletronegatividade dos elementos estudados à medida que seu raio atômico e massa atômica aumentam. Dessa forma, o caráter iônico da ligação entre **R** e oxigênio aumenta, dificultando o processo de migração do substituinte durante eliminação de SO_3 . Como resultado, a razão entre os íons **C** e íons **B** é alterada.

De maneira geral, conclui-se que a diferença de mobilidade do substituinte **R** leva a diferentes vias de fragmentação, o que altera o perfil geral dos espectros de MS^2 da cilindrospermopsina. Diante disso, cuidado deve ser tomado na análise dessa toxina em amostras contendo alto teor de metais.

5.5 Conclusões

Neste capítulo, o perfil de fragmentação da cilindropermopsina quando ionizada na forma de aduto com metais do grupo 1A foi investigado. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a cilindropermopsina facilmente forma adutos com metais quando ionizada por *electrospray* no modo positivo;
- os íons de m/z 318 são formados pela eliminação de H_2SO_4 diretamente da molécula protonada, e não pela eliminação sequencial de SO_3 e H_2O ;
- a eliminação de SO_3 é afetada pela natureza do substituinte **R** do grupamento sulfato;
- a diferença de mobilidade do substituinte **R** leva a diferentes vias de fragmentação, o que altera o perfil geral dos espectros de fragmentação da cilindropermopsina.
- por fim, conclui-se que a formação de adutos deve ser investigada durante o desenvolvimento de metodologias para a determinação de cilindropermopsina por LC-MS.

6. Capítulo 4: Análise de saxitoxinas sulfatadas por *electrospray* no modo negativo

6.1 Introdução

As saxitoxinas ou *paralytic shellfish poisoning toxins* (PSP) são neurotoxinas produzidas por dinoflagelados marinhos dos gêneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyridinium* (LANDSBERG, 2002), além de cianobactérias dos gêneros *Aphanizomenon* (BALLOT *et al.*, 2010), *Planktothrix* (POMATI *et al.*, 2000), *Lyngbya* (CARMICHAEL *et al.*, 1997), *Scytonema* (SMITH *et al.*, 2011) e *Anabaena* (HUMPAGE *et al.*, 1994). No Brasil, espécies de *Cylindrospermopsis raciborskii* foram identificadas como produtoras destas toxinas (LAGOS *et al.*, 1999).

As saxitoxinas compreendem uma complexa família contendo mais de 20 compostos, os quais podem ser divididos em três grandes grupos de acordo com suas características estruturais. A classificação ilustrada na **Figura 27** corresponde ao agrupamento das toxinas de acordo com o substituinte da cadeia lateral R4. Dessa forma, têm-se toxinas do tipo “Carbamoil” (R4= -CONH₂), “N-sulfocarbamoil” (R4= -CONHSO₃H) e “decarbamoil” (R4= -OH). Uma classificação alternativa também é utilizada para a nomenclatura destes compostos. A ausência de grupamentos sulfato na estrutura caracteriza o grupo da saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO) e suas variantes. Já a presença de um único grupamento sulfato identifica o grupo das gonyautoxinas (GTX), enquanto que a presença de dois grupamentos sulfato caracteriza o grupo das toxinas “C” (**Figura 27**).

Figura 27: Estrutura química das principais saxitoxinas. Adaptado de DELL'AVERSANO *et al.* 2001.

A variabilidade estrutural verificada entre os representantes desta família implica em diferentes níveis de toxicidade para mamíferos, sendo a saxitoxina (STX) o composto mais tóxico, com uma DL_{50} de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (i.p.) e 3,4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (i.v.) em camundongos. O mecanismo de ação parece ser o mesmo para todas as variantes: bloqueio reversível dos canais de sódio voltagem-dependentes, o que impede o influxo de sódio na célula e a consequente transmissão do impulso nervoso. Os sintomas podem aparecer 15 a 30 minutos após a ingestão de material contaminado, variando de parestesia da face e extremidades, paralisia, depressão e falha respiratória até a morte (GARCIA *et al.*, 2005).

A elevada toxicidade destes compostos tornou o monitoramento de água e alimentos (mariscos, peixes) obrigatório. Diante disso, as saxitoxinas impõem um grande desafio analítico por comporem um grupo complexo de substâncias estruturalmente semelhantes. Além disso, não possuem um grupo cromóforo, não são voláteis e são termolábeis. Essas características, somadas aos baixos níveis presentes em amostras, impedem o uso de cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector ultravioleta-visível (UV/VIS). Estas dificuldades foram superadas com o desenvolvimento de um método de HPLC baseado na separação por pareamento iônico em coluna de fase reversa, seguida de oxidação pós-coluna e detecção por fluorescência (HPLC/FD) (OSHIMA, 1995). Este método, apesar de sensível, requer três corridas isocráticas diferentes para a análise das variantes estruturais. Uma variação deste método foi proposta por LAWRENCE *et al.* (1991), a qual está baseada na oxidação pré-coluna dos analitos (**Figura 28**). Isto elimina a necessidade do aparato de oxidação pós-coluna, porém dificulta a interpretação de resultados, pois diferentes toxinas resultam no mesmo produto de oxidação. Como consequência, a análise dos diferentes grupos de toxinas é feita separadamente, o que exige uma preparação extensiva da amostra.

Figura 28: Reação de oxidação para a saxitoxina, mostrando a formação do derivado fluorescente.

Uma técnica capaz de superar as descritas anteriormente é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Uma vez que as saxitoxinas são compostos de caráter polar e básico, são facilmente ionizadas por *electrospray* no modo positivo, o que permite sua análise por LC-MS. Entretanto, é sabido que a utilização de aditivos para pareamento iônico na fase móvel tem efeito negativo sobre a ionização por *electrospray*. Dessa forma, foram propostas outras formas de cromatografia diferentes da fase reversa, como a cromatografia de troca iônica (JAIME *et al.*, 2001) e a de interação hidrofílica (DELL'AVERSANO *et al.*, 2004; DELL'AVERSANO *et al.*, 2005; DIENER *et al.*, 2007; TURRELL *et al.*, 2008).

A separação de compostos pela cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) está baseada na interação diferencial entre uma camada de água estagnada no interior da coluna e a fase móvel (ALPERT, 1990; IKEGAMI *et al.*, 2008). Esta técnica permite a separação de compostos altamente polares em condições cromatográficas com elevado percentual de solvente orgânico, o que beneficia diretamente a detecção por espectrometria de massas (NGUYEN & SCHUG, 2008).

Um aspecto importante e inerente a qualquer método de quantificação de GTX2 e GTX3 é o fato destes compostos serem epímeros, ou seja, diferenciam-se apenas pela posição absoluta (estereoquímica) dos substituintes R2 e R3 (ver **Figura 27**). Normalmente, cianobactérias produzem preferencialmente GTX3, de modo que a análise de uma amostra fresca (recém-coletada) indicará um pico mais intenso desta toxina. Entretanto, em solução, esta toxina sofre lenta epimerização, sendo convertida gradualmente

em GTX2. A relação GTX2/GTX3 se altera até estabilizar em aproximadamente 3:1, ou seja, três vezes mais GTX2 pode ser detectada em uma amostra armazenada por um longo período (OSHIMA, 1995). Fenômeno semelhante acontece com o outro par de epímeros, GTX1 e GTX4. A observação deste fato é importante, pois pode indicar uma preservação inadequada da amostra, e o resultado obtido deve ser interpretado com cuidado.

Ainda com relação aos epímeros GTX1/GTX4 e GTX2/GTX3, chama atenção o fato de estes compostos possuírem tempos de retenção bem distintos nos métodos cromatográficos publicados, apesar da semelhança estrutural. Estudos indicam que quando o grupo sulfato em C11 está orientado na posição α (alfa), como em GTX1 e GTX2, uma interação intramolecular com a função guanidina do carbono 8 é possível (ver **Figura 27**) (ONODERA *et al.*, 1997b). Acredita-se que esta interação intramolecular modifique a polaridade do epímero, alterando seu tempo de retenção. Em outras palavras, a interação intramolecular diminui o número de grupamentos polares que podem interagir com a fase estacionária nas separações por pareamento iônico. Dessa forma, GTX1 e GTX2 possuem tempos de retenção menores se comparados a seus epímeros (DIENER *et al.*, 2006).

A interação intramolecular também parece contribuir para um comportamento distinto quando os íons $[M+H]^+$, produzidos por *electrospray* no modo positivo, são considerados. Como pode ser visto na **Figura 29**, o epímero GTX2 prontamente elimina SO_3 em seu caminho até o detector do espectrômetro de massas, o que não ocorre para GTX3. Este fato se repete para o par GTX1/GTX4, revelando a grande labilidade do SO_3 quando os íons

$[M+H]^+$ são produzidos a partir dos epímeros capazes de formar esta interação intramolecular.

Da mesma forma, espectros de fragmentação (MS/MS) apresentam um comportamento distinto, como demonstrado na **Figura 30**.

Figura 29: Espectro de varredura em *electrospray* no modo positivo para as variantes GTX2 e GTX3. A intensa eliminação de SO_3 é visível. Adaptado de ONODERA *et al.* (1997b).

Figura 30: Espectros de fragmentação (MS/MS) dos epímeros GTX1 e GTX4. Adaptado de Dell'Aversano *et al.*, 2001.

Além do sulfato em C11, as saxitoxinas apresentam outros grupamentos lábeis em sua estrutura, como por exemplo, um diol geminal em C12 que facilmente elimina água, convertendo-se em uma cetona (SLENO *et al.*, 2004). De fato, a eliminação de água na fonte de ionização é perceptível em espectros de *electrospray* no modo positivo. Dado que os métodos de análise de saxitoxinas encontrados na literatura estão baseados na quantificação do íon $[M+H]^+$, o abundante íon $[M-H_2O+H]^+$ não é monitorado, e a perda de detectabilidade analítica é inevitável.

Considerando os fatos acima descritos, o presente capítulo tem por objetivo estudar o comportamento de variantes sulfatadas de saxitoxinas quando ionizadas por *electrospray* no modo negativo, a fim de propor metodologias alternativas para análise destes compostos em amostras ambientais.

6.2 Objetivos

O objetivo deste capítulo é investigar o perfil de dissociação de saxitoxinas sulfatadas quando ionizadas por *electrospray* no modo negativo. Além disso, deseja-se comparar a estabilidade na fase gasosa dos íons $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$, buscando compreender a grande influência da orientação estereoquímica dos substituintes em C11 sobre o perfil de fragmentação dos epímeros.

Por fim, a utilização do modo negativo de ionização para análise quantitativa das variantes sulfatadas é almejada. Dessa forma, espera-se contornar os problemas de perda de detectabilidade analítica devido à labilidade de alguns substituintes quando o modo positivo de ionização é empregado.

6.3 Materiais e métodos

6.3.1 Reagentes

Soluções-padrão de saxitoxinas foram adquiridas do *National Research Council*, Canadá. Estas soluções são classificadas como Material de Referência Certificado, visto que suas concentrações são estabelecidas por diferentes metodologias e certificadas pelo órgão produtor. Especificamente, foram utilizados: saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO), decarbamoilSTX (dcSTX), decarbamoilNEO (dcNEO), B1 (GTX5), e soluções dos epímeros C1 e C2, gonyautoxinas 2 e 3 (GTX2e3), GTX1e4 e dcGTX2e3. Vale ressaltar que não é possível adquirir estes últimos compostos em soluções individuais, visto que a epimerização ocorre em solução, como discutido anteriormente. Ácido fórmico, formiato de amônio e formiato de sódio grau LC-MS foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sto. Louis, EUA). Acetonitrila grau LC-MS foi fornecida pela Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, EUA). Água ultrapura foi produzida em laboratório por um sistema de ultrapurificação Direct-Q8 (Millipore, Millford, EUA).

6.3.2 Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC)

Utilizou-se uma coluna Zic-HILIC (Sequant, Merck, Alemanha) de 150 x 1,0 mm, 3,5 μ m, 100 Å, sob uma vazão de fase móvel de 35 μ L/min. Diferentes combinações de aditivos de fase móvel foram testados até optar-se por (A) 4 mM formiato de amônio + 0.03% ácido fórmico e (B) ACN/H₂O 90/10. O gradiente utilizado encontra-se na **Tabela 9**.

Tabela 9: Gradiente utilizado para separação de saxitoxinas por HILIC-MS

Tempo (min)	% B
0,0	50
1	50
15	20
20	20
21	50
35	50

6.3.3 Espectrometria de Massas

Experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) foram realizados em um equipamento do tipo *ion trap* (Esquire HCT, Bruker Daltonics, EUA) equipado com fonte de *electrospray* e acoplado a cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu Co., Japão). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (30 psi) e gás secante (5 L/min, 300°C) e hélio como gás de colisão (4×10^{-6} mbar). A fonte foi operada a 3500 V no modo positivo e a 3000 V modo negativo. A energia de colisão foi alterada para que a intensidade relativa do íon precursor ficasse entre 5 e 20% em relação ao pico base.

Um equipamento do tipo tempo de voo (MicroTOF-QII, Bruker Daltonics, EUA) foi empregado para as análises em alta resolução. A fonte de *electrospray* foi operada a 4000 V no modo positivo e 3500 V no modo negativo. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (30 psi) e gás secante (4 L/min, 180°C) e argônio como gás de colisão. A calibração da escala de massas foi obtida com uma solução 1,0 mg/mL de formiato de sódio em isopropanol/água 50/50.

6.4 Resultados e Discussão

Conforme mencionado anteriormente, algumas variantes sulfatadas de saxitoxinas eliminam grupamentos lábeis de sua estrutura ainda durante o processo de ionização e transferência dos íons para o interior do equipamento. É sabido que colisões de íons com moléculas neutras na região de pressão atmosférica da fonte de ionização podem levar à sua fragmentação, processo conhecido como dissociação na fonte (*in-source dissociation*). Para algumas destas variantes, este fenômeno é tão pronunciado que a detecção do íon $[M+H]^+$ torna-se quase impossível. Como exemplo, a **Figura 31** ilustra espectros de varredura obtidos no modo positivo de ionização para os epímeros GTX1 e GTX4. Percebe-se que a intensidade relativa do íon $[M+H]^+$ para a GTX1 (m/z 412) é quase nula, demonstrando a grande labilidade do grupamento SO_3 , o qual é prontamente eliminado, dando origem ao íon $[M-SO_3+H]^+$ de m/z 332. A análise do Painel B desta figura também confirma a diferença de estabilidade na fase gasosa entre os íons $[M+H]^+$ dos epímeros, como discutido na introdução deste capítulo. Nota-se que o pico base para a variante GTX4 corresponde ao íon $[M+H]^+$, e não ao $[M-SO_3+H]^+$.

Conforme mencionado, na hipótese de um método analítico por espectrometria de massas ser baseado na detecção dos íons $[M+H]^+$, fica evidente que uma perda considerável de detectabilidade ocorrerá. A magnitude deste efeito pode ser observada na **Figura 32**, onde cromatogramas extraídos para os íons de m/z 412 e m/z 332 são apresentados.

Figura 31: Espectros de varredura no modo positivo de ionização para os epímeros (A) GTX1 e (B) GTX4, obtidos em equipamento do tipo tempo de voo. A eliminação de grupamentos lábeis pode ser observada.

Figura 32: Cromatogramas extraídos para os íons de (A) m/z 412 e (B) m/z 332, obtidos pela separação dos epímeros por cromatografia de interação hidrofílica.

Um comportamento semelhante pode ser observado para as demais saxitoxinas sulfatadas GTX2, GTX3, dcGTX2 e dcGTX3 (**Figura 33**). Já no caso das variantes duplamente sulfatadas C1 e C2, a eliminação de SO_3 na fonte é ainda mais pronunciada. (**Figura 33**, Painéis E e F).

Figura 33: Espectros de varredura no modo positivo de ionização para as variantes (A) GTX2, (B) GTX3, (C) dcGTX2, (D) dcGTX3, (E) C1 e (F) C2.

Quando os espectros de fragmentação para os íons $[M+H]^+$ destas toxinas são considerados (**Figura 34**), novamente se pode observar o efeito da configuração estereoquímica dos substituintes em C11 sobre a estabilidade destes íons na fase gasosa. Dessa forma, compostos onde o grupamento sulfato está orientado em α (ver **Figura 27**), como GTX1, GTX2 e dcGTX2, apresentam menor estabilidade e facilmente eliminam SO_3 .

Figura 34: Espectros de fragmentação para os íons $[M+H]^+$ de variantes sulfatadas de saxitoxinas.

A menor estabilidade dos compostos onde o grupamento sulfato está orientado em α pode ser comprovada ao comparar-se a intensidade relativa dos precursores $[M+H]^+$ para cada par de epímeros. Considerando-se que a energia de colisão empregada para a aquisição dos dados é a mesma em todos os espectros, a intensidade relativa nula do precursor $[M+H]^+$ para as variantes GTX1, GTX2 e dcGTX2 confirma sua menor estabilidade.

Embora alguns trabalhos científicos atribuam esta fragmentação diferencial entre os epímeros ao fato de existir uma interação intramolecular entre o grupamento sulfato em C11 e a guanidina em C8 (LAGOS *et al.*, 1999; DELL'AVERSANO *et al.*, 2005), nenhuma proposta mecanística pôde ser encontrada na literatura. Dessa forma, cálculos computacionais teóricos de estabilidade de íons na fase gasosa foram conduzidos em colaboração com o Dr. Zvonimir Maksic, do Instituto Rudjer Boskovic, de Zagreb, Croácia. Infelizmente, o Dr. Maksic veio a falecer durante o desenvolvimento deste trabalho, de maneira que apenas resultados preliminares foram obtidos. Apesar deste infortúnio, a preciosa colaboração do Dr. Maksic permitiu propor uma explicação para a labilidade do grupamento sulfato.

Os resultados obtidos indicam que a molécula, mesmo quando ionizada por *electrospray* no modo positivo, existe sob a forma de um zwitterion em relação ao grupamento sulfato e uma guanidina, o que não surpreende se a acidez do sulfato e a basicidade da guanidina forem consideradas. Já a carga positiva adicional necessária para gerar o $[M+H]^+$ reside sobre a outra guanidina. Para as saxitoxinas onde o grupamento sulfato está orientado em α , uma conformação estrutural é assumida de maneira que este grupamento

interaja com a guanidina em C8, como esquematizado na **Figura 35** para GTX2. Nesta figura, percebe-se que um par de elétrons livres do oxigênio ligado em C11 (O11) está próximo ao hidrogênio ligado ao Nitrogênio 9 da guanidina. Esta interação permite a eliminação facilitada de SO_3 segundo o mecanismo proposto na **Figura 36**.

Figura 35: Conformação estrutural assumida pela GTX2. A seta dupla indica interação entre O11 e H9.

Figura 36: Mecanismo proposto para eliminação facilitada de SO_3 em variantes de saxitoxinas cujo grupamento sulfato em C11 está orientado em alfa.

Conforme demonstrado na **Figura 36**, o mecanismo de eliminação facilitada de SO_3 não está ativo nas variantes cujo grupamento sulfato está orientado em β (GTX4, GTX3 e dcGTX3). Isto explica a diferença entre os espectros de fragmentação dos epímeros, visto que nestas variantes a eliminação de água do diol geminal em C12 ganha importância e concorre com a perda de SO_3 em experimentos de dissociação induzida por colisão (**Figura 34**).

De maneira geral, os resultados obtidos permitem concluir que o modo positivo de ionização por *electrospray* não é adequado para a análise de variantes sulfatadas de saxitoxinas. Dessa forma, e em virtude da forte acidez do grupamento sulfato, investigou-se o modo negativo de ionização como alternativa, cujos resultados estão demonstrados na **Figura 37**.

Supreendentemente, os espectros ilustrados na **Figura 37** revelam que a ionização no modo negativo ocorre sem a pronunciada fragmentação na fonte, uma vez que os íons do tipo $[\text{M-H}]^-$ são observados em grande intensidade para todas as variantes analisadas. Além disso, não parece haver diferença entre a estabilidade dos pares de epímeros, dado que os espectros são semelhantes.

Quando os espectros de fragmentação dos ânions $[\text{M-H}]^-$ são considerados (**Figura 38**), um comportamento característico para todas as variantes pode ser observado. Basicamente, estes compostos eliminam água do diol geminal em C12 e 43 Da da cadeia lateral R4, como mostrado na **Figura 39** para a variante GTX2.

Figura 37: Espectros de varredura para variantes sulfatadas de saxitoxinas após ionização por *electrospray* no modo negativo.

Figura 38: Espectros de fragmentação para os íons [M-H]⁻ de variantes sulfatadas de saxitoxinas.

Figura 39: Mecanismo proposto para eliminação de 43 Da de ânions de saxitoxinas sulfatadas.

O mecanismo apresentado na **Figura 39** encontra suporte nos espectros de fragmentação das variantes dcGTX2 e dcGTX3 (**Figura 38**, Painéis E e F). Uma vez que estas variantes possuem apenas uma hidroxila na posição R4, são incapazes de eliminar 43 Da, o que de fato não acontece. Um mecanismo semelhante a este é proposto para dar origem aos íons de m/z 122, encontrados nos espectros de fragmentação das variantes C1 e C2 (**Figura 40**). Estas variantes também podem eliminar SO_3 .

Figura 40: Mecanismo proposto para formação do íon de m/z 122 em sulfocarbamoil toxinas.

De maneira geral, as fragmentações mais abundantes observadas para ânions de saxitoxinas sulfatadas são processos independentes da carga negativa, a qual parece permanecer confinada sobre o grupamento sulfato. Por outro lado, a ausência de carga positiva sobre a guanidina impede o mecanismo de eliminação de sulfato proposto na **Figura 36**.

Em um segundo momento, para avaliar a possibilidade de utilização do modo negativo de ionização em substituição ao modo positivo na análise destas toxinas, corridas cromatográficas comparativas foram realizadas. Para tanto, amostras semelhantes foram analisadas monitorando-se os íons $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$. A **Figura 41** ilustra cromatogramas representativos das análises realizadas. Os resultados demonstram que, com exceção da variante B1, o modo negativo de ionização proporciona picos de área semelhante ou maior que aqueles obtidos com o modo positivo de ionização quando os íons $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$ são considerados. Dessa forma, fica evidente que o modo negativo pode ser uma alternativa para a quantificação das variantes C1/C2, GTX1/4, GTX2/3 e dcGTX2/3 em amostras ambientais.

Para finalizar, conclui-se que o desenvolvimento de um método cromatográfico utilizando o modo negativo de ionização para análise de saxitoxinas sulfatadas é viável. Considerando que as variantes que não apresentam sulfato em sua constituição não ionizam no modo negativo, a divisão do cromatograma em segmentos de polaridade é necessária. Assim sendo, todas as saxitoxinas apresentadas na **Figura 27** poderiam ser

analisadas em uma única corrida cromatográfica, o que representa economia de tempo e recursos.

Figura 41: Cromatogramas comparativos entre os modos de ionização positivo e negativo para as variantes C1/C2, GTX1/4, GTX2/3, dcGTX2/3 e B1, empregando-se *electrospray*.

6.5 Conclusões

Neste capítulo, o perfil de fragmentação de saxitoxinas sulfatadas foi investigado após ionização por *electrospray* no modo positivo e negativo. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- para gonyautoxinas, uma orientação conformacional específica da molécula zwitteriônica é responsável pela diferença de estabilidade dos íons $[M+H]^+$ na fase gasosa;
- o mecanismo para a eliminação facilitada de SO_3 foi proposto pela primeira vez em variantes cujo grupamento sulfato está orientado em α ;
- variantes sulfatadas de saxitoxinas são facilmente ionizadas por *electrospray* no modo negativo;
- ânions de saxitoxinas apresentam vias de fragmentação características e independentes da carga negativa;
- para finalizar, conclui-se que a ionização em modo negativo pode ser alternativa viável para a quantificação de variantes de saxitoxinas contendo grupamentos sulfato em sua estrutura.

7. Considerações Finais

Em um contexto mundial, as toxinas produzidas por cianobactérias ganham destaque devido à crescente demanda de água doce para o abastecimento de grandes centros urbanos. Os reservatórios artificiais criados para o acúmulo desta água, quando afetados negativamente por atividades antropogênicas que resultam em eutrofização, tornam-se cenário ideal para o desenvolvimento massivo destes *microrganismos*.

Dentre os diversos problemas associados ao crescimento demasiado de cianobactérias, a produção de metabólitos secundários tóxicos pode significar sério risco à saúde de homens e animais, seja por exposição aguda ou crônica.

Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias para a identificação e quantificação da grande variedade de substâncias químicas produzidas por estes microrganismos faz-se necessária. Uma ferramenta interessante para suprir tal necessidade é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, uma técnica analítica considerada o tema central deste trabalho. Sua capacidade de identificação de compostos químicos é fundamental para o universo das cianotoxinas, especialmente quando a escassa oferta de padrões analíticos de referência comerciais é considerada. Esta escassez pode ser justificada pela grande complexidade estrutural das principais cianotoxinas, o que inviabiliza economicamente a sua síntese química e obriga sua purificação de culturas ou amostras ambientais.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver ferramentas para a identificação e análise de cianotoxinas por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Para tanto, a

compreensão dos mecanismos de fragmentação em fase gasosa é de suma importância. Dessa forma, estudos sistemáticos de dissociação induzida por colisão foram realizados com as cianotoxinas importantes para o cenário brasileiro e cujo monitoramento é preconizado pela legislação atual, como microcistinas, anatoxina-a(s), cilindrospermopsina e saxitoxinas.

Para as microcistinas, propôs-se uma estratégia para a identificação de variantes estruturais pela análise de espectros de fragmentação destes peptídeos após sua ionização por *electrospray* no modo negativo. É importante destacar que uma abertura seletiva do ciclopeptídeo foi observada, o que reduz a complexidade dos espectros de fragmentação e facilita a interpretação dos dados. Além disso, contribuições na discussão dos mecanismos de fragmentação de ânions de peptídeos foram apresentadas. O modelo em questão não substitui o emprego do modo positivo de ionização, mas serve de complemento na identificação de variantes desconhecidas. Sua utilidade foi demonstrada por meio da identificação [Leu¹]MC-LR em uma amostra de material celular proveniente de uma cultura de *Microcystis* spp.

No caso da anatoxina-a(s), o estudo de fragmentação realizado permitiu a identificação dos íons característicos desta estrutura química após sua ionização por *electrospray* no modo positivo. Em conjunto com os métodos cromatográficos apresentados, estes dados permitirão a identificação desta toxina mesmo na ausência de padrões de referência. O modelo desenvolvido foi utilizado para confirmar a presença desta toxina nas cepas ITEP025 e ITEP-026 pela primeira vez.

No capítulo 3, um estudo de fragmentação da cilindrospermopsina na presença de metais alcalinos foi apresentado. Este estudo foi estimulado pela observação de que esta toxina prontamente forma adutos com metais quando analisada por *electrospray* no modo positivo. Vale ressaltar que a formação de adutos pode prejudicar sua quantificação caso o método cromatográfico seja baseado na análise de íons $[M+H]^+$. Dessa forma, conclui-se que a formação de adutos deve ser investigada durante o desenvolvimento de um método cromatográfico para análise desta toxina.

No capítulo final, a fragmentação de variantes sulfatadas de saxitoxinas foi investigada, tanto no modo positivo como no modo negativo de ionização. A possibilidade de análise destas variantes no modo negativo é uma contribuição importante, pois não há registros de sua utilização na literatura. Normalmente, a determinação destes compostos é feita por métodos longos e trabalhosos baseados na oxidação destes compostos a derivados fluorescentes. Apesar das sabidas vantagens de seletividade da espectrometria de massas, este método ainda não é considerado padrão, pois os métodos fluorimétricos são mais sensíveis para as variantes sulfatadas. Este fato não surpreende se a instabilidade na fase gasosa dos íons $[M+H]^+$ destas variantes for considerada. Neste contexto, uma explicação para a pronunciada eliminação de SO_3 foi apresentada neste capítulo pela primeira vez. Como resultado final, o estudo aqui apresentado será estendido para o desenvolvimento de um método de análise para todas as variantes cujos padrões comerciais estão disponíveis: GTX1e4, GTX2e3, dcGTX2e3, GTX5, NEO, dcNEO, STX e dcSTX. A criação de segmentos de polaridade possivelmente aumentará os limites de detecção

para as variantes sulfatadas, tornando o método equiparável aos métodos fluorimétricos, porém com maior seletividade.

Como conclusão final, pode-se afirmar que a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é ferramenta poderosa para o monitoramento de cianotoxinas em amostras ambientais. Além de análises quantitativas, a identificação de novas toxinas, metabólitos ou produtos de degradação é possível.

8. Referencias Bibliográficas

- ALPERT, A. J. HYDROPHILIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF PEPTIDES, NUCLEIC-ACIDS AND OTHER POLAR COMPOUNDS. **Journal of Chromatography**, v.499, p.177-196, 1990.
- ANDREAZZA, H. J.; WANG, T. F.; BAGLEY, C. J.; HOFFMANN, P.; BOWIE, J. H. Negative ion fragmentations of deprotonated peptides. The unusual case of isoAsp: a joint experimental and theoretical study. Comparison with positive ion cleavages. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, n.13, p.1993-2002, 2009.
- BALLOT, A.; FASTNER, J.; WIEDNER, C. Paralytic Shellfish Poisoning Toxin-Producing Cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.4, p.1173-1180, 2010.
- BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, v.33, n.4, p.613-616, 1997.
- BANKER, R.; CARMELI, S.; WERMAN, M.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. **Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A**, v.62, n.4, p.281-288, 2001.
- BATEMAN, K. P.; THIBAUT, P.; DOUGLAS, D. J.; WHITE, R. L. Mass-spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using online chromatographic and electrophoretic separations. **Journal of Chromatography A**, v.712, n.1, p.253-268, 1995.
- BECKER, V.; IHARA, P.; YUNES, J. S.; HUSZAR, V. L. M. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v.22, n.3, p.235-241, 2010.
- BILUSICH, D.; BOWIE, J. H. Fragmentations of (M-H)⁻ anions of underivatized peptides. Part 2: Characteristic cleavages of ser and cys and of disulfides and other post-translational modifications, together with some unusual internal processes. **Mass Spectrometry Reviews**, v.28, n.1, p.20-34, 2009.
- BLAHOVA, L.; ORAVEC, M.; MARSALEK, B.; SEJNOHOVA, L.; SIMEK, Z.; BLAHA, L. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. **Toxicon**, v.53, n.5, p.519-524, 2009.
- BOTES, D. P.; TUINMAN, A. A.; WESSELS, P. L.; VILJOEN, C. C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D. H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R. J.; HAMMOND, S. J. The structure of Cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n.10, p.2311-2318, 1984.
- BOWIE, J. H.; BRINKWORTH, C. S.; DUA, S. Collision-induced fragmentations of the (M-H)⁻ parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages. **Mass Spectrometry Reviews**, v.21, n.2, p.87-107, 2002.

BRINKWORTH, C. S.; DUA, S.; MCANOEY, A. M.; BOWIE, J. H. Negative ion fragmentations of deprotonated peptides: backbone cleavages directed through both Asp and Glu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.15, n.20, p.1965-1973, 2001.

CARMICHAEL, W. W. CYANOBACTERIA SECONDARY METABOLITES - THE CYANOTOXINS. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, n.6, p.445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K. I.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M. J.; MOORE, R. E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green-algae). **Toxicon**, v.26, n.11, p.971-973, 1988.

CARMICHAEL, W. W.; EVANS, W. R.; YIN, Q. Q.; BELL, P.; MOCZYDLOWSKI, E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.8, p.3104-3110, 1997.

COOK, W. O.; BEASLEY, V. R.; DAHLEM, A. M.; DELLINGER, J. A.; HARLIN, K. S.; CARMICHAEL, W. W. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse-brain cholinesterase activity. **Toxicon**, v.26, n.8, p.750-753, 1988.

COOK, W. O.; BEASLEY, V. R.; LOVELL, R. A.; DAHLEM, A. M.; HOOSER, S. B.; MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the fresh-water cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* - studies of ducks, swine, mice and a steer. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.8, n.10, p.915-922, 1989a.

COOK, W. O.; DELLINGER, J. A.; SINGH, S. S.; DAHLEM, A. M.; CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V. R. Regional brain cholinesterase activity in rats injected intraperitoneally with anatoxin-a(s) or paraoxon. **Toxicology Letters**, v.49, n.1, p.29-34, 1989b.

CUI, M.; SONG, F. R.; LIU, Z. Q.; LIU, S. Y. Metal ion adducts in the structural analysis of ginsenosides by *electrospray* ionization with multi-stage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.15, n.8, p.586-595, 2001.

DELL'AVERSANO, C.; EAGLESHAM, G. K.; QUILLIAM, M. A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1028, n.1, p.155-164, 2004.

DELL'AVERSANO, C.; HESS, P.; QUILLIAM, M. A. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. **Journal of Chromatography A**, v.1081, n.2, p.190-201, 2005.

DIEHNELT, C. W.; DUGAN, N. R.; PETERMAN, S. M.; BUDDE, W. L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, v.78, n.2, p.501-512, 2006.

DIEHNELT, C. W.; PETERMAN, S. M.; BUDDE, W. L. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate *m/z* measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.7, p.622-634, 2005.

DIENER, M.; ERLER, K.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Separation Science**, v.30, n.12, p.1821-1826, 2007.

DIENER, M.; ERLER, K.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. **European Food Research and Technology**, v.224, n.2, p.147-151, 2006.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.50, n.1, p.7-17, 2006.

DÖRR, F. A.; PINTO, E.; SOARES, R. M.; FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S. M. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v.56, n.7, p.1247-1256, 2010.

DOS ANJOS, F. M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D.; ZAJAC, M. P.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; ERLER, K.; LUCKAS, B.; PINTO, E. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, v.48, n.3, p.239-245, 2006.

DRAPER, W. M.; XU, D. D.; PERERA, S. K. Electrolyte-Induced Ionization Suppression and Microcystin Toxins: Ammonium Formate Suppresses Sodium Replacement Ions and Enhances Protonated and Ammoniated Ions for Improved Specificity in Quantitative LC-MS-MS. **Analytical Chemistry**, v.81, n.10, p.4153-4160, 2009.

EAGLESHAM, G. K.; NORRIS, R. L.; SHAW, G. R.; SMITH, M. J.; CHISWELL, R. K.; DAVIS, B. C.; NEVILLE, G. R.; SEAWRIGHT, A. A.; MOORE, M. R. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p.151-154, 1999.

FERRANTI, P.; FABBROCINO, S.; NASI, A.; CAIRA, S.; BRUNO, M.; SERPE, L.; GALLO, P. Liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, n.9, p.1328-1336, 2009.

FERRAO, A. D.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; AZEVEDO, S. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquatic Toxicology**, v.59, n.3-4, p.201-208, 2002.

FRIAS, H. V.; MENDES, M. A.; CARDOZO, K. H. M.; CARVALHO, V. M.; TOMAZELA, D.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Use of *electrospray* tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.344, n.3, p.741-746, 2006.

FROSCIO, S. M.; HUMPAGE, A. R.; BURCHAM, P. C.; FALCONER, I. R. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environmental Toxicology**, v.18, n.4, p.243-251, 2003.

FUREY, A.; ALLIS, O.; ORTEA, P. M.; LEHANE, M.; JAMES, K. J. Hepatotoxins: context and chemical determination. In: BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection**. 2: Taylor and Francis, 2008. p.845-886.

GALLO, P.; FABBROCINO, S.; CERULO, M. G.; FERRANTI, P.; BRUNO, M.; SERPE, L. Determination of cylindrospermopsin in freshwaters and fish tissue by liquid chromatography coupled to *electrospray* ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, n.20, p.3279-3284, 2009.

GARCIA, C.; LAGOS, M.; TRUAN, D.; LATTES, K.; VEJAR, O.; CHAMORRO, B.; IGLESIAS, V.; ANDRINOLO, D.; LAGOS, N. Human intoxication with paralytic shellfish toxins: Clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine. **Biological Research**, v.38, n.2-3, p.197-205, 2005.

HAGEMANN, M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. **Fems Microbiology Reviews**, v.35, n.1, p.87-123, 2011.

HARADA, K.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. F.; WATANABE, M.; TERAOKA, K. ISOLATION OF CYLINDROSPERMOPSIN FROM A CYANOBACTERIUM UMEZAKIA NATANS AND ITS SCREENING METHOD. **Toxicon**, v.32, n.1, p.73-84, 1994.

HENRIKSEN, P.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; MOESTRUP, O. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of Cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. **Toxicon**, v.35, n.6, p.901-913, 1997.

HILLER, S.; KROCK, B.; CEMBELLA, A.; LUCKAS, B. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.42, n.9, p.1238-1250, 2007.

HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I. R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. **Environmental Toxicology**, v.18, n.2, p.94-103, 2003.

HUMPAGE, A. R.; ROSITANO, J.; BRETAG, A. H.; BROWN, R.; BAKER, P. D.; NICHOLSON, B. C.; STEFFENSEN, D. A. PARALYTIC SHELLFISH POISONS FROM AUSTRALIAN CYANOBACTERIAL BLOOMS. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v.45, n.5, p.761-771, 1994.

IKEGAMI, T.; TOMOMATSU, K.; TAKUBO, H.; HORIE, K.; TANAKA, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1184, n.1-2, p.474-503, 2008.

JAIME, E.; HUMMERT, C.; HESS, P.; LUCKAS, B. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.929, n.1-2, p.43-49, 2001.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. D.; DE MELO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v.338, n.13, p.873-878, 1998.

KIKUCHI, S.; KUBO, T.; KAYA, K. Cylindrospermopsin determination using 2- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl ethanesulfonic acid (HEPES) as the internal standard. **Analytica Chimica Acta**, v.583, n.1, p.124-127, 2007.

KRÜGER, T.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. **Toxicon**, v.54, n.3, p.302-312, 2009.

KUBWABO, C.; VAIS, N.; BENOIT, F. M. Identification of microcystin-RR and Dha(7) microcystin-RR in commercial standards by *electrospray* ionization mass spectrometry. **Journal of Aoac International**, v.87, n.4, p.1028-1031, 2004.

_____. Characterization of microcystins using in-source collision-induced dissociation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, n.5, p.597-604, 2005.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v.37, n.10, p.1359-1373, 1999.

LANDSBERG, J. H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, n.2, p.113-390, 2002.

LAWRENCE, J. F.; MENARD, C.; CHARBONNEAU, C. F.; HALL, S. A STUDY OF 10-TOXINS ASSOCIATED WITH PARALYTIC SHELLFISH POISON USING PRECHROMATOGRAPHIC OXIDATION AND LIQUID-CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.74, n.2, p.404-409, 1991.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid-chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. **Analyst**, v.119, n.7, p.1525-1530, 1994.

LI, R. H.; CARMICHAEL, W. W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G. K.; SHAW, G. R.; LIU, Y. D.; WATANABE, M. M. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v.37, n.6, p.1121-1126, 2001.

LIU, J. A.; ZHANG, R. P.; HE, J. M.; LIU, Y.; SHI, J. G.; ABLIZ, Z. The characteristic fragmentation and rearrangement reaction of cationized glucopyranosyloxybenzyl tartrates by tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, n.7, p.824-828, 2010.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; GATES, P. J.; STAUNTON, J. Fragmentation studies on monensin A by sequential *electrospray* mass spectrometry. **Analyst**, v.127, n.4, p.503-506, 2002a.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUNTON, J. Fragmentation studies on monensin A and B by accurate-mass *electrospray* tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.16, n.5, p.414-420, 2002b.

LUUKKAINEN, R.; NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; RINEHART, K. L.; NIEMELA, S. I. Isolation and identification of 12 microcystins from 4 strains and 2 bloom samples of *Microcystis* spp - structure of a new hepatotoxin. **Toxicon**, v.32, n.1, p.133-139, 1994.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G. A. Cyanobacterial Microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a from both mammals and higher-plants. **Febs Letters**, v.264, n.2, p.187-192, 1990.

MAGALHAES, V. F.; MARINHO, M. M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A. C.; COSTA, S. M.; AZEVEDO, L. O.; AZEVEDO, S. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicon**, v.42, n.3, p.289-295, 2003.

MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the fresh-water cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**, v.24, n.5, p.425-434, 1986.

_____. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. **Toxicon**, v.25, n.11, p.1221-1227, 1987a.

_____. Anatoxin-a(s), an irreversible anticholinesterase from the blue-green algae *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. **Toxicon**, v.25, n.2, p.148-148, 1987b.

MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W.; PFAHLER, D. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.4, p.500-503, 1988.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R. E.; NIEMCZURA, W. P.; CARMICHAEL, W. W. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. **Journal of the American Chemical Society**, v.111, n.20, p.8021-8023, 1989.

MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; YUNES, J. S.; KAYA, K.; CODD, G. A. D-Leu(1) microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. **Phytochemistry**, v.55, n.5, p.383-387, 2000.

MAYUMI, T.; KATO, H.; IMANISHI, S.; KAWASAKI, Y.; HASEGAWA, M.; HARADA, K. Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. **Journal of Antibiotics**, v.59, n.11, p.710-719, 2006.

MOLICA, R. J. R.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. C.; COSTA, A.; CUNHA, M. C. C.; MELO, G. L.; AZEVEDO, S. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v.4, n.4, p.743-753, 2005.

NAMIKOSHI, M.; YUAN, M.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L.; ROUHIAINEN, L.; SUN, F.; BRITAIN, S.; OTSUKI, A. Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. **Chemical Research in Toxicology**, v.11, n.2, p.143-149, 1998.

NGOKA, L. C. M.; GROSS, M. L. Multistep tandem mass spectrometry for sequencing cyclic peptides in an ion-trap mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.10, n.8, p.732-746, 1999.

NGUYEN, H. P.; SCHUG, K. A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. **Journal of Separation Science**, v.31, n.9, p.1465-1480, 2008.

NORRIS, R. L.; EAGLESHAM, G. K.; PIERENS, G.; SHAW, G. R.; SMITH, M. J.; CHISWELL, R. K.; SEAWRIGHT, A. A.; MOORE, M. R. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p.163-165, 1999.

OHTANI, I.; MOORE, R. E.; RUNNEGAR, M. T. C. CYLINDROSPERMOPSIN - A POTENT HEPATOTOXIN FROM THE BLUE-GREEN-ALGA CYLINDROSPERMOPSIS-RACIBORSKII. **Journal of the American Chemical Society**, v.114, n.20, p.7941-7942, 1992.

ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; HENRIKSEN, P.; YASUMOTO, T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. **Toxicon**, v.35, n.11, p.1645-1648, 1997a.

ONODERA, H.; SATAKE, M.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T.; CARMICHAEL, W. W. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. **Natural Toxins**, v.5, n.4, p.146-151, 1997b.

OSHIMA, Y. POSTCOLUMN DERIVATIZATION LIQUID-CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR PARALYTIC SHELLFISH TOXINS. **Journal of Aoac International**, v.78, n.2, p.528-532, 1995.

PAERL, H. W.; USTACH, J. F. BLUE-GREEN-ALGAL SCUMS - AN EXPLANATION FOR THEIR OCCURRENCE DURING FRESH-WATER BLOOMS. **Limnology and Oceanography**, v.27, n.2, p.212-217, 1982.

POMATI, F.; SACCHI, S.; ROSSETTI, C.; GIOVANNARDI, S.; ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; NEILAN, B. A. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Phycology**, v.36, n.3, p.553-562, 2000.

POON, G. K.; GRIGGS, L. J.; EDWARDS, C.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A. Liquid-chromatography *electrospray* ionization mass-spectrometry of cyanobacterial toxins. **Journal of Chromatography**, v.628, n.2, p.215-233, 1993.

PREUSSEL, K.; STUKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I.; FASTNER, J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**, v.47, n.2, p.156-162, 2006.

PU, D.; CLIPSTON, N. L.; CASSADY, C. J. A comparison of positive and negative ion collision-induced dissociation for model heptapeptides with one basic residue. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, n.3, p.297-305, 2010.

RINEHART, K. L.; HARADA, K.; NAMIKOSHI, M.; CHEN, C.; HARVIS, C. A.; MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; MULLIGAN, P. E.; BEASLEY, V. R.; DAHLEM, A. M.; CARMICHAEL, W. W. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. **Journal of the American Chemical Society**, v.110, n.25, p.8557-8558, 1988.

RINEHART, K. L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B. W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green-algae (Cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, v.6, n.2, p.159-176, 1994.

RUNNEGAR, M. T.; KONG, S. M.; ZHONG, Y. Z.; LU, S. C. INHIBITION OF REDUCED GLUTATHIONE SYNTHESIS BY CYANOBACTERIAL ALKALOID CYLINDROSPERMOPSIN IN CULTURED RAT HEPATOCYTES. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.2, p.219-225, 1995.

RUNNEGAR, M. T.; XIE, C. Y.; SNIDER, B. B.; WALLACE, G. A.; WEINREB, S. M.; KUHLENKAMP, J. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. **Toxicological Sciences**, v.67, n.1, p.81-87, 2002.

SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESHAM, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) Speziale and Dyck. **Harmful Algae**, v.6, n.1, p.73-80, 2007.

SLENO, L.; VOLMER, D. A.; KOVACEVIC, B.; MAKSIĆ, Z. B. Gas-phase dissociation reactions of protonated saxitoxin and neosaxitoxin. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.15, n.4, p.462-477, 2004.

SMITH, F. M. J.; WOOD, S. A.; VAN GINKEL, R.; BROADY, P. A.; GAW, S. First report of saxitoxin production by a species of the freshwater benthic cyanobacterium, *Scytonema* Agardh. **Toxicon**, v.57, n.4, p.566-573, 2011.

SPOOF, L.; BERG, K. A.; RAPALA, J.; LAHTI, K.; LEPISTO, L.; METCALF, J. S.; CODD, G. A.; MERILUOTO, J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology**, v.21, n.6, p.552-560, 2006.

SVRCEK, C.; SMITH, D. W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v.3, n.3, p.155-185, 2004.

TOROKNE, A.; ASZTALOS, M.; BANKINE, M.; BICKEL, H.; BORBELY, G.; CARMELI, S.; CODD, G. A.; FASTNER, J.; HUANG, Q.; HUMPAGE, A.; METCALF, J. S.; RABAI, E.; SUKENIK, A.; SURANYI, G.; VASAS, G.; WEISZFEILER, V. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. **Analytical Biochemistry**, v.332, n.2, p.280-284, 2004.

TURRELL, E.; STOBO, L.; LACAZE, J. P.; PILETSKY, S.; PILETSKA, E. Optimization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Development of Solid-Phase Extraction for the Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. **Journal of Aoac International**, v.91, n.6, p.1372-1386, 2008.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, n.1, p.7-60, 2007.

VIEIRA, J. M. D.; AZEVEDO, M. T. D.; AZEVEDO, S.; HONDA, R. Y.; CORREA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v.45, n.7, p.901-909, 2005.

WELKER, M.; VON DOHREN, H. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. **Fems Microbiology Reviews**, v.30, n.4, p.530-563, 2006.

WOREK, F.; MAST, U.; KIDERLEN, D.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v.288, n.1-2, p.73-90, 1999.

YUAN, M.; NAMIKOSHI, M.; OTSUKI, A.; RINEHART, K. L.; SIVONEN, K.; WATANABE, M. F. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by *electrospray* ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.34, n.1, p.33-43, 1999a.

YUAN, M.; NAMIKOSHI, M.; OTSUKI, A.; WATANABE, M. F.; RINEHART, K. L. *Electrospray* ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: Modulation of charge states and M+H (+) to M+Na (+) ratio. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.10, n.11, p.1138-1151, 1999b.

ZWEIGENBAUM, J. A.; HENION, J. D.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A.; POON, G. K. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography *electrospray* ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, n.4, p.723-733, 2000.

9. Anexos

9.1 Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5771685/1 - Felipe Augusto Dörr

Email:	fadorr@usp.br
Data de Nascimento:	17/12/1979
Cédula de Identidade:	RG - 9065610173 - RS
Local de Nascimento:	Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico Bioquímico - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2002
Mestrado:	Mestre em Bioquímica Toxicológica (1) - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2004

Curso:	Doutorado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	30/07/2007
Início da Contagem de Prazo:	30/07/2007
Data Limite:	30/07/2011
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 30/07/2007 até o presente. E.Mail: ernani@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/01/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 30/07/2007 Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 28/04/11 14:50:42

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 5771685/1 - Felipe Augusto Dörr

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-1/2	Seminários Gerais em Toxicologia I	30/07/2007	11/11/2007	30	2	75	A	N	Concluída
QFL5933-2/1	Fundamentos da Química Orgânica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	10/03/2008	30/06/2008	150	10	90	A	N	Concluída
FBC5784-1/2	Seminários Gerais em Toxicologia II	11/03/2008	23/06/2008	30	2	75	A	N	Concluída
FBC5747-1/4	Toxicologia Forense	15/04/2008	19/05/2008	75	5	90	A	N	Concluída
FBC5815-1/2	Metodologias "Omics" para Estudos Toxicológicos	22/04/2008	28/04/2008	30	2	90	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20
Atividades Programadas:		21
Seminários:		
Estágios:		
Total:	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto no Parecer nº 930/98, de 30.12.1998 da Câmara de Ensino Superior do CNE.

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 21/02/2011

Impresso em: 28/04/11 14:50:42

9.2 *Publicações originadas no período*

9.2.1 Comparative analysis of the gas-phase reactions of cylindrospermopsin and the difference in the alkali metal cation mobility

Comparative analysis of the gas-phase reactions of cylindrospermopsin and the difference in the alkali metal cation mobility

Felipe Augusto Dörr¹, José Carlos Tomaz², Norberto Peporine Lopes² and Ernani Pinto^{1*}

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Av Professor Lineu Prestes, 580 CEP 05508-900, São Paulo-SP, Brazil

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, Av do Café, s/n CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 30 January 2008; Revised 2 April 2008; Accepted 3 April 2008

Cylindrospermopsin (CYN) belongs to a group of toxins produced by several strains of freshwater cyanobacteria. It is a compact zwitterionic molecule composed of a uracil section and a tricyclic guanidinium portion with a primarily hepatotoxic effect. Using low multi-stage and high-resolution mass spectrometry, the gas-phase reactions of this toxin have been investigated. Our data show that collision-induced dissociation (CID) spectra of CYN are dominated by neutral losses, and three major initial fragmentation pathways are clearly distinguishable. Interestingly, comparative analysis of protonated and cationized molecules showed a significant difference in the balance of the SO₃ and terminal ring elimination. These data indicate that the differential ion mobility of H⁺, Li⁺, Na⁺ and K⁺ leads to different fragmentation pathways, giving rise to mass spectra with different profiles. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Harmful algal bloom (HAB) is a massive occurrence of toxic phytoplankton in either marine or freshwater environments. About 300 species of microalgae have been reported at times to form so-called algal blooms and nearly a quarter of these species are known to produce toxins, which can accumulate to high levels in such outbreaks.¹ These freshwater toxins can pose a health hazard for animals and humans when present in water bodies used as drinking water sources or for recreational purposes, with toxicological effects including neurotoxicity, hepatotoxicity, cytotoxicity and dermatotoxicity.^{2–4}

One of the freshwater toxins documented in poisoning incidents is the alkaloid cylindrospermopsin (CYN), originally isolated from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*.⁵ This toxin was identified as the causative agent of a severe hepatoenteritis which affected humans at Palm Island, Australia, in 1979, during a *C. raciborskii* bloom contaminating the water supply reservoir of that community.^{6,7} Since this incident several investigations have revealed the presence of CYN and new species were found to produce this toxin: *Aphanizomenon ovalisporum* in Israel and Australia,^{8,9} *Aphanizomenon flos-aquae* in Germany,¹⁰ *Umezakia natans* in Japan,¹¹ *Raphidiopsis curvata* in China,¹²

Anabaena bergii in Australia,¹³ and *Anabaena lapponica* in Finland.¹⁴

CYN is a compact zwitterionic molecule composed of a uracil section and a tricyclic guanidinium portion (Fig. 1) with a primarily hepatotoxic effect, although kidneys, lungs, heart, stomach, adrenal glands and the vascular and lymphatic systems are also affected.^{4,5} These toxicity studies led to the proposal of a guideline value of 1 µg/mL of CYN in drinking water.¹⁵ Determination of this toxin is usually achieved by liquid chromatography with photodiode array detection (LC/PDA)¹⁶ or coupled to mass spectrometry (LC/MS).^{17–19} LC/MS methods offer the advantage of higher specificity and sensitivity, being more definitive methods for identification and quantification. Therefore, understanding the mass spectrometric fragmentation of CYN is not only important from an analytical perspective, but also as a model for increasing our ability to identify new analogues in algae.

Comparative analysis of protonated and cationized molecules can be a powerful tool to enhance structural elucidation in mass spectrometric methods based on soft ionization techniques. This strategy was elegantly used in the structural analysis of ginsenosides by electrospray ionization (ESI) with multi-stage mass spectrometry (MSⁿ).²⁰ Comparative analysis was also useful in the fragmentation study of the antibiotic monensin A. Different fragmentation pathways for protonated and sodiated molecules were demonstrated, with the cationized molecule affording a large number of characteristic ions.^{21,22} Moreover, comparative analysis of group 1A metals (Li, Na, K, Rb, Cs) showed the strong influence of the electronegativity of the metal on monensin fragmentation pathways.²³

*Correspondence to: E. Pinto, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 580, 05508900, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: ernani@usp.br

Contract/grant sponsor: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Figure 1. Neutral structure of cylindrospermopsin isolated from *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Considering the importance for human health and the previous findings outlined above, we have examined the gas-phase mechanisms of CYN fragmentation and alkali metal mobility during SO_3 elimination, applying low MS^n and high-resolution mass spectrometry. This information should be of value in identifying new CYN analogues and metabolites.

EXPERIMENTAL

Chemicals and toxin standard

The cylindrospermopsin standard was acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade methanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was distilled and passed through a MilliQ water purification system (Millipore, Milford, MA, USA). NaCl, LiCl, KCl were supplied by Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil).

MS^n analyses

Multi-stage mass analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an ESI source, operated in the positive ion mode. Samples dissolved in methanol/water 1:1

(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were introduced into the source at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ via an infusion pump (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). For the experiments with metal salts, standard solutions were made up with a 4-fold excess of the respective salt (LiCl, NaCl or KCl). Analyses were carried out using nitrogen as nebulizing (15 psi) and drying gas (5 L/min, 250°C) and helium as buffer gas (4×10^{-6} mbar). The capillary high voltage was set to 3500 V. The ion transmission to the trap was automatically adjusted by setting the 'target mass' value as the m/z value of interest. In this way, the instrument parameters are adjusted to maximize the transmission and trapping of the selected m/z value. To avoid space-charge effects, smart ion charge control (ICC) was set to the arbitrary value of 100 000, with a maximum accumulation time of 100 ms. The isolation width was 2.0 m/z units and the collision energy adjusted until the signal intensity of the precursor ion was between 5 and 20% relative to the base peak. Five spectra were averaged for each data point.

High-resolution mass analyses

High-resolution mass analyses were carried out on a hybrid quadrupole time-of-flight instrument (UltrO-TOF) equipped with an ESI source, operated in the positive ion mode. Samples were introduced in the same way as described above. Nitrogen was used as the nebulizing (2 bar), drying (4 L/min, 160°C) and collision gas. The following parameters were used: capillary high voltage: 4500 V; capillary exit: 300 V; skimmer 1: 55 V; skimmer 2: 25 V; hexapole DC: 22 V; deflector: 290 V; Hex RF: 500 V; funnel RF: 174 V; funnel 1 DC: 200 V; funnel 2 DC: 35 V; source focus lens: 50 V; coll. exit gate: 80 μs ; transfer: 90 μs ; cycle period: 1 ms; spectrum interval: 2 s. An accurate-mass calibration was obtained using a solution of sodium trifluoroacetate (10 mg/mL) as internal standard.

Figure 2. ESI ion trap MS^2 spectra of cylindrospermopsin in positive ion mode: (I) $[\text{M}+\text{H}]^+$ and (II) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

RESULTS AND DISCUSSION

The mass spectra obtained at neutral pH in the positive ion mode with the ion trap and UltrO-TOF instruments showed the protonated and sodiated CYN ions at m/z 416 and m/z 438, respectively, even when only trace levels of sodium were present. This is not surprising since the negatively charged

sulfate group of CYN is a prone site for cationization. When isolated and submitted to CID, protonated and sodiated species were found to fragment to yield a similar number of product ions under standard conditions (Fig. 2). Previous LC/MS/MS ESI studies of protonated CYN showed product ions corresponding to the losses of SO_3 and the uracil moiety. These experiments were carried out on a low-resolution

Scheme 1. The proposed fragmentation route of cylindrospermopsin showing the three major pathways.

triple quadrupole and no MSⁿ or high-resolution data were furnished to enable the proposal of possible fragmentation mechanisms.¹⁸ While these results suggest two fragmentation pathways, our MSⁿ analyses revealed the presence of three major initial pathways (Scheme 1).

Pathway 1 is characterized by the elimination of the [6-(2-hydroxy-4-oxo-3-hydropyrimidyl)]hydroxymethyl moiety directly from the protonated or sodiated molecule. As shown in Scheme 1, this neutral loss occurs through the action of the conjugated system in a similar way to classical 1,6-eliminations, affording product ions with m/z 274 from the [M+H]⁺ precursor ion and m/z 296 from the [M+Na]⁺ ion (Fig. 2 and Scheme 1, **B** ions). Further MSⁿ analysis revealed that these **B** ions eliminate SO₃ or H₂SO₄/NaHSO₄ from the tricyclic guanidinium portion, generating ions **D** and **F**, respectively (Scheme 1). Interestingly, sodium-containing ions **B** (m/z 296) preferentially eliminate NaHSO₄ instead of SO₃, leading directly to ions **F** (m/z 176). The opposite effect was observed for the protonated ions **B** (m/z 274): ions **D** (m/z 194) are preferentially formed, suggesting a difference of H⁺ and Na⁺ mobility during the SO₃ elimination (Fig. 3). As expected, subsequent isolation and fragmentation of ions **D** (m/z 194) afforded ions **F** (m/z 176) through the elimination of water (Scheme 1).

Mass analyses also revealed that the second pathway involves the direct neutral elimination of SO₃ from [M+H]⁺ and [M+Na]⁺, affording ions with m/z 336 and m/z 358, respectively (Fig. 2 and Scheme 1, **C** ions). Additional MSⁿ analysis on ions **C** showed the 1,6-elimination of the uracil portion through the mechanism formerly described, leading directly to ions **D** (m/z 194 for CYN and m/z 216 for sodiated CYN). Interestingly, in these experiments, the elimination of water with the subsequent generation of ion **E** (m/z 318) could not be observed (Fig. 3, panel III). These results differ from those previously reported by Dell'Aversano *et al.*, which proposed the elimination of water after loss of SO₃.¹⁸ As shown in Scheme 1, ion **C** eliminates the uracil portion leading directly to ions **D**, which later yield ions **F**.

To explain the origin of ion **E** (m/z 318), a third fragmentation pathway must be present. This pathway is characterized by the elimination of H₂SO₄ or NaHSO₄ from protonated and sodiated CYN, respectively. The proposed mechanism is similar to the neutral elimination of water (Scheme 1, pathway 3, **E** ion). Further MSⁿ analysis also revealed the elimination of the uracil portion from ion **E** (m/z 318) with the consequent formation of ion **F** (m/z 176). It can be seen that all the pathways described are dominated by neutral losses. The predominance of these

Figure 3. ESI ion trap MS³ spectra of cylindrospermopsin in positive ion mode: (I) [M+H]⁺ 416>274; (II) [M+Na]⁺ 438>296; and (III) [M+H]⁺ 416>336.

Table 1. Observed mass, calculated mass, mass error (ppm) and scheme identity for the product ions obtained in the ESI-UltrTOF-CID-MS/MS spectra of protonated and sodiated cylindrospermopsin

Fragment ion	Protonated species			Sodiated species		
	Obs. mass	Calc. mass	Error (ppm)	Obs. mass	Calc. mass	Error (ppm)
B	274.0874	274.0862	4.3	296.0653	296.0675	7.4
C	336.1652	336.1666	4.1	358.1500	358.1486	3.9
D	194.1296	194.1293	1.5	216.1096	216.1107	5.0
E	318.1581	318.1566	4.7	318.1584	318.1566	5.6
F	176.1196	176.1182	7.9	176.1197	176.1182	8.5

charge-remote fragmentation processes is not surprisingly since the positive charge is fixed on the tricyclic guanidinium portion.

A closer inspection of Fig. 2 also reveals that, although the number of product ions is similar in both spectra, a strong difference in relative signal intensities is clearly evident, especially for those ions generated by neutral losses that involve migration of **R** (H^+ or Na^+). In fact, an almost complete inversion in intensities of pairs **C/D** and **B/F** can be seen. These opposite intensities may be attributed to different H^+ and Na^+ mobility during SO_3 elimination, a consequence of their distinct atomic properties, which are the key factors determining bond strength with the oxygen of the sulfate group. In fact the sodium–oxygen bonds are ionic in character. Together with sodium coordination capacity, the higher bond strength makes sodium migration less favorable. As the main consequence, sodiated CYN preferentially follows pathway 1 during its fragmentation, which is in agreement with the higher intensity of pair **B/F**. On the other hand, due to the higher mobility of the proton, the protonated molecule preferentially follows pathway 2. As previously mentioned pathway 3 is independent of **R** migration and is active in both situations.

Taken together, the data described above allowed us to propose the gas-phase chemistry presented in Scheme 1. To

define these mechanisms, high-resolution mass spectrometry was employed and the obtained data confirm all the product ion identities (Table 1). For accurate mass calibration, a solution of sodium trifluoroacetate (10 mg/mL) was used as internal standard.²⁴ We are confident that the proposed ion identities are correct since other possible compositions would result in much greater errors.

The difference in H^+ and Na^+ mobility during SO_3 elimination stimulated the comparative analysis with Li^+ and K^+ complexes. In this way, solutions of CYN containing the respective salt ($LiCl$, $NaCl$ or KCl) were prepared and analyzed by ion trap mass spectrometry. Spectra obtained through isolation and fragmentation of different adducts are depicted in Fig. 4. It can be seen that lithium adducts showed a complex spectrum with diverse product ions compared with sodium adducts. On the other hand, potassium complexes have fewer product ions and a completely different fingerprint. Similar results were obtained by Cui *et al.* during the study of the fragmentation of metal adducts of ginsenosides.²⁰ Looking closer at ions **B** (pathway 1) and **C** (pathway 2), a gradual inversion in intensities can be noted, indicating that pathway 1 becomes more prominent as the atomic mass of '**R**' increases ($H^+ < Li^+ < Na^+ < K^+$). This relation is evident in Fig. 5, which shows the ion intensity ratio (ion **C**/ion **B**) in each spectrum plotted versus the

Figure 4. ESI ion trap MS² spectra of cylindrospermopsin in positive ion mode: (I) $[M+Li]^+$ and (II) $[M+K]^+$.

Figure 5. Ion signal intensity ratio (ion C/ion B) versus atomic mass for protonated and cationized cylindrospermopsin under ion trap conditions. Absolute ion intensities in each spectrum were used for calculation. Data are shown as the average of five intensity ratio data points $\pm$ standard error. Five spectra were averaged for each data point.

atomic mass of 'R'. The observed decrease in ion intensity ratio clearly shows that a higher atomic mass hinders the migration of R. The low ion intensity ratios for potassium adducts demonstrate that these adducts follow almost exclusively pathway 1 during fragmentation. Conversely, lithiated molecules preferentially follow pathway 2. This is probably caused by the increase in the ionic radius of 'R', which leads to a corresponding decrease in electronegativity and, consequently, to an increase in the ionic character of the bond with oxygen, making migration more difficult. Furthermore, a higher atomic mass presumably contributes to hindering the migration of 'R' through an isotopic effect.²³

CONCLUSIONS

The present study shows the different fragmentation pathways for protonated and cationized CYN. These data indicate that the differential ion mobilities of group 1A metals lead to different fragmentation pathways, which in turn give rise to product ion mass spectra with different profiles. Therefore, care should be taken when analyzing this toxin in matrices with a high metal content. In the case of toxin quantification, evaluation of adduct formation during method development is highly recommended. Data obtained in this way provide complementary structural information that will be of significant use for the future identification of CYN derivatives or metabolites.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for research funding, fellowship and financial support.

REFERENCES

1. Hallegraef GM. *Phycologia* 1993; **32**: 79.
2. Van Dolah FM. *Environ. Health Persp.* 2000; **108**: 133.
3. Carmichael WW. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2001; **7**: 1393.
4. Kujbida P, Hatanaka E, Campa A, Colepicolo P, Pinto E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; **341**: 273. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.177.
5. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; **114**: 7941.
6. Byth S. *Med. J. Aust.* 1980; **2**: 40.
7. Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; **50**: 1292.
8. Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. *J. Phycol.* 1997; **33**: 613.
9. Shaw GR, Sukenik A, Livne A, Chiswell RK, Smith MJ, Seawright AA, Norris RL, Eaglesham GK, Moore MR. *Environ. Toxicol.* 1999; **14**: 167.
10. Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. *Toxicon* 2006; **47**: 156. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.10.013.
11. Harada K, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. *Toxicon* 1994; **32**: 73.
12. Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu Y, Watanabe MM. *J. Phycol.* 2001; **37**: 1121.
13. Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. *Environ. Toxicol.* 2001; **16**: 413.
14. Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepisto L, Metcalf JS, Codd GA, Meriluoto J. *Environ. Toxicol.* 2006; **21**: 552. DOI: 10.1002/tox.20216.
15. Humpage AR, Falconer IR. *Environ. Toxicol.* 2003; **18**: 94. DOI: 10.1002/tox.10104.
16. Törökne A, Asztalos M, Bánkiné M, Bickel H, Borbély G, Carmeli S, Codd GA, Fastner J, Huang Q, Humpage A, Metcalf JS, Rábai E, Sukenik A, Surányi G, Vasas G, Weiszfeiler V. *Anal. Biochem.* 2004; **332**: 280. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.036.
17. Eaglesham GK, Norris RL, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Davis BC, Neville GR, Seawright AA, Moore MR. *Environ. Toxicol.* 1999; **14**: 151.
18. Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA. *J. Chromatogr. A* 2004; **1028**: 155. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.083.
19. Kikuchi S, Kubo T, Kaya K. *Anal. Chim. Acta* 2007; **583**: 124. DOI: 10.1016/j.aca.2006.10.007.
20. Cui M, Song F, Liu Z, Liu S. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2001; **15**: 586.
21. Lopes NP, Stark CBW, Hong H, Gates PJ, Staunton JZ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; **16**: 414. DOI: 10.1002/rcm.592.
22. Lopes NP, Stark CBW, Gates PJ, Staunton JZ. *Analyst* 2002; **127**: 503. DOI: 10.1039/b110412h.
23. Lopes NP, Paz FAA, Gates PJ. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006; **42**: 363.
24. Moini M, Jones BL, Rogers RM, Jiang L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998; **9**: 977.

9.2.2 Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to *electrospray* ionization-tandem mass spectrometry

Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization–tandem mass spectrometry

Felipe Augusto Dörr^a, Vania Rodríguez^a, Renato Molica^b, Peter Henriksen^c, Bernd Krock^{d,**}, Ernani Pinto^{a,*}

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Lineu Prestes, 580, 05508900 São Paulo, SP, Brazil

^bUnidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^cDepartment of Marine Ecology, National Environmental Research Institute, University of Aarhus, Roskilde, Denmark

^dAlfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2009

Accepted 8 July 2009

Available online 24 July 2009

Keywords:

Anatoxin-a(s)

Cyanobacteria

LC–MS/MS

Electrospray

ABSTRACT

Anatoxin-a(s) is a potent irreversible inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase with a unique *N*-hydroxyguanidine methylphosphate ester chemical structure. Determination of this toxin in environmental samples is hampered by the lack of specific methods for its detection. Using the toxic strain of *Anabaena lemmermani* PH-160 B as positive control, the fragmentation characteristics of anatoxin-a(s) under collision-induced dissociation conditions have been investigated and new LC–MS/MS methods proposed. Recommended ion transitions for correct detection of this toxin are 253 > 58, 253 > 159, 235 > 98 and 235 > 96. Chromatographic separation is better achieved under HILIC conditions employing a ZIC–HILIC column. This method was used to confirm for the first time the production of anatoxin-a(s) by strains of *Anabaena oumiana* ITEP-025 and ITEP-026. Considering no standard solutions are commercially available, our results will be of significant use for the correct identification of this toxin by LC–MS/MS.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cyanobacteria (blue-green algae) are ubiquitous microorganisms with a fundamental role as primary producers in different ecosystems. Under appropriate conditions, these organisms are capable of massive reproduction, mainly in eutrophic and hypertrophic freshwater bodies where nutrients are abundant. Such outbreaks are known as blooms and are increasingly compromising the use of water for drinking and recreational purposes, especially when bloom-forming species are able to produce

toxic secondary metabolites (cyanotoxins), which can accumulate to high levels and pose serious health risks to animals and humans (Dittmann and Wiegand, 2006).

Cyanotoxins are commonly grouped according to their biological effects into hepatotoxins (microcystins and nodularins), neurotoxins (anatoxins and *paralytic shellfish poisoning* toxins), cytotoxins (cylindrospermopsin) and toxins with irritating potential (lipopolysaccharide) (Sivonen and Jones, 1999).

One of the freshwater toxins documented in poisoning incidents is the neurotoxic alkaloid anatoxin-a(s), originally described from the strain *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17 (Mahmood and Carmichael, 1986), and later identified as a unique *N*-hydroxyguanidine methylphosphate ester (Fig. 1) (Matsunaga et al., 1989).

Anatoxin-a(s) is a potent irreversible inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase with an intraperitoneal LD₅₀ of

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30911505; fax: +55 11 30319055.

** Corresponding author. Tel.: +49 471 48312055; fax: +49 471 48311425.

E-mail addresses: bernd.krock@awi.de (B. Krock), ernani@usp.br (E. Pinto).

Fig. 1. Chemical structure of anatoxin-a(s).

approximately 40 µg/kg in mice (Mahmood and Carmichael, 1987a,b). It is the only natural organophosphate-like structure known, with toxicity comparable to synthetic insecticides and some chemical warfare agents (Devic et al., 2002). The main symptoms of anatoxin-a(s) intoxication in mice are viscous salivation, lacrimation, urinary incontinence, fasciculation, convulsion and respiratory distress followed by death (Mahmood and Carmichael, 1986). These symptoms are a consequence of peripheral acetylcholinesterase inhibition given that this toxin is unable to cross the blood–brain barrier (Cook et al., 1988; Cook et al., 1989a,b).

Reports of anatoxin-a(s) occurrence are much less common when compared with other neurotoxins. Currently, this toxin has been described in Canada (Carmichael and Gorham, 1978), United States (Mahmood et al., 1988), Denmark (Henriksen et al., 1997; Onodera et al., 1997) and Brazil (Molica et al., 2005). This low incidence may be explained by its well-known instability in alkaline medium (Matsunaga et al., 1989) and the lack of commercially available analytical standards, factors which hamper the development of specific methods for its determination. Therefore, anatoxin-a(s) detection in environmental samples relies on animal bioassays and acetylcholinesterase inhibition tests, methods which present several problems, such as low sensitivity and specificity. Moreover, ethical issues are involved in animal testing, driving the search for alternative testing methods.

In this regard, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) is a valuable alternative as analytical tool. LC–MS/MS methods offer the advantage of higher specificity and sensitivity when compared to animal bioassays, being more definitive methods for identification and quantitation of compounds in different matrices. Besides the recent publication of Hiller et al. (2007), who presented a rapid screening method for various cyanobacterial toxins including anatoxin-a(s), there is no specific LC–MS/MS method dedicated to anatoxin-a(s) in the literature. In order to develop such a method, studying the fragmentation characteristics of this toxin under collision-induced dissociation (CID) conditions is a crucial step. Therefore, the purpose of this work is to report the fragmentation behavior of anatoxin-a(s) after electrospray ionization (ESI) and CID, and to present different chromatographic separation methods. These results will allow researchers to confirm the presence of anatoxin-a(s) in environmental samples using LC–MS/MS as a detection tool.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocoline iodide (ASCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), Triton X-100, ammonium formate and formic acid were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Merck (Darmstadt, Germany) supplied HPLC grade ethanol, methanol, acetonitrile and acetic acid. Heparine was purchased (25,000 I.E./mL) from Roche (Rio de Janeiro, Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Sample preparation

Samples from four different cultured strains were used in this study: *Anabaena lemmermannii* strain PH-160 B, isolated from Lake Knud Sø, Denmark (Henriksen et al., 1997), and *Anabaena oumiana* strains ITEP-024, ITEP-025 and ITEP-026. These three strains were isolated from Tapacurá reservoir, Brazil, and were firstly identified as *Anabaena spiroides* by Molica et al. (2005), but Werner and Laughinghouse (2009) identified them as *A. oumiana*.

Lyophilized culture-harvested material was extracted according to Henriksen et al. (1997) with some modifications. Briefly, 50 mg of lyophilisate were resuspended in 5 mL of ethanol/acetic acid 0.1 M (20:80), sonicated for 1 min in ice and centrifuged at 5000g for 15 min. The supernatants were applied to a preconditioned (5 mL of methanol followed by 5 mL of ethanol/acetic acid 0.1 M 20:80) C18 cartridge (Sep-Pack, Waters, MA, USA) to retain pigments. Eluates were dried in a SPD121P SpeedVac system (Thermo Scientific, MA, USA), resuspended in methanol and filtered into an autosampler vial.

2.3. Acetylcholinesterase (AChE) assay

The *in vitro* inhibition of AChE was evaluated according to Worek et al. (1999) with some modifications. A mixture of 1 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 50 µL of 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; 10 mM), 250 µL of hemolysed human blood (heparinized whole blood diluted 1:100 in phosphate buffer and Triton X-100) and 20 µL of crude extract containing anatoxin-a(s) was incubated at 37 °C for 5 min before the addition of 30 µL of acetylthiocoline (28.4 mM). Absorbance was read every 30 s during 3 min at 436 nm (U200, Hitachi Co., Japan). Appropriate controls and blanks were run for each sample.

2.4. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)

Collision-induced dissociation (CID) experiments were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire HCT, Bruker Daltonics, MA, USA) equipped with an electrospray source and coupled to a Shimadzu Prominence liquid chromatograph (Shimadzu Co., Japan). Nitrogen was used as nebulizing (15 psi) and drying gas (5 L/min, 350 °C) and helium as buffer gas (4×10^{-6} mbar). The capillary high voltage was set to 3500 V. To avoid space-charge effects, smart ion charge control (ICC) was set to the arbitrary value of 100,000, with a maximum accumulation time of 100 ms.

Isolation width was 2.0 m/z units and collision energy adjusted until the signal intensity of the precursor ion was between 5% and 20% relative to the base peak.

Multiple reaction monitoring (MRM) experiments were carried out on a triple-quadrupole mass spectrometer (ABI-SCIEX 4000 QTrap, CA, USA) equipped with a TurboSpray® interface and coupled to an Agilent model 1100 LC liquid chromatograph (Agilent, CA, USA). High-purity nitrogen was employed as nebulizer, auxiliary, curtain and collision gas. The source was operated in the positive ion mode by selecting the following transitions (precursor ion > fragment ion): m/z 253 > 159, m/z 253 > 98, m/z 253 > 96 and m/z 253 > 58. Dwell times of 100 ms were used for each transition. Other mass spectrometric settings are summarized in Table 1.

Reversed-phase chromatographic separation was performed on a Luna C18(2) column (150 mm × 2.0 mm, 3 µm, Phenomenex, CA, USA) maintained at 30 °C. The flow rate was 0.2 mL/min and gradient elution was performed with two eluents, where eluent A was water and eluent B was methanol/water (95:5 v/v), both containing 2.0 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. Initial conditions were 10 min column equilibration with 0% B, followed by a linear gradient to 50% B in 1 min, isocratic elution until 5 min with 50% B, linear gradient to 90% B until 7 min and isocratic elution with 90% B until 12 min. The program was then returned to initial conditions until 13 min and the column equilibrated until 23 min (total run time: 35 min).

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) separation was carried out on a bare silica column (250 mm × 2.0 mm, 5 µm, Phenomenex) under isocratic conditions using a mixture of methanol/water (80:20 v/v) containing 5.0 mM ammonium formate and 0.01% formic acid as mobile phase. The flow rate was 0.2 mL/min. Alternatively, a ZIC-HILIC column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm, SeQuant, Umeå, Sweden) was employed. Separation was achieved under gradient elution at 0.7 mL/min where eluant A was water/acetonitrile (20:80 v/v) containing 5.0 mM ammonium formate and 2 mM formic acid and eluent B was water containing 10 mM ammonium formate and 10 mM formic acid. Elution started with a linear gradient from 20% B to 35% B until 5 min, a second gradient to 40% B until 10 min, a third gradient to 65% B until 11 min and an isocratic elution until 14 min with 65% B. The program was then returned to initial conditions until 15 min and column equilibrated for more 15 min (total run time: 30 min).

Table 1

Recommended MS parameters for determination of anatoxin-a(s) in MRM mode (triple-quadrupole 400 QTrap).

Parameter	Value
Ion spray voltage	4500 V
Nebulizer gas	70 psi
Curtain gas	15 psi
Heater temperature	550 °C
Collision-associated dissociation gas (CAD)	Medium
Declustering potential	51 V
Entrance potential	10 V
Collision energy	30 V
Exit potential	12 V

3. Results and discussion

As previously discussed, anatoxin-a(s) is a potent anticholinesterasic agent produced by different strains of *Anabaena*. Besides its high toxicity, only few reports have described the presence of this toxin in environmental samples or identified it as the causative agent of animal intoxication. However, these numbers may be underestimated by its well-known instability in alkaline medium and the lack of specific methods for its detection. Considering this, the aims of this work were to study the fragmentation pattern of anatoxin-a(s) under CID conditions and to present different chromatographic separation methods, in order to contribute for the correct identification of this toxin by LC–MS/MS.

In this regard, four different culture samples were used: *A. lemmermannii* strain PH-160 B and *A. oumiana* strains ITEP-024, ITEP-025 and ITEP-026. All these strains were already characterized by their strong inhibitory capacity on the AChE activity test. In the case of strain PH-160 B, the presence of anatoxin-a(s) was definitively confirmed by different spectroscopic methods (Onodera et al., 1997). Regarding the ITEP strains, the presence of this toxin was only confirmed in ITEP-024 (Molica et al., 2005).

The extraction protocol used in this study was a modification of the method reported by Henriksen et al. (1997). After extraction and clean-up in C18 cartridges, eluates were dried and resuspended in methanol. This last step was important to reduce the amount of matrix contaminants in solution since a considerable amount of insoluble material remained in the test tube, while anatoxin-a(s) was dissolved. LC–MS chromatograms obtained in this way showed less contaminant peaks if compared with those obtained when aqueous solutions were used to resuspend eluates. Further solubilization of methanol-insoluble material in water and analysis showed that no significant amount of the toxin remained in the solid precipitate (data not shown).

As expected, extracts from the four culture samples were able to inhibit acetylthiocoline hydrolysis (Table 2) when tested according to Worek et al. (1999). Although this test employs whole blood and the activity of esterases other than AChE cannot be ruled out, the strong inhibition verified here is in accordance with the results from Henriksen et al. (1997) and Molica et al. (2005).

Once the presence of an anticholinesterasic agent was confirmed, crude extracts were analyzed by LC–MS/MS in two different equipments using electrospray in the positive mode as the ionization technique. Interestingly, mass spectra acquired from all four extracts showed an ion at m/z

Table 2

Acetylcholinesterase inhibition assay for culture strains of *A. lemmermannii* (PH-160 B) and *A. oumiana* (ITEP-024, ITEP-025 and ITEP-026).

Strain	Inhibition of AChE ^a (%)
PH-160 B	53
ITEP-024	88
ITEP-025	92
ITEP-026	94

^a Relative to control; samples were run in triplicate.

253 which is consistent with the expected $[M + H]^+$ ion of anatoxin-a(s). Considering the two basic moieties in the toxin structure (guanidine and dimethylamine portions), the protonation is believed to be easily accomplished under electrospray conditions.

In order to evaluate the fragmentation behavior of anatoxin-a(s) under standard CID conditions, the extract obtained from strain PH-160 B was employed. This strain is known to produce this toxin and was used as a positive control. On both triple-quadrupole and ion trap, isolation

and fragmentation of the $[M + H]^+$ ion at m/z 253 yielded mass spectra with the same few characteristic fragment ions (Fig. 2). However, care should be taken with ion trap instruments regarding the low mass cut-off, a well-known feature of this type of mass analyzer. The low mass cut-off implies that, under default settings for the majority of commercial equipments, product ions with m/z values less than 25–30% of the precursor ion m/z will not be observed in the MS/MS spectrum (Cunningham et al., 2006). Strictly speaking of anatoxin-a(s), product ions below m/z 68 will

Fig. 2. ESI-MS/MS spectra of anatoxin-a(s) in the positive mode. (I) Triple-quadrupole mass spectrum; (II) ion trap spectrum with default low mass cut-off (27%); and (III) ion trap spectrum with low mass cut-off set at 20%, showing product ion at m/z 58.

not be observed in MS/MS spectra acquired under default conditions in the Esquire HCT, since the cut-off value is set to 27% (Fig. 2-II). Therefore, in order to observe an important characteristic product ion of anatoxin-a(s) at m/z 58, the cut-off value must be changed to at least 20%, as can be seen in Fig. 2, panel III.

Further fragmentation experiments allowed us to propose the fragmentation pathway described on Scheme 1. As can be seen, the formation of product ions **B** (m/z 235) occurs through the charge-assisted loss of water from the methylphosphate moiety. Additional fragmentation analysis on this ion was not possible due to its low intensity. The product ions **C** at m/z 159 can be rationalized by the neutral elimination of a methyl phosphenate residue (CH_3PO_3) from protonated anatoxin-a(s). Subsequent isolation and fragmentation of these ions afforded the diagnostic ions **G**

Scheme 1. Proposed fragmentation pathways for anatoxin-a(s) under CID conditions.

at m/z 58 through a charge-assisted mechanism (Scheme 1, Fig. 3-I). The same iminium ion [$\text{CH}_2=\text{N}(\text{CH}_3)_2$] was described from the ESI-CID spectra of *N,N*-dimethyltryptamine by Brandt et al. (2005), showing that the formation of iminium ions from substituted alkylamines is a characteristic feature. Interesting, ions **G** are the base peak ions and can be originated from ions **A**, **C** or **D** (Scheme 1). The last (ions **D**; m/z 141) are thought to be formed by the elimination of the whole methylphosphate moiety from the protonated toxin, in a charge-independent mechanism. Further fragmentation experiments on ions **D** (m/z 141) revealed three distinct fragmentation routes leading to ions **E**, **F** and **G** (Fig. 3-II). The neutral elimination of $\text{CH}_2=\text{NCH}_3$ from ions **D** affords ions **E** at m/z 98, and the ring opening with dimethylamine elimination yields ions **F** at m/z 96. Although MS/MS data are consistent with the structure of anatoxin-a(s), high resolution mass spectrometry experiments are in course to confirm the proposed fragmentation scheme.

Based on data discussed above, the ion transitions recommended for anatoxin-a(s) screening using electrospray-tandem mass spectrometry experiments are $253 > 58$, $253 > 159$, $235 > 98$ and $235 > 96$. The first transition can be considered as a quantitation transition due to the intense, stable and characteristic nature of the product ion at m/z 58. The other transitions are less intense but still characteristic, being considered good qualifier ions. Although these transitions are stable product ions in the MS/MS spectra of anatoxin-a(s), the relative intensity of these fragments may vary according to the settings used in the mass spectrometer. Therefore, the monitoring of these four transitions in screening experiments using LC-MS/MS is strongly recommended.

Different stationary phases were tested for chromatography, including both RP and HILIC columns. The Fig. 4-I shows a typical chromatogram obtained with standard silica based C18 column after injection of extract PH-160 B. As can be noted, anatoxin-a(s) is poorly retained even with very low organic modifier content in the mobile phase. Since the chromatographic peak is very close to the solvent front, early eluting matrix compounds might cause ion suppression and interfere with toxin determination. To minimize possible matrix effects, an improved chromatographic separation should be performed. Considering the polar nature of anatoxin-a(s), hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) would be a well-suited separation technique. Indeed, good retention was obtained with a bare silica column eluted with an aqueous-organic mobile phase (Fig. 4-II). In this method, anatoxin-a(s) was well separated from other contaminants. Isocratic chromatographic conditions and good separation are well suited for scale up, providing an interesting option for toxin purification. The use of bare silica columns in the HILIC mode was recently reviewed by Ikegami et al. (2008).

Alternatively, a ZIC-HILIC column was tested. This column is packed with sulfoalkylbetaine-modified silica and is able to separate anionic and cationic species simultaneously due to its zwitterionic structure. As can be seen in Fig. 4-III, a good peak profile was obtained with a relatively short retention time. This better peak shape is reflected in a higher signal-to-noise ratio, allowing the

Fig. 3. ESI-MS/MS/MS spectra of anatoxin-a(s) in the positive mode. (I) 253 > 159 and (II) 253 > 141.

detection of lower quantities of the toxin if compared with the former methods (data not show).

Considering the data discussed above, the ZIC-HILIC method was selected to analyze the extracts from the different cultured strains. The chromatograms obtained in this way are depicted in Fig. 5. It can be noted that all ITEP

samples showed a intense chromatographic peak around 6.5 min, in the same way as the reference sample PH-160 B. Interestingly, the relative intensities of the monitored transitions are the same in all chromatograms, being the transition 253 > 58 by far the most intense, followed by transition 253 > 159. Together with the inhibition of acetylthiocholine

Fig. 4. ESI-ion trap chromatograms obtained with different separation conditions for extract PH-160 B. Three most intense transitions are shown (253 > 58; 253 > 159; 253 > 98); (I) reversed-phase mode with C18 column; (II) HILIC mode with bare silica column; and (III) HILIC mode with ZIC-HILIC column.

Fig. 5. ESI-triple-quadrupole chromatograms obtained using ZIC-HILIC column showing the recommended transitions for anatoxin-a(s) screening. The toxin could be detected in all analyzed samples.

hydrolysis, these results confirm for the first time the presence of anatoxin-a(s) in strains of *A. oumiana* ITEP-025 and ITEP-026. On the other hand, these relative intensities are similar to those obtained with the ion trap instrument (see Fig. 4-III) and emphasize the importance of changing the low mass cut-off value in the last to obtain comparable chromatograms.

In conclusion, the fragmentation behavior of anatoxin-a(s) under standard CID conditions was presented for the first time and new separation methods were shown. The applicability of one these methods, employing a ZIC-HILIC

column, was further demonstrated by confirming the production of this toxin by strains of *A. oumiana* ITEP-025 and ITEP-026. Considering no standard solutions are commercially available, our results will be of significant use for the correct identification of this toxin by LC-MS/MS.

Acknowledgement

This work was supported by the Brazilian research funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo

a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Brandt, S.D., Freeman, S., Fleet, I.A., McGagh, P., Alder, J.F., 2005. Analytical chemistry of synthetic routes to psychoactive tryptamines. Part II. Characterisation of the Speeter and Anthony synthetic route to *N,N*-dialkylated tryptamines using GC–EI–ITMS, ESI–TQ–MS–MS and NMR. *Analyst* 130 (3), 330–344.
- Carmichael, W.W., Gorham, P.R., 1978. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. *Mitteilungen – Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 21, 285–295.
- Cook, W.O., Beasley, V.R., Dahlem, A.M., Dellinger, J.A., Harlin, K.S., Carmichael, W.W., 1988. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse-brain cholinesterase activity. *Toxicon* 26 (8), 750–753.
- Cook, W.O., Dellinger, J.A., Singh, S.S., Dahlem, A.M., Carmichael, W.W., Beasley, V.R., 1989a. Regional brain cholinesterase activity in rats injected intraperitoneally with anatoxin-a(s) or paraoxon. *Toxicol. Lett.* 49 (1), 29–34.
- Cook, W.O., Beasley, V.R., Lovell, R.A., Dahlem, A.M., Hooser, S.B., Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1989b. Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the fresh-water cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* – studies of ducks, swine, mice and a steer. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 (10), 915–922.
- Cunningham, J.C., Glish, G.L., Burinsky, D.J., 2006. High amplitude short time excitation: a method to form and detect low mass product ions in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (1), 81–84.
- Devic, E., Li, D.H., Dauta, A., Henriksen, P., Codd, G.A., Marty, J.L., Fournier, D., 2002. Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (8), 4102–4106.
- Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (1), 7–17.
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J.S., Moestrup, O., 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of Cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 35 (6), 901–913.
- Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., Luckas, B., 2007. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 42 (9), 1238–1250.
- Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N., 2008. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1184 (1–2), 474–503.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the fresh-water cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 24 (5), 425–434.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1987a. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25 (11), 1221–1227.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1987b. Anatoxin-a(s), an irreversible anticholinesterase from the blue-green algae *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25 (2), 148.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., Pfahler, D., 1988. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. *Am. J. Vet. Res.* 49 (4), 500–503.
- Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W., 1989. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111 (20), 8021–8023.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.C., Costa, A., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4 (4), 743–753.
- Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P., Yasumoto, T., 1997. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 35 (11), 1645–1648.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, pp. 41–110.
- Werner, V.R., Laughinghouse IV, H.D., 2009. Bloom-forming and other planktonic *Anabaena* (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Nova Hedwigia* 89 (1–2), 17–47.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 288 (1–2), 73–90.

9.2.3 Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil)

Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil)

Viviane Moschini-Carlos^{1,*}, Stella Bortoli³, Ernani Pinto³, Paula Yuri Nishimura², Leandro Gomes de Freitas¹, Marcelo L. M. Pompêo², and Felipe Dörr³

¹ São Paulo State University-UNESP, Department of Environmental Engineering, 3 de Março Avenue n. 511, PO Box: 18087-180, Sorocaba, São Paulo State, Brazil.

² University of São Paulo, Institute of Biociências, Department of Ecology, Rua do Matão, Trav. 14, nº 321, PO Box 05508-900, São Paulo-SP, Brazil

³ University of São Paulo, Laboratory of Toxin and Algae Natural Products, School Pharmaceutical Sciences, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, PO Box 05508-900, São Paulo-SP, Brazil.

* Corresponding author: viviane@sorocaba.unesp.br

Received: 19/12/08

Accepted: 7/9/09

ABSTRACT

Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil)

The Billings Complex and the Guarapiranga System are important strategic reservoirs for the city of São Paulo and surrounding areas because the water is used, among other things, for the public water supply. They produce 19,000 liters of water per second and supply water to 5.4 million people. Crude water is transferred from the Taquacetuba branch of the Billings Complex to the Guarapiranga Reservoir to regulate the water level of the reservoir. The objective of this study was to evaluate the water quality in the Taquacetuba branch, focusing on cyanobacteria and cyanotoxins. Surface water samples were collected in February (summer) and July (winter) of 2007. Analyses were conducted of physical, chemical, and biological variables of the water, cyanobacteria richness and density, and the presence of cyanotoxins. The water was classified as eutrophic-hypereutrophic. Cyanobacteria blooms were observed in both collection periods. The cyanobacteria bloom was most significant in July, reflecting lower water transparency and higher levels of total solids, suspended organic matter, chlorophyll-a, and cyanobacteria density in the surface water. Low richness and elevated dominance of the cyanobacteria were found in both periods. *Cylindropermopsis raciborskii* was dominant in February, with 352 661.0 cel mL⁻¹, and *Microcystis panniformis* was dominant in July, with 1 866 725.0 cel mL⁻¹. Three variants of microcystin were found in February (MC-RR, MC-LR, MC-YR), as well as saxitoxin. The same variants of microcystin were found in July, but no saxitoxin was detected. Anatoxin-a and cylindropermopsin were not detected in either period. These findings are of great concern because the water in the Taquacetuba branch, which is transferred into the Guarapiranga Reservoir, is not treated nor managed. It is recommended that monitoring be intensified and more effective measures be taken by the responsible agencies to prevent the process of eutrophication and the consequent development of the cyanobacteria and their toxins.

Key words: Reservoirs, eutrophication, cyanobacteria, cyanotoxins.

RESUMEN

Cianobacterias y Cianotoxinas en el Embalse Billings (São Paulo, Brasil)

El Complejo Billings y el Sistema Guarapiranga son embalses estratégicos importantes para la ciudad de São Paulo (Brasil) y áreas circundantes porque, entre otras cosas, el agua es utilizada para el abastecimiento público. Este sistema produce 19 mil litros de agua por segundo, que es suministrado a 5.4 millones de personas. El agua bruta es transferida por el afluente Taquacetuba desde el Complejo Billings hacia el Embalse Guarapiranga, para regular el nivel de agua del embalse. El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad del agua en el tramo del Taquacetuba, teniendo como foco las cianobacterias y cianotoxinas. El muestreo de agua bruta superficial fue realizado en febrero (verano) y julio (invierno 2007). Fueron analizadas variables físicas, químicas y biológicas, cianobacteria, riqueza, densidad y la presencia de cianotoxinas. El tramo fue clasificado como eutrófico-hipereutrófico. Las cianobacterias fueron observadas en ambos periodos de colecta. El crecimiento más

significativo de algas fue observado en julio, reflejando baja transparencia del agua y niveles más altos en el agua superficial de sólidos totales, materia orgánica, clorofila-a y densidad de cianobacterias en el agua superficial. Una baja riqueza y un elevado dominio de cianobacteria fueron encontrados en ambos períodos. *Cylindrospermopsis raciborskii* fue dominante en febrero, con $352\,661.0\text{ cel mL}^{-1}$, y *Microcystis panniformis* fue dominante en julio, con $1\,866\,725.0\text{ cel mL}^{-1}$. Tres variedades de microcistina fueron encontradas en febrero (MC-RR, MC-LR, MC-YR), así como saxitoxina. Las mismas variedades de microcistina fueron encontradas en julio, pero ninguna saxitoxina fue observada. Anatoxina-a y cylindropermopsina no fueron observadas en ningún período. Estas conclusiones son preocupantes porque el agua del tramo del Taquacetuba, que es transferida al Embalse Guarapiranga, no es tratada o manejada. Se recomienda intensificar el monitoreo y medidas más eficaces deben ser tomadas por parte de las agencias responsables para prevenir el proceso de eutrofización y el desarrollo consiguiente de cianobacterias y sus toxinas.

Palabras clave: Embalses, eutrofización, cianobacterias, cianotoxinas.

INTRODUCTION

Cyanobacteria blooms in reservoirs, resulting from the accelerated process of eutrophication, causes the water to have an unpleasant appearance, an increase in turbidity, and it changes the flavor and smell of the water. Some of the main effects due to cyanobacteria blooms comprise a decrease in water transparency, heavy fluctuation of oxygen levels and the release of toxins (Vasconcelos, 2006). Nowadays, cyanobacteria blooms and its toxins are the main problem related to the treatment of public supply water, which can lead to serious public health problems.

In Brazil, the number of cases of cyanobacteria blooms in reservoirs designated for public supply is increasing each year (Andrade, 2005; Azevedo & Vasconcelos, 2006; Chellappa & Costa, 2003; Komarek *et al.*, 2002; Sant'Anna & Azevedo, 2000; Tucci & Sant'anna, 2003; Yunes *et al.*, 2003). The most severe case of intoxication due to cyanobacterial toxin occurred in 1996 in Caruaru, Pernambuco State, when around 60 people died following treatment hemodialysis sessions done with not well-treated water from a reservoir which had shown cyanobacterial dominance in the previous years (Azevedo *et al.*, 1994).

Considering that urban reservoirs used for water supply in Brazil have been subjected to frequent cyanobacteria blooms due to several variables, such as ecological, physiological, and environmental, research in this area must be encouraged (Calijuri *et al.*, 2006). Therefore, the aim

of this study was to evaluate the water quality in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir, focusing on the cyanobacteria and cyanotoxins.

The Billings Reservoir (Fig. 1) is located west of the city of São Paulo at $23^{\circ}47'S$, $46^{\circ}40'W$, an altitude of 746 m a.s.l. and its watershed covers an area of 560 km². Its uses include leisure, fisheries, flow control, domestic and industrial wastewater reception, power generation, and water supply. The reservoir's limnological features changed substantially since 1940, when part of the polluted water from the Tietê River (São Paulo city) started to flow into the Billings Reservoir, aiming to increase the water flow and consequently, the electric power generation. This operation, along with the disorganized occupation of the watershed, contributed to increase the eutrophication and consequently, the cyanobacterial blooms (Beyruth & Pereira, 2002; Carvalho *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 1998).

Due to its peculiar shape, the Billings Reservoir is divided into eight units called branches. The Taquacetuba branch has a particular use. In August of 2000, the Basic Sanitation Company of the State of São Paulo (SABESP) began to operate a system of transporting crude water from the Taquacetuba branch to the Guarapiranga Reservoir, with a license for $2.0\text{ m}^3\text{ s}^{-1}$. Currently it operates at a volume of 3.0 to $4.0\text{ m}^3\text{ s}^{-1}$, contributing 29 % of the total water produced in the Guarapiranga Reservoir, which supplies water to southeastern São Paulo at a rate of $1.2\text{ billion L day}^{-1}$ (Whately & Cunha, 2006).

Figure 1. Location of the Billings Reservoir watershed (Taquacetuba branch), State of São Paulo, Brazil. *Localización del Embalse de Billings (rama de Taquacetuba), São Paulo, Brasil.*

Therefore, the study of the Taquacetuba branch's water quality along with the cyanobacteria community and its toxins, will contribute to understand the actual state of degradation of the water that is transferred into the Billings-Guarapiranga system, which are important strategic reservoirs for the São Paulo city and its surrounding areas, as they produce $19\,000\text{ L s}^{-1}$ of water to supply 5.4 million people.

METHODOLOGY

Surface water samples were collected in February (summer) and July (winter) of 2007. Analyses of dissolved oxygen, total and dis-

solved nutrients, suspended matter, total solids, chlorophylls *a*, *b*, and *c*, and phaeopigments (Table 1) were performed. Water transparency was also determined using a Secchi disk, as well as water temperature, electrical conductivity (values corrected to $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), and pH with YSI multi-parameter sensor, model 63/100 FT.

Classification of the trophic state of the bodies of water was carried out according to the Trophic State Index (TSI) (Carlson, 1977), modified by Toledo *et al.* (1983), as follows: oligotrophic $\text{TSI} < 44$; mesotrophic $44 < \text{TSI} < 54$; eutrophic $54 < \text{TSI} < 74$; hypertrophic $\text{TSI} > 74$.

Species composition was analyzed using a JENAVAL/ZEISS binocular microscope. Counting was carried out using the sedimentation method

Table 1. Variables analyzed and their respective detection limits (when applicable), unit, method, and reference. *Variables analizadas y sus límites de detección respectivos (cuando aplicable), unidad, método, y referencia.*

Variable	Detection limit of the method	Unit	Method	Reference
Total, organic, and inorganic suspended matter (TSM, OSM, ISM)		mg · L ⁻¹	Gravimetric	Wetzel & Likens (1991)
Total solids (TS)		mg · L ⁻¹	Gravimetric	
Total nitrogen (TN)	< 5.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Valderrama (1981)
Total phosphorous (TP)	< 10.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Valderrama (1981)
Nitrite (N – NO ₃ ⁻)	< 8.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Mackereth <i>et al.</i> (1978)
Nitrate (N – NO ₃ ⁻)	< 5.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Mackereth <i>et al.</i> (1978)
Dissolved ammonium (N – NH ₄ ⁺)	< 4.2	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Koroleff (1976)
Orthophosphate (Pi)	< 10.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Strickland & Parsons (1960)
Dissolved oxygen		mg · L ⁻¹	Titulometric	Golterman <i>et al.</i> (1978)
Chlorophyll <i>a, b, c</i> , phaeopigments		µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Jeffrey & Humphrey (1975), Lorenzen (1967), Strickland & Parsons (1960)

according Utermöhl. The number of chamber cells counted in each individual sample varied according to the species accumulation curve. To quantify cyanobacterial density in ind ml⁻¹, an individual was considered a filament, a trichome, a colony, a cenobium or a cell (for unicellular individuals). To quantify cyanobacterial density in cell ml⁻¹, the density based on ind ml⁻¹ was multiplied by the mean number of cells per individual (calculated for 30 individual specimens of each species).

For cyanotoxin analysis, water samples were centrifuged (5000 rpm, 10 min at 4°C) and the resulting pellet stored at –20 °C. Microcystin determination was carried out after sample clean-up, using solid phase extraction (SPE). Briefly, 100 mg of the pellet were re-suspended in 10 mL of water, vortexed for 15 s and subjected to an ultrasonic probe for 1 min in an ice bath. After centrifugation (5,000 rpm, 10 min at 4°C), the supernatant was loaded into a C18 cartridge (Sep-Pak, Waters) previously conditioned with MeOH (3 mL) and H₂O (3 mL). After the sequential washing with water (3 mL) and MeOH/H₂O 30 % (3 mL), toxins were eluted with MeOH (3 mL). The eluate was dried in a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 200 µL of MeOH for

LC-MSn Ion Trap analysis. The method proposed by Hiller *et al.*, 2007 was employed for saxitoxin, anatoxin-a and cilindrospermopsin analyses. Briefly, 100 mg of the pellet were re-suspended in 1 mL MeOH:Acetic acid 0.1 % (1:1), subjected to an ultrasonic bath for 30 min and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The resulting supernatant was filtered and analyzed.

RESULTS

Physical, chemical, and biological variables of the water

The physical, chemical, and biological variables of the water are shown in Table 2. The water temperature was higher in February (summer) than in July (winter), 25.2 °C and 19.5 °C, respectively. The water transparency was low in both periods. Electrical conductivity, pH, and dissolved oxygen were 145.1 µS cm⁻¹, 7.8 and 7.4 mg L⁻¹ in February, respectively, and 204.1 µS cm⁻¹, 7.6 and 6.2 mg L⁻¹ in July, respectively. Total nitrogen concentrations were high in both periods, measuring 473.6 µg L⁻¹ in February and

Table 2. Values for the physical, chemical, and biological variables of the water in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil) in February and July, 2007. *Valores de las variables físicas, químicas, y biológicas del agua en la rama de Taquacetuba del Embalse de Billings (São Paulo, Brasil) en febrero y julio de 2007.*

Variables	February	July
Water temperature (°C)	25.2	19.5
Secchi disc (m)	1.1	0.95
Electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	145.1	204.1
pH	7.8	7.6
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	7.4	6.2
Total solids (mg L^{-1})	114.0	339.5
Suspended particulate matter (mg L^{-1})	8.8	164.0
Suspended particulate organic matter (%)	88.7	95.1
Suspended particulate inorganic matter (%)	11.2	4.9
Total nitrogen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	473.6	431.6
Nitrate ($\mu\text{g L}^{-1}$)	336.8	288.9
Nitrite ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25.7	8.1
Ammonium ($\mu\text{g L}^{-1}$)	20.1	—
Total phosphorous ($\mu\text{g L}^{-1}$)	54.6	402.2
N:P ratios	19:1	2:1
Inorganic phosphorous ($\mu\text{g L}^{-1}$)	—	11.7
Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	33.2	867.0
Chlorophyll <i>b</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.9	586.4
Chlorophyll <i>c</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.3	29.9
Phaeophytin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12.0	310.0

—: below the detection limit of the method

431.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in July. Among dissolved nitrogen forms, nitrate levels were higher than nitrite and ammonium in both periods. Total phosphorous was considerably higher in July (402.2 $\mu\text{g L}^{-1}$) compared to February (54.6 $\mu\text{g L}^{-1}$). In February, inorganic phosphate was below the analytic method limit ($< 10 \mu\text{g L}^{-1}$), while levels in July were found to be 11.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Values of total solids, suspended particulate matter, and its organic fraction were much higher in July compared to those in February. Algae biomass, represented by concentrations of chlorophyll *a*, *b*, and *c* and phaeophytin and the density of cyanobacteria also followed this same pattern of higher values in July and lower values in February. This pattern was due to an increased cyanobacterial bloom in July.

Trophic state index

According to the Trophic State Index (TSI) for chlorophyll, the waters of the Taquacetuba branch were classified as eutrophic in both periods (February with TSI = 63 and July with TSI = 72), whereas according to the TSI for total phosphorous, they were classified as eutrophic in February (TSI = 57) and hypereutrophic (TSI = 83) in July.

Cyanobacteria composition and density

A total of 13 taxa of cyanobacteria were identified, 8 in February and 10 in July (Table 3). Higher densities of cyanobacteria were found in July (2 914 035.0 cel mL^{-1}) compared to Fe-

Table 3. Cyanobacteria taxa and densities in February and July, 2007, in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil). *Taxa de cianobacterias y densidades en febrero y julio de 2007, en la rama de Taquacetuba del Embalse de Billings (São Paulo, Brasil).*

Cyanobacteria taxa	Density (cel mL)	
	February	July
<i>Anabaena</i> sp.	0	1 328
<i>A. spiroides</i>	0	416 511
<i>Aphanocapsa</i> sp.	0	1 287
<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	6 240	0
<i>C. raciborskii</i>	352 661	9 082
<i>Merismopedia tenuissima</i>	12 849	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	14 053	68 840
<i>M. panniformis</i>	0	1 866 725
<i>Microcrocis</i> sp.	21 397	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	23 391	147 665
<i>Pseudanabaena</i> sp.	7 804	3 361
<i>P. galeata</i>	9 004	29 508
<i>Woronichinia naegeliana</i>	0	369 729
Total	447 399	2 914 035

bruary (447 399 cel mL⁻¹). In February, the taxa with higher densities were *Cylindrospermopsis raciborskii* (352 661 cel mL⁻¹), *Planktothrix agardhii* (23 391.0 cel mL⁻¹), *Microcrocis* sp (21 397 cel mL⁻¹), and *Microcystis aeruginosa* (14 053 cel mL⁻¹). In July, a high density of *Microcystis panniformis* was found (1 866 725 cel mL⁻¹), followed by *Anabaena spiroides* (416 511 cel mL⁻¹), *Woronichinia naegeliana* (369 729 cel mL⁻¹), *Planktothrix agardhii* (147 665 cel mL⁻¹), and *Microcystis aeruginosa* (68 840 cel mL⁻¹) (Table 4).

Cyanotoxin analyses

Microcystin analysis showed the presence of three different variants in both sampling periods, MC-RR, MC-LR and MC-YR, in different concentrations (Table 4). In February, three different microcystin variants were found (MC-RR, MC-LR and MC-YR) in concentrations ranging from 0.26-0.47 µg L⁻¹ (7.83-14.15 ng MC/µg Chl *a*).

Table 4. Results of the microcystin analysis in February and July, 2007, in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil). *Resultados de análisis microcystin en febrero y julio de 2007, en la rama de Taquacetuba del Embalse de Billings (São Paulo, Brasil).*

	µgMC L ⁻¹			ngMC µgChl <i>a</i> ⁻¹		
	MC-RR	MC-LR	MC-YR	MC-RR	MC-LR	MC-YR
February	0.47	0.28	0.26	14.15	8.43	7.83
July	0.55	0.57	0.29	0.64	0.66	0.33

In July, the same microcystin variants were found, ranging in concentration from 0.29-0.57 µg L⁻¹ (0.33-0.66 ng MC/µg Chl *a*).

Saxitoxin was detected only in February. Neither cylindrospermopsin nor anatoxin-a were detected in either of the samples.

DISCUSSION

Analyses of the physical, chemical, and biological variables of the water from the Taquacetuba branch in February (summer) and July (winter) revealed a marked seasonality.

In this study, the cyanobacterial bloom was more intense in July (winter) than in February (summer), reflecting major electrical conductivity, higher levels of total solids, suspended particulate matter, total phosphorus, chlorophyll *a, b, c*, phaeophytin, and cyanobacteria density. The dominance of cyanobacteria in nutrient-rich environments has been associated with a variety of factors. Environmental factors, such as low turbulence (Reynolds, 1987), low light (Smith, 1986), low ratio of euphotic zone to mixing zone (Jensen *et al.*, 1994), high temperature (Shapiro, 1990), low CO₂/high pH (Caraco & Miller, 1998), high total-P (Falconer, 2005; Watson *et al.*, 1997), low total-N (Smith, 1983), and phosphorus storage strategy (Pettersson *et al.*, 1993), have all been refereed to as being able to promote or allow cyanobacterial dominance.

According to Tilman's (1982) resource-ratio hypothesis, cyanobacterial dominance had also been attributed to low N:P ratios (Bulgakov & Levich, 1999; Hoyos *et al.*, 2004; Smith, 1983; Tilman *et al.*, 1986). Indeed, in this study, we observed higher cyanobacterial density in July,

when the N:P ratios were very low. According to Falconer (2005), phosphorus availability is a major determinant of growth rate for cyanobacteria and has a substantial effect on toxin production. However, this pattern was not reflected in a higher cyanotoxin production in July. It may suggest that environmental factors (water temperature and light, for instance) in this period didn't favor the production of toxins, despite of the more intense bloom. The irregularity of the toxicity of cyanobacteria is not yet defined (Carmichael, 1992). Environmental factors such as light, temperature, and nutrients have a large influence on the production of cyanotoxins.

Sant'Anna *et al.* (2007) yield a study of cyanobacteria biodiversity and distribution in reservoirs of the upper Tietê River, in which the Billings Reservoir is located. The authors concluded that within the results of the physical and chemical conditions of the reservoirs, Billings Reservoir proved to be the most favorable environment for the development of these organisms.

The abundance and persistent predominance of cyanobacteria species observed in this study are probably linked to the high levels of eutrophication in the Taquacetuba branch, as indicated by the TSI (eutrophic-hypereutrophic), which reflected elevated algae biomass, low water transparency, very high concentrations of nutrients (total nitrogen and phosphorous) and, consequently, seriously compromised the use of the water for the public's water supply, as well as other uses.

Sant'Anna & Azevedo (2000) and Komarek *et al.* (2002) reported cyanobacteria blooms in Brazil resulting from the increase in nutrients. According to Tucci & Sant'Anna (2003), *Cylindrospermopsis raciborskii* blooms have been increasingly frequent in Brazilian reservoirs because of its high competitiveness in eutrophic tropical environments. In an eutrophic reservoir in Rio Grande do Norte State with high concentrations of inorganic matter, reduced transparency, anoxic hypolimnion, and high electrical conductivity, Chellappa & Costa (2003) detected a large presence of cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Raphidiopsis curvata*, *Microcystis aeruginosa*, and *Oscillatoria* sp) in the dry season. Azevedo & Vasconcelos (2006) detected

toxic strains of cyanobacteria in bodies of water including reservoirs used for public water supply, artificial lakes, salt lakes, and rivers in the states of São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Bahia, and Pernambuco, and in the Federal District. At these locales, approximately 82 % of the strains isolated were found to be toxic, with 9.7 % being neurotoxic and the rest hepatotoxic. Minillo *et al.* (2000) detected the presence of microcystins in an estuary in Rio Grande do Sul, Lagoa dos Patos, in the summer and fall months. Carvalho *et al.* (2007) detected greater biodiversity of potentially toxic cyanobacteria in the Billings Reservoir compared to the Guarapiranga Reservoir. They found 67 % of the species collected in the Billings Reservoir to be potentially toxic and 50 % in the Guarapiranga Reservoir. Analyses of microcystin confirmed these results, as microcystin was detected in the Billings Reservoir throughout the entire study period, whereas in the Guarapiranga Reservoir, microcystin was only detected in the samples containing *Microcystis*.

Brazilian studies have shown that the most common toxic cyanobacteria blooms are those that produces microcystins and saxitoxin, the same toxins found in the Taquacetuba branch in this study (Molica & Azevedo, 2009).

Microcystins are produced by several cyanobacterial genera, such as *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Hapalosiphon*, and *Anabaenopsis* while saxitoxins are produced by *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, and *Cylindrospermopsis* (Chorus & Bartram, 1999). A *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in February, associated with the presence of saxitoxin, suggests the production of this toxin by this species, as already demonstrated in other freshwater environments in Brazil (Lagos *et al.*, 1999; Molica *et al.*, 2002). However, further research is necessary in order to confirm the origin of this toxin and to quantify it. The presence of microcystin in both periods was probably due to high densities of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* in February and *Microcystis panniformis* and also *Planktothrix agardhii* in July. A more intense bloom with higher cyanobacterial densities in July was related to higher microcystins concentrations in this period.

In an eutrophic Brazilian reservoir (Armando Ribeiro Gonçalves Reservoir, Rio Grande do Norte State), Costa *et al.* (2006) detected microcystins concentrations as high as $8.8 \mu\text{g L}^{-1}$. Andrade (2005) found lower concentrations of microcystins ($3.5 \mu\text{g L}^{-1}$) at the Guarapiranga Reservoir (São Paulo State) and Yunes *et al.* (2003) found much lower concentrations of this toxin ($0.03 \mu\text{g L}^{-1}$) in the Duro reservoir (Rio Grande do Sul State) and $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ of saxitoxin in the Taiaçupeba reservoir (São Paulo State). Most Brazilian reservoirs are in exceptionally good conditions for the development of toxic cyanobacteria: light availability, high temperatures, water column stability, high water retention time and high nutrient concentrations (N and P) (Fernandes *et al.*, 2009).

Cyanobacteria density during this study exceeded the levels for drinking water ($> 2 \cdot 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) recommended by the WHO-World Health Organization (Chorus & Bartram, 1999), and also the limit set by the Brazilian Health Ministry ($20 \cdot 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) (Brasil, 2004). Due to the high toxicity of microcystins, WHO established the value $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ as the maximum microcystin-LR concentration in drinking water (Chorus & Bartram, 1999).

Although water from Taquacetuba is not directly used for water supply, microcystin-LR level at $0.57 \mu\text{g L}^{-1}$ in July is a cause of concern because of the difficult removal of this toxin with conventional water treatment process (Lambert *et al.*, 1996). Additionally, raw water containing 1.01 and $1.41 \mu\text{g L}^{-1}$ of total microcystins in February and July, respectively, mean exposures to doses near the guideline value for the local population that uses the reservoir as a recreation site. This situation should be considered as a serious public health threat, since prolonged exposure to microcystins can lead to a higher incidence of liver cancer (Azevedo, 1998; Chorus & Bartram, 1999). Exposure of the local population through cyanotoxin accumulation in fish musculature must also be considered (Magalhães *et al.*, 2001).

The findings of the present study are of great concern. The water in the Taquacetuba branch is not treated nor managed, and it is channeled into the Guarapiranga Reservoir. Thus, it is recom-

mended that monitoring be intensified, and more effective measures be taken by the agencies responsible for the elimination of the causes of the eutrophication process and the consequent development of cyanobacteria and its toxins.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funded by: CNPQ (NUM. 475166/2006-6)-FAPESP (NUM. 0213376-4). FUNDUNESP: (NUM. 00675/08-DFP).

REFERENCES

- ANDRADE, A. A. S. 2005. *Análise da eficiência da várzea do Ribeirão Parelheiros na melhoria de qualidade das águas que afluem a represa do Guarapiranga*, São Paulo. Tesis Doctoral, EESC. University of São Paulo. 91 pp.
- AZEVEDO, S. M. F. O., W. R. EVANS, W. W. CARMICHAEL & M. NAMIKOSHI. 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 6: 261-5.
- AZEVEDO, S. M. F. O. 1998. Toxinas de cianobactérias: Causas e consequências para a saúde pública. *Medicina on line*, 3: 1-19.
- AZEVEDO, S. M. F. O. & V. VASCONCELOS. 2006. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. In: *Ecotoxicologia aquática. Princípios e Aplicações*. P. A. Zagatto & E. Bertolletti (Eds.): 433-452. Ed. Rima.
- BEYRUTH, Z. & H. A. D. S. L. PEREIRA. 2002. O isolamento do Rio Grande da represa Billings, São Paulo: Efeitos sobre o fitoplâncton durante um ciclo hidrológico completo. *B. Inst. Pesca*, 28: 111-123.
- BRASIL. 2004. Portaria 518, de 25 de março de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*. Brasília (DF).
- BULGAKOV, N. G. & A. P. LEVICH. 1999. The nitrogen:phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. *Arch. Hydrobiol.*, 146: 3-22.
- CALIJURI, M. C. C., M. S. A. ALVES & A. C. A. DOS SANTOS. 2006. *Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais*. 109 pp. Ed. Rima.

- CARACO, N. & R. MILLER. 1998. Factors influencing the abundance of blue-green algae in Florida lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1232-1237.
- CARMICHAEL, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-The Cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, 72: 445-459.
- CARVALHO, L. R., C. SANT'ANNA, M. C. P. GELMEGO & M. T. P. AZEVEDO. 2007. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga reservoir. *Revta. Brasil. Bot.*, 30(1): 141-148.
- CHELLAPPA, N. T. & M. A. M. COSTA. 2003. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica*, 24: S3-S10.
- CHORUS, I. & J. BARTRAM. 1999. *Toxic cyanobacteria in water-a guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, Spon Press, London.
- COSTA, I. A. S., S. M. F. O. AZEVEDO, P. A. C. SENNA, R. R. BERNARDO, S. M. COSTA & N. T. CHELLAPPA. 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.*, 66: 211-219.
- FALCONER, I. R. 2005. *Cyanobacterial toxins of drinking water supplies-cylindrospermopsins and microcystins*. CRC Press, U.S. 299 pp.
- FERNANDES, V. D. O., B. CAVATI, L. B. D. OLIVEIRA & B. D. Â. D. SOUZA. 2009. Ecologia de cianobactérias: Fatores promotores e consequências das florações. *Oecol. Bras.*, 13: 247-258.
- GOLTERMAN, H. L., R. S. CLYMO, & M. A. M. OHNSTAD. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*. Oxford. Blackwell Scientific Publications, I.B.P. Handbook. 1978.v. 8. 213 pp.
- HILLER, S., B. KROCK, A. CEMBELLA & B. LUCKAS. 2007. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 1238-1250.
- HOYOS, C., A. I. NEGRO & J. J. ALDASORO. 2004. Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during thermal stratification. *Limnetica*, 23: 119-132.
- JEFFREY, S. W. & G. F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Physiol. Pflanzen (BPP)*, 167: 191-194.
- JENSEN, J. P., E. JEPPESEN, K. OLRİK & P. KRISTENSEN. 1994. Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1692-1699.
- KOMAREK, J., J. KORMAKOVA-LEGNEROVA, C. L. SANT'ANNA, M. C. T. AZEVEDO & P. S. SENNA. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. Panniformis* sp. nov. *Cryptogamie. Algologie*, 23(2): 159-177.
- KOROLEFF, F. 1976. Determination of nutrients. In: *Methods of seawater analysis*. K. GRASSHOFF (ed.): 117-181. Verlag Chemie Weinheim.
- LAGOS, N., H. ONODERA, P. A. ZAGATTO, D. ANDRINOLO, S. M. F. Q. AZEVEDO & Y. OSHIMA. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 37: 1359-1373.
- LAMBERT, T. W., HOLMES, C. F. B. & HRUDEY, S. E. 1996. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Res.*, 30: 1411-1422.
- LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12: 343-346.
- MAGALHÃES, V. F., R. M. SOARES & S. M. F. O. AZEVEDO. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39: 1077-1085.
- MACKERETH, F. J. H., J. HERON. & J. F. TALLING. 1978. *Water analysis: some revised methods for limnologists*. Freshwater Biological Association. Scientific Association. n. 36. Titus Wilson & Son Ltda. Kendall. 117 pp.
- MINILLO, A., A. H. F. FERREIRA, G. T. YOGUI & J. S. YUNES. 2000. Concentrações de microcistinas e toxicidade na formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da lagoa dos Patos, RS. In: *Ecotoxicologia. Perspectivas para o Século XXI*. E.L.G. Espíndola, C.M.R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M.B.C. Bohrer, A.L. Oliveira-Neto (eds.): 521-536. São Carlos, Ed. Rima.
- MOLICA, R. & S. AZEVEDO. 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecol. Bras.*, 13: 229-246.
- MOLICA, R., H. ONODERA, C. GARCIA, M. RIVAS, D. ANDRINOLO, S. NASCIMENTO, H.

- MEGURO, Y. OSHIMA, S. AZEVEDO & N. LAGOS. 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, 41: 606-611.
- PETTERSSON, K., E. HERLITZ & V. ISTVÁNOVICS. 1993. The role of *Gloeothrichia echinulata* in transfer of phosphorus from sediments to water in lake Erken. *Hydrobiologia*, 253: 123-129.
- REYNOLDS, C. S. 1987. Cyanobacterial waterblooms. In: *Advances in botanical research*. Callow, J. (ed.): 67-143. Academic Press. London.
- SANT'ANNA, C. L., M. T. D. AZEVEDO. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, 71: 359-385.
- SANT'ANNA, C., S. M. SILVA, M. C. CARVALHO, M. C. P. GELMEGO & M. T. P. AZEVEDO. 2007. Planktic cyanobacteria from upper Tiête basin reservoir, SP, Brasil. *Revta. Brasil. Bot.*, 30: 1-17.
- SHAPIRO, J. 1990. Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Vehr. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 24: 38-54.
- SMITH, V. H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science*, 221: 669-671.
- SMITH, V. H. 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 48-153.
- SOUZA, R. C. R., M. C. CARVALHO & A. C. TRUZZI. 1998. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings reservoir, Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13: 73-81.
- STRICKLAND, J. D. & T. R. PARSONS. 1960. A manual of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board. Can.*, 125: 1-185.
- TILMAN, D., R. KIESLING, R. STERNER, S. S. KILHAM & F. A. JOHNSON. 1986. Green, blue green and diatom algae: Taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.*, 106: 473-485.
- TUCCI, A. & C. L. SANT'ANNA. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): Variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 26: 97-112.
- TOLEDO Jr., A. P. DE, N. TALARICO, S. J. CHINEZ & E. G. AGUDO. 1993. Aplicação de modelos simplificados para a avaliação de processo de eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. *Anais 12^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. CETESB: 1-34.
- TUCCI, A. & C. L. SANT'ANNA. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revta. Brasil. Bot.*, 26(1): 97-112.
- VASCONCELOS, V. 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: When ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25: 425-432.
- VALDERRAMA, J. C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.*, 10: 109-122.
- WATSON, S. B., E. MCCAULEY & J. A. DOWNING. 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 487-495.
- WHATELY, M. & P. CUNHA. 2006. *Seminário Guapiranga - Proposição de ações prioritárias para garantir água de boa qualidade para abastecimento público*. Instituto Socioambiental. São Paulo, 171 pp.
- WETZEL, R. G. & G.E. LIKENS. 1991. *Limnological Analyses*. 2nd ed. Springer-Verlag. 391 pp.
- YUNES, J. S., N. T. CUNHA, L. P. BARROS, L. A. O. PROENÇA & J. M. MONSERRAT. 2003. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. *Comments on Toxicology*, 9: 103-115.

9.2.4 Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays

Review

Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays

Felipe Augusto Dörr^a, Ernani Pinto^{a,*}, Raquel Moraes Soares^b,
Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo^b

^a Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Análise Integrada do Risco Ambiental (INAIRA), Av Professor Lineu Prestes, 580, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2009

Received in revised form

15 March 2010

Accepted 22 March 2010

Available online 1 April 2010

Keywords:

Microcystis

Microcystins

Bloom

Cyanobacteria

Brazil

South America

Harmful algal blooms (HAB)

ABSTRACT

The acute poisoning of chronic renal patients during hemodialysis sessions in 1996 in Caruaru City (Pernambuco State, Brazil) stimulated an intensive search for the cause of this severe complication. This search culminated in the identification of microcystins (MC), hepatotoxic cyclic heptapeptides produced by cyanobacteria, as the causative agents. More than ten years later, additional research data provides us with a better understanding of the factors related to cyanobacterial bloom occurrence and production of MC in Brazil and other South American countries. The contamination of water bodies and formation of toxic blooms remains a very serious concern, especially in countries in which surface water is used as the main source for human consumption. The purpose of this review is to highlight the discoveries of the past 15 years that have brought South American researchers to their current level of understanding of toxic cyanobacteria species and that have contributed to their knowledge of factors related to MC production, mechanisms of action and consequences for human health and the environment.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A possible consequence of anthropogenic pollution and the eutrophication of water bodies is the appearance of toxic algal red tide in oceans (e.g. dinoflagellates and diatoms) (Harvell et al., 1999; Van Dolah, 2000) and cyanobacterial blooms in freshwater (Landsberg, 2002). The presence of algae and cyanobacteria can result in decreased water quality, reflected in altered color, odor and taste, as well as in potential contamination by released toxins. As a consequence, water may become unsuitable for bathing and drinking, limiting its use for human

activities (Pitois et al., 2000). Moreover, through the food chain, some toxins and pollutants can accumulate in sea-food or freshwater fish to concentrations toxic to humans and animals (Ibelings and Chorus, 2007; Smith et al., 2008; Galvao et al., 2009; Martins and Vasconcelos, 2009). In this context, agencies and companies responsible for the production and distribution of potable water have constantly been challenged to improve purification processes to continue to provide safe drinking water for consumers (Hitzfeld et al., 2000; Svrcek and Smith, 2004; Schmidt et al., 2008).

Cyanotoxins represent a class of compounds that vary widely in chemical structure; they are often divided into three classes: cyclic peptides, alkaloids and lipopolysaccharides (van Apeldoorn et al., 2007). The structural diversity of the cyanotoxins is reflected in their mechanisms of toxicity;

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30911505; fax: +55 11 30319055.
E-mail address: ernani@usp.br (E. Pinto).

hepatotoxic, neurotoxic and dermatotoxic cyanotoxins, as well as cyanotoxins capable of inhibiting protein synthesis, have been described (Ohtani et al., 1992; Dawson, 1998; Carmichael, 2001; Wiegand and Pflugmacher, 2005; Chen et al., 2009a).

The most notable known occurrence of a harmful effect of cyanotoxins is sometimes referred to as “the Caruaru Incident”; this event represents the first confirmed case of human death caused by cyanotoxins. In early 1996, 130 chronic renal patients were poisoned during hemodialysis sessions in a clinic in Caruaru city in the state of Pernambuco, Brazil. Later, 70 patients died as a result of direct exposure to cyanotoxins (Jochimsen et al., 1998). Biological and chemical analyses confirmed the presence of microcystins (MC) and cylindrospermopsin in the activated carbon filter used in the clinic’s water purification system. MCs were also detected in samples of blood and liver tissue from the affected patients (Jochimsen et al., 1998; Carmichael et al., 2001; Azevedo et al., 2002). In a pioneer study by Chen et al. (2009a), microcystins were found to be transferred mainly from contaminated aquatic organisms to a human population (in China) through chronic exposure. They identified the presence of microcystins in serum samples (average 0.39 ng mL) and found positive relationships between MC serum concentration and major liver function biochemical indices, suggesting substantial hepatocellular damage.

Numerous cities in Brazil and in other South American countries use surface reservoirs, including lakes and rivers, as a main source of drinking water. In many cases, these water bodies are subjected to anthropogenic pollution and become eutrophicated ecosystems, showing recurrent cyanobacterial outbreaks. Some recent reports on toxic cyanobacterial blooms in South America partially reveal the extent of this problem and reaffirm it as an emerging concern to public health authorities (De Leon and Yunes, 2001; Azevedo et al., 2002; Frias et al., 2006; Echenique et al., 2008).

In the present review, South American toxic bloom episodes are discussed with special emphasis on the occurrence of MCs. The identification of toxic cyanobacterial species, methods for detection of MCs, determination of the mechanism of action of cyanotoxins, and consequences for human health and the environment are also commented.

2. Cyanobacterial blooms and production of toxins in South America

The cyanobacterial toxic bloom phenomenon is well-known in several countries. However, a lack of information exists with respect to South America, with very few official reports and/or published data for the majority of countries. Table 1 summarizes the occurrence of cyanobacterial blooms and the presence of toxins in South America.

In Argentina, according to Ringuelet et al. (1955), toxic cyanobacterial blooms have been observed since 1947. That pioneering paper described massive fish mortality caused by *Anabaena inaequalis*, *Anabaena circinalis* and *Polycystis flos-aquae* in a lagoon. In the past decades, several blooms have been observed in rivers, reservoirs, lakes, coastal lagoons and estuaries from North to South Argentina (25–55° S). *Microcystis* and *Anabaena* were the most common genera found. According to the literature, concern about public health risks is increasing in parallel with the increasing occurrence of cyanobacterial blooms (Scarafia et al., 1995; Ame et al., 2003; Conti et al., 2004). Contamination of fish and drinking water by MCs at levels above those considered safe (1 ng mL⁻¹) has already been described (Cazenave et al., 2005; Echenique et al., 2008). Fish and duck mortality was also reported during a *Microcystis* bloom in an urban recreational lake in Buenos Aires (Ehrenhaus and Vigna, 2006). Such events clearly show the challenges of controlling the mass development of toxic cyanobacteria.

There are reports of cyanobacterial blooms in Brazil during the 1980s. A review of data in the Brazilian literature on phytoplankton ecology that considered studies with databases maintained for at least one year showed that aquatic environments located in areas with anthropic influence presented a high percentage of bloom occurrences. Although some of these occurrences can be considered to be naturally occurring events, an increasing number of environments in which cyanobacteria represent the predominant species in the phytoplankton community are noticeable (Beyruth, 2000; Bittencourt-Oliveira et al., 2001; Magalhães et al., 2001; Bittencourt-Oliveira et al., 2005; Branco et al., 2006; Costa et al., 2006; dos Anjos et al., 2006; Bittencourt-Oliveira et al., 2009).

Table 1
Frequencies of occurrences of toxic cyanobacteria in South American freshwaters.

Country	Samples/species/method	MC analog	References
Argentina	Environmental samples from the San Roque Reservoir (Cordoba)/LC-MS	MC-LR and MC-RR	(Ame et al., 2003; Ame and Wunderlin, 2005; Cazenave et al., 2005)
Brazil	Cyanobacterial blooms and strains isolated from lakes/FAB-MS, LC-MS, MALDI-TOF	MC-LR, MC-LF, MC-RR, MC-YR, MC-AR, [Asp ³]-MC-LR, [Leu ¹]-MC-LR, MC-hRhR	(Azevedo et al., 1994; Carmichael et al., 2001; Bittencourt-Oliveira et al., 2005; Frias et al., 2006)
Chile	Cyanobacterial bloom, Lake Tres Pacualas, Concepcion/LC-MS	MC-RR, MC-FR, [Asp ³]-MC-LR and [Asp ³]-MC-YR	(Campos et al., 1999; Neumann et al., 2000)
Uruguay	Environmental samples from La Plata River/ELISA	Only positive using ELISA	(De Leon and Yunes, 2001; Scasso et al., 2001; Brena et al., 2006)

No official data or references (Web of Science® and Scifinder®) were found to prove the presence of microcystin in Colombia, French Guyana, Guyana, Paraguay, Peru, Suriname and Venezuela.

Outbreaks of cyanobacteria have been documented in 11 of the 26 Brazilian states, from the North to the South region. Although these outbreaks were commonly observed in artificial reservoirs, especially in the northeast part of the country, several coastal lagoons, natural lakes, rivers and estuaries were also affected. According to a review by Sant'Anna and Azevedo (2000), the most common genera encountered are *Microcystis* and *Anabaena*; an increased dominance of *Cylindrospermopsis* has been detected over the last decade (Huszar et al., 1998; Bouvy et al., 2000).

The isolation of toxic nanoplanktonic cyanobacteria (*Synechocystis aquatilis*) from coastal areas and toxic picoplanktonic cyanobacteria strains from reservoirs in the northeast region of Brazil define a new challenge for public health and water treatment authorities (Domingos et al., 1999; Komarek et al., 2002). Due to the very small size of these cells, their identification requires special care; removal by traditional methods of water treatment can be difficult. Therefore, the potential toxicity of these species must be considered and the risk of picoplanktonic cyanobacteria development in water supplies must be monitored to minimize the hazards of cyanotoxins.

The few existing reports of blooms of cyanobacteria in Colombia are mainly related to aquaculture activities in coastal lagoons, floodplain lakes and estuaries (Mancera and Vidal, 1994). There are also some reports of cyanobacterial blooms in recently constructed reservoirs. The main genera described are *Microcystis* and *Cylindrospermopsis*. These data represent information from the last decade; earlier reports are not available. Nevertheless, many personal communications from Colombian researchers describe cyanobacterial blooming as a well-known event in several places.

In Chile, the first reported cyanobacterial bloom occurred in 1995. It happened in a natural lake in the Concepción region, where another event was documented in 1998. In both cases, the main genus was *Microcystis* (Campos et al., 1999; Neumann et al., 2000).

In Uruguay, cyanobacterial blooms have been observed in rivers, reservoirs, lakes, coastal lagoons and estuaries (De Leon and Yunes, 2001; Scasso et al., 2001; Brena et al., 2006; Piccini et al., 2006; Chalar, 2009). These events are related to increased eutrophication and to changes in river hydrodynamics resulting from the construction of reservoirs in cascade, which interferes with water retention

time, favoring bloom formation. The most common genera are *Microcystis*, *Nodularia* and *Anabaena*.

There are few data on the occurrence of cyanobacterial blooms in Venezuela, and the events appear to be restricted to reservoirs and lakes. However, the early (1978) documented occurrence of these events in lakes and reservoirs used as the water supply for large cities, including Caracas and Valencia, show their important impact. The main genera reported are *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* and *Synechocystis* (Gardner et al., 1998; Gonzalez and Ortaz, 1998; Gonzalez, 2000; Gonzalez et al., 2002, 2004; Thunell et al., 2004).

The data presented above suggest that toxic cyanobacterial bloom events in South America are underestimated and that they are generally not widely noticed by the international scientific community. This may be attributed, at least in part, to deficient water monitoring programs in some countries and/or missing or unreported data in countries where such programs are carried out. However, despite the lack of official data, unpublished communications from these countries confirm the occurrence of toxic cyanobacterial blooms as an emerging concern to public health authorities.

3. Variants of microcystins found in South America

MCs are cyclic heptapeptides (Fig. 1) with molecular weights of approximately 1000 Da and the following general structure: cyclic (aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7), where aa1 = D-alanine, aa2 = variable L-amino acids (side chain, R₁), aa3 = D-erythro-β-methyl-aspartic acid (R₂ = CH₃) or D-aspartic acid (R₂ = H), aa4 = variable L-amino acids (side chain, R₃), aa5 = (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4(E),6(E)-dienoic acid (Adda), aa6 = D-glutamate acid and aa7 = N-methyl-dehydroalanine (Mdha – where R₄ = CH₃ and R₅ = H) or 2-amino-2-butenic acid (dehydrobutyrine – Dhb – where R₄ = H and R₅ = CH₃) or dehydroalanine (Dha, where R₄ and R₅ = H). With some rare exceptions, the amino acid Adda is part of the common structure of all MCs. The letters L and R of MC-LR correspond to the amino acids leucine (L) and arginine (R) in positions aa2 and aa4, respectively (Quilliam, 1999).

Variations in the chemical structure of MCs are very common and more than 70 different congeners have been characterized (Dawson, 1998; Quilliam, 1999; dos Anjos

Fig. 1. General structures of nodularins and microcystins. In the case of MC-LR, aa2 = leucine (L) (R₁ = side chain of leucine), R₂ = CH₃, aa4 = arginine (R) (R₃ = side chain of arginine), R₄ = CH₃ and R₅ = H.

et al., 2006; Kruger et al., 2009). Depending on their specific chemical structures, MC vary in toxicity from highly toxic to non-toxic, but most are toxic (Dawson, 1998). The most frequent variations detected are the replacement of the L-amino acids at positions aa2 and aa4 and the demethylation of the amino acids at positions R₂ and/or R₄ (Kruger et al., 2009).

In samples taken from Uruguayan water bodies during cyanobacterial bloom events, ELISA detection indicated the presence of MCs in samples from La Plata River and Lake Rodo (De Leon and Yunes, 2001; Scasso et al., 2001; Brena et al., 2006). However, no evidence on their specific structural identification is available.

In Argentina, recent experiments carried out using LC-MS-TOF with environmental samples from the San Roque Reservoir (Cordoba) showed the presence of MC-LR and MC-RR variants (Ame et al., 2003; Ame and Wunderlin, 2005; Cazenave et al., 2005).

A cyanobacterial bloom that occurred in 1998 in Lake Tres Pascualas (Concepcion/Chile) was found to contain the analogs MC-RR, MC-FR, [Asp³]-MC-LR and [Asp³]-MC-YR, as well as cyanopeptolins, another class of peptides frequently found in cyanobacteria (Neumann et al., 2000).

At least six MC variants were described in Brazil. MC-LR and the analog MC-LF were isolated and confirmed by RP-HPLC and fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) from a colony isolate (NPJB-1) of *Microcystis aeruginosa* collected from Lagoa das Garças, São Paulo (Azevedo et al., 1994). Concerning the incident in Caruaru City, the variants MC-LR, MC-YR and MC-AR were identified from blood sera and liver tissues of poisoned patients by HPLC-PDA, MALDI-TOF and ESI/MS (Carmichael et al., 2001). The demethylated variant [Asp³]-MC-LR was also identified in a strain of cyanobacteria isolated from Barra Bonita, a eutrophicated water reservoir in São Paulo state, Brazil (Bittencourt-Oliveira et al., 2005).

Two new variants were discovered in South America, specifically in Brazil. These included the analog [Leu¹]-MC-LR (Matthiensen et al., 2000; Schripsema and Dagnino, 2002), where aa1 = leucine, aa2 = leucine (L) (R₁ = side chain of leucine), R₂ = CH₃, aa4 = arginine (R) (R₃ = side chain of arginine), R₄ = CH₃ and R₅ = H (Fig. 1), and MC-hRhR, where aa1 = alanine, aa2 and aa4 = homoarginine (hR) (R₁ and R₃ = side chain of homoarginine), R₂ = CH₃, R₄ = CH₃ and R₅ = H (Frias et al., 2006).

Nodularins (Fig. 1) are cyclic pentapeptides that are usually produced by the genus *Nodularia*. These compounds are closely related to MCs in structure and mechanism of action. Although they are commonly found in northern Europe (Mazur-Marzec and Plinski, 2009), the presence of nodularins in South America has not been yet reported.

4. Strategies for the investigation of potential toxic cyanobacterial samples in South America

Several analytical methods for MC determination and identification have been reported in the literature; a detailed discussion of these methods is outside the scope of this article. Instead, the most commonly used methodologies in the South American context are

discussed. Comprehensive reviews can be found elsewhere (Hawkins et al., 2005; Msagati et al., 2006; Sangolkar et al., 2006).

Biological assays such as the mouse bioassay, phosphatase inhibition and particularly the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are widely used for screening and toxicity evaluation in many laboratories. In the mouse bioassay, samples are injected intraperitoneally and the toxic response, if any, is observed to identify the class of toxin involved. Although this test suffers from poor sensitivity and precision, it can provide information about general mammalian toxicity and is useful for toxicity evaluation of samples with unknown toxin composition. In addition, because it does not require expensive or complex equipment, this test is accessible to most laboratories in South America. However, restrictions on its use are increasing due to ethical concerns regarding animal bioassays.

Phosphatase inhibition assays are based on the capacity of MC to inhibit Type 1 and Type 2A protein phosphatases (Mackintosh et al., 1990). Although the amount of inhibition measured in the reaction can be related to toxin concentration (Ward et al., 1997; Heresztyn and Nicholson, 2001), this test is also sensitive to inhibitors other than MC, such as nodularin (An and Carmichael, 1994). Moreover, cyanobacterial material can show endogenous phosphatase activity, possibly leading to an underestimation of MC concentration (Sim and Mudge, 1993). Nevertheless, this method is simple, rapid and sensitive enough for use in evaluating the toxicity of water samples and bloom material (Matthiensen et al., 2000; Almeida et al., 2006).

Immunoassay procedures are extensively described in the literature as both screening and quantitative methods for determination of MCs. ELISA-type assays using polyclonal or monoclonal antibodies are well-established, sensitive and specific procedures (Nagata et al., 1999; Zeck et al., 2001; Metcalf et al., 2002; Sheng et al., 2006; Young et al., 2006) and are commercially available from different suppliers (Table 2). However, care should be taken when interpreting results because the cross-reactivity of antibodies is different for the wide variety of MC structural congeners (An and Carmichael, 1994; Mikhailov et al., 2001). Furthermore, results obtained using commercial kits can be susceptible to interference from various sources (Metcalf et al., 2000). Nonetheless, ELISA assays have been widely employed to detect MCs in raw water (Hirooka et al., 1999; Vieira et al., 2005), cyanobacterial material (Domingos et al., 1999; Sotero-Santos et al., 2008; Furtado et al., 2009), zooplankton (Ferrão et al., 2002), fish and crustaceans (Magalhães et al., 2001, 2003; Soares et al., 2004) and even human tissues (Hilborn et al., 2005, 2007; Soares et al., 2006).

Alternative assays either for biomonitoring cyanotoxins or to indicate genes involved in MC biosynthesis have also been proposed. For example, Ferrão-Filho et al. (2009) used native cladocerans to biomonitor toxins in Brazilian reservoirs. Although it has not been a proof of MC presence itself, Bittencourt-Oliveira (2003) detected potentially toxic strains of cyanobacteria using the polymerase chain reaction (PCR) to determine the presence of *mycB*, a gene in the operon that encodes an MC synthetase.

Table 2

Commercially available diagnostic test kits for microcystin, suppliers and mechanism of detection.

Kit	Supplier	Method/Mechanism of detection
Microcystin tube	Abraxis ^{®a} ; Enzo [®]	ELISA/Coated Tube Kit uses a polyclonal antibody that binds both microcystins and a microcystin-enzyme conjugate.
Microcystins – Adda	Abraxis [®] ; Enzo [®] ; Biosense [®]	ELISA/Based on the recognition of microcystins, nodularins and their congeners by specific antibodies against Adda. ^b
Microcystins-DM	Abraxis [®] ; Enzo [®]	ELISA/Direct competitive ELISA that allows the detection of microcystins and nodularins by using a monoclonal antibody.
Plate – strips	Beacon Analytical Systems Inc.; EnviroLogix [®] ; Strategic Diagnostics Inc.	ELISA/Coated plates/strips use antibody that binds microcystins
PP1 and PP2A protein phosphatases ^c	Sigma-Aldrich [®] ; Gibco [®] ; Calbiochem [®] ; Boehringer-Mannheim [®] , several others	Inhibition of the enzymes PP1 and PP2A enzyme/Colorimetric reaction monitored by a spectrophotometer or ³² P decay by β-scintillation spectrometry.

^a Only three examples from this company are shown here.^b Adda = (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4(E),6(E)-dienoic acid, the most common amino acid present in microcystins and nodularin.^c Although PP1 and PP2A protein phosphatases are available from several suppliers worldwide, the inhibition assay with microcystin is normally performed in-house (Carmichael and An, 1999).

The most common physicochemical methods of MC investigation are based on liquid chromatography coupled to different detection systems, such as UV absorption and mass spectrometry. Undoubtedly, HPLC-UV is the most widely used technique for MC quantification. Toxin congeners are usually separated on reversed-phase columns employing mobile phases that combine methanol or acetonitrile with acidified water or buffers. Further benefits are obtained when diode array detectors are used. In this case, the characteristic absorption spectrum of MC, i.e., between 190 and 300 nm with a maximum at 238 nm, is a valuable identification tool. On the other hand, this absorption profile is similar for the most commonly occurring variants, limiting the ability of the method to distinguish between them. Tryptophan-containing variants have an absorption maximum at 222 nm (Lawton et al., 1994; Moollan et al., 1996; Meriluoto, 1997; Spoof et al., 2001; Barco et al., 2005).

Methods based on mass spectrometric (MS) detection of cyanotoxins are extensively used due to their sensitivity, specificity and the possibility of providing structural information (Dahlmann et al., 2003; Meriluoto et al., 2004; McElhiney and Lawton, 2005; Dörr et al., 2008, 2010). MC is easily ionized by electrospray (ESI), the most common ionization technique, and mass spectra have different features depending on the amino acid residues present.

Single ($M + H$)⁺ and doubly charged ($M + 2H$)²⁺ ions are frequently observed in the positive mode, especially for variants containing basic arginine residues, such as MC-RR (Poon et al., 1993; Yuan et al., 1999a).

Important structural information can also be obtained by fragmentation of MC ions in collision-induced dissociation (CID) experiments. In this case, an invaluable diagnostic ion at m/z 135 is produced from all MCs containing the Adda residue (Yuan et al., 1999b) (Fig. 2). This ion has been used for quantitation of known variants in multiple reaction monitoring (MRM) experiments (Cong et al., 2006; Allis et al., 2007; Mekebri et al., 2009) and for screening of unknown MCs using precursor ion scan experiments (Hiller et al., 2007). Further structural characterization is possible using strategies that determine the amino acid composition of linear peptides, such as immonium ions and ions formed via b or y reactions (Bittencourt-Oliveira et al., 2005; Diehnelt et al., 2005, 2006; dos Anjos et al., 2006).

Another approach to the analysis of MCs in environmental samples is the detection of 3-methoxy-2-methyl-4-phenylbutanoic acid (MMPB), an oxidation product of the lateral chain of the amino acid Adda, via gas or liquid chromatography (Sano et al., 1992; Kaya and Sano, 1999; Tsuji et al., 2001; Ott and Carmichael, 2006). This method is especially well-suited to analysis of animal tissues and sediments where toxins are bound to matrix components

Fig. 2. Alpha-cleavage of aa5-Adda from microcystin-LR and formation of ion m/z 135, analyzed by ESI-MS positive mode.

such as proteins. After sample extraction and oxidation, all toxin variants containing the Adda moiety give rise to the same product (MMPB); hence, the total amount of MC is quantified. Recently, Wu et al. (2009) modified and improved this methodology.

All the methods briefly reviewed here are already in routine use in a limited number of laboratories throughout South America. However, the absence of reference laboratories to validate results and to provide reference material, as well as the requirement for sophisticated and expensive equipment and high levels of technical expertise, are the main limitations to improving our knowledge regarding MC occurrence in these countries.

Apart from the methods used for qualitative and quantitative toxin analysis, analytical standards are a key necessity. In this regard, the limited number of commercially available MC standards hampers further research development in this field. Regional efforts have been made to produce standards for local supply. In 2006, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), a Brazilian Federal Foundation for Science, issued a call for specific proposals on the investigation of cyanotoxins and the production of analytical standards (<http://www.cnpq.br/editais/ct/2006/docs/047.pdf>).

5. Microcystin exposure routes

Human health hazards resulting from cyanobacterial toxins mainly occur through three different exposure routes: direct contact, oral ingestion and inhalation (Chorus et al., 2000).

Oral ingestion is the most widely considered exposure route in risk assessment of cyanotoxins because the majority of documented health effects are related to water consumption (Carmichael, 1992; Dawson, 1998; Ito et al., 2000). However, potential intoxication through the food web must also be considered. It is well-known that there is a possible difference of MC accumulation among multiple vertebrate groups (i.e., fishes, turtle, domestic duck and water bird). Nasri et al. (2008) reported a case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. A recent study performed in the Lake Taihu in China reported for the first time MC contamination in domestic duck and identified high MC concentrations in the spleen of duck and water bird (Chen et al., 2009b). Previously, a study carried out in Egypt demonstrated that *Oreochromis niloticus* cultivated in a fish farm containing *Microcystis* bloom could have accumulated MC (Mohamed et al., 2003). The consumption of freshwater aquaculture products has increased significantly during the last two decades, and the bioaccumulation of cyanotoxins by a variety of aquatic organisms has already been confirmed by many authors (Ibelings et al., 2005; Xie et al., 2005; Ibelings and Chorus, 2007; Galvao et al., 2009). Very little is known about the toxicokinetics of MC after consumption of contaminated aquatic organisms, and no estimation of human exposure can presently be obtained in South America (Magalhães et al., 2001, 2003; Soares et al., 2004).

Recreational activities are another potential route of oral exposure to cyanotoxins and can represent a significant risk if age and frequency of exposure are considered. Reports of

skin irritation and allergies are common when recreational activities involve water bodies presenting cyanobacterial blooms, showing that direct contact is also an important exposure route (Falconer, 1999; Torokne et al., 2001). Indeed, some of these incidents were reported in Argentina and Brazil (Soares et al., 2007).

Inhalation is an exposure route not properly considered in some risk-assessment programs. When we consider that the toxicity of some cyanotoxins can be 10 or 100 times higher by this route when compared to oral exposure, it is clear that cyanotoxin inhalation by recreational and professional (labor) exposure represents an important risk for human health (Codd et al., 1999; Benson et al., 2005; Cheng et al., 2007).

The probability of acute poisoning by ingestion of water containing cyanotoxins is lower than that of poisoning caused by low-level prolonged exposure. However, much less is known about the health risks resulting from repeated low-level exposure as compared to those related to acute intoxication (Bouaicha et al., 2005; Grosse et al., 2006). Experimental data have shown that mice develop acute lung injury when exposed to MC-LR at sublethal doses. Both toxic *Microcystis* extract and pure MC-LR generate similar damage through intratracheal and intraperitoneal routes of exposure (Hooser, 2000). It was observed that MC-induced impairment of respiratory mechanics was caused mainly by an acute inflammatory process in the lungs (Picanço et al., 2004; Soares et al., 2007). Some *in vitro* experiments with human and rat neutrophils demonstrated that MCs may affect polymorphonuclear lymphocytes (PMN). MC variants can cause migration of neutrophils in a chemotaxis chamber, suggesting that PMNs may migrate from the bloodstream to organs that concentrate MCs, such as the liver. In addition, MCs may cause a dose-related increase in reactive oxygen species (ROS) production, as measured by chemiluminescence of PMN degranulation products that accompany ROS production. These findings suggest the possibility that PMNs may mediate some of the toxic effects of MCs (Kujbida et al., 2006, 2008, 2009). Considering some technical reports describing coastal lagoon and beach water contamination with cyanobacteria and MCs as regular events in Rio de Janeiro, a better understanding of respiratory damage related to exposure to aerosols containing MCs is of paramount importance.

6. Concluding remarks and future prospects

MCs display a broad spectrum of action that is not restricted to their hepatotoxic mechanism of phosphatase inhibition. Known MC variants are diverse not only in their species of origin but also in their functions and targets. Although peptides have been identified and characterized from only a few of the toxic cyanobacterial species found in South America, cyanobacterial bloom samples have shown the presence of several MC analogs. 10 MC variants were described in this review: MC-LR, MC-RR, MC-FR, MC-YR, MC-AR, MC-LF, MC-hRhR, [Asp³]-MC-LR, [Asp³]-MC-YR and [Leu¹]-MC-LR. Chronic and acute toxicological experiments have been carried out only for the most common variants. This highlights the research potential and public

health risks that lie dormant in South American water bodies.

The chemical synthesis of specific toxins can be important in the investigation of chronic exposure. However, because of the complexity of the chemical structure of cyanotoxins, this approach is economically not feasible. An understanding of the structure–function relationship of MCs is also important for the potential use of these toxins as drugs. There is a continuous need for new and improved pharmacological tools and a more precise understanding about the structure–function relationships of MCs. The production of recombinant MCs and the elucidation of the molecular basis of MC effects require more investigation; the development of better methods to screen and identify MCs in different biological and environmental samples is also essential. This will improve existing databases on toxic cyanobacterial blooms and enable easier comparison of toxins. In summary, toxins from cyanobacteria of South America should be further investigated because very little is known about their presence in surface water and their consequences for human health and the environment.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for research funding, fellowship and financial support.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest

References

- Allis, O., Dauphard, J., Hamilton, B., Shuilleabhain, A.N., Lehane, M., James, K.J., Furey, A., 2007. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry application for the determination of extracellular hepatotoxins in Irish lake and drinking waters. *Analytical Chemistry* 79 (9), 3436–3447.
- Almeida, V.P.S., Cogo, K., Tsai, S.M., Moon, D.H., 2006. Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37 (2), 192–198.
- Ame, M.V., Diaz, M.D., Wunderlin, D.A., 2003. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina): a field and chemometric study. *Environmental Toxicology* 18 (3), 192–201.
- Ame, M.V., Wunderlin, D.A., 2005. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. *Water Air and Soil Pollution* 168 (1–4), 235–248.
- An, J.S., Carmichael, W.W., 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32 (12), 1495–1507.
- Azevedo, S.M.F.O., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., 1994. 1st Report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 6 (3), 261–265.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181, 441–446.
- Barco, M., Lawton, L.A., Rivera, J., Caixach, J., 2005. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1074 (1–2), 23–30.
- Benson, J.M., Hutt, J.A., Rein, K., Boggs, S.E., Barr, E.B., Fleming, L.E., 2005. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. *Toxicon* 45 (6), 691–698.
- Beyruth, Z., 2000. Periodic disturbances, trophic gradient and phytoplankton characteristics related to cyanobacterial growth in Guarapiranga Reservoir, São Paulo State, Brazil. *Hydrobiologia* 424, 51–65.
- Bittencourt-Oliveira, M.D., 2003. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcylB molecular marker. *Harmful Algae* 2 (1), 51–60.
- Bittencourt-Oliveira, M.D., de Oliveira, M.C., Bolch, C.J.S., 2001. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *Journal of Phycology* 37 (5), 810–818.
- Bittencourt-Oliveira, M.D., Kujbida, P., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Moura, A.D., Colepicolo, P., Pinto, E., 2005. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komarek et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (3), 687–694.
- Bittencourt-Oliveira, M.D., Cunha, M.C.C., Moura, A.D., 2009. Genetic polymorphism in Brazilian *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) toxic and non-toxic through RFLP-PCR of the cpcBA-IGS. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (4), 901–909.
- Bouaicha, N., Maatouk, I., Plessis, M.J., Perin, F., 2005. Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Environmental Toxicology* 20 (3), 341–347.
- Bouvy, M., Falcao, D., Marinho, M., Pagano, M., Moura, A., 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 23 (1), 13–27.
- Branco, L.H.Z., Komarek, J., Azevedo, M.T.D., Sant'Anna, C.L., Watanabe, M., 2006. The cyanobacterial genus *Cyanoarbor* Wang (Chroococcales, Entophysalidaceae) and its occurrence in Brazil. *Nova Hedwigia* 82 (3–4), 365–380.
- Brena, B.M., Diaz, L., Sierra, D., Ferrari, G., Ferraz, N., Hellman, U., Gonzalez-Sapienza, G., Last, J.A., 2006. ITREOH building of regional capacity to monitor recreational water: development of a non-commercial microcystin ELISA and its impact on public health policy. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 12 (4), 377–385.
- Campos, V., Cantarero, S., Urrutia, H., Heinze, R., Wirsing, B., Neumann, U., Weckesser, J., 1999. Microcystin in cyanobacterial blooms in a Chilean lake. *Systematic and Applied Microbiology* 22 (2), 169–173.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72 (6), 445–459.
- Carmichael, W.W., 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABs”. *Human and Ecological Risk Assessment* 7 (5), 1393–1407.
- Carmichael, W.W., An, J., 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPiA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins* 7 (6), 377–385.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109 (7), 663–668.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.D.L., Ame, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* – a field and laboratory study. *Aquatic Toxicology* 75 (2), 178–190.
- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. *Limnologia* 39 (3), 200–208.
- Chen, J., Xie, P., Li, L., Xu, J., 2009a. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicological Sciences* 108 (1), 81–89.
- Chen, J., Zhang, D.W., Xie, P., Wang, Q., Ma, Z.M., 2009b. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Science of the Total Environment* 407 (10), 3317–3322.
- Cheng, Y.S., Zhou, Y., Irvin, C.M., Kirkpatrick, B., Backer, L.C., 2007. Characterization of aerosols containing microcystin. *Marine Drugs* 5 (4), 136–150.
- Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of*

- Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews 3 (4), 323–347.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A., Metcalf, J.S., 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology* 34 (4), 405–415.
- Cong, L.M., Huang, B.F., Chen, Q., Lu, B.Y., Zhang, J., Ren, Y.P., 2006. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 569 (1–2), 157–168.
- Conti, A.L.R., Guerrero, J.M., Regueira, J.M., 2004. Levels of microcystins in two Argentinean reservoirs used for water supply and recreation: differences in the implementation of safe levels. In: 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria. John Wiley & Sons Inc, Bergen, Norway, pp. 263–269.
- Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., Chellappa, N.T., 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 66 (1B), 211–219.
- Dahlmann, J., Budakowski, W.R., Luckas, B., 2003. Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *Journal of Chromatography A* 994 (1–2), 45–57.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7), 953–962.
- De Leon, L., Yunes, J.S., 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology* 16 (1), 110–112.
- Diehnelt, C.W., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate *m/z* measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (7), 622–634.
- Diehnelt, C.W., Dugan, N.R., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2006. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 78 (2), 501–512.
- Domingos, P., Rubim, T.K., Molica, R.J.R., Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W., 1999. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. *Environmental Toxicology* 14 (1), 31–35.
- Dörr, F.A., Tomaz, J.C., Lopes, N.P., Pinto, E., 2008. Comparative analysis of the gas-phase reactions of cylindrospermopsin and the difference in the alkali metal cation mobility. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (13), 2015–2020.
- Dörr, F.A., Rodriguez, V., Molica, R., Henriksen, P., Krock, B., Pinto, E., 2010. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Toxicon* 55 (1), 92–99.
- dos Anjos, F.M., Bittencourt-Oliveira, M.D., Zajac, M.P., Hiller, S., Christian, B., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., 2006. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon* 48 (3), 239–245.
- Echenique, R., Rodriguez, J., Mariela, C., Giannuzzi, L., Barco, M., Rivera, J., Caixach, J., Andrinolo, D., 2008. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Applied Phycology: Annals of the 11th Brazilian Phycology Congress and Latin-American Symposium on Harmful Algae* 30, 141–148.
- Ehrenhaus, C., Vigna, M.S., 2006. Changes in the phytoplankton of Lake Planetario after a restoration process. *Darwiniana* 44 (2), 319–328.
- Falconer, I.R., 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14 (1), 5–12.
- Ferrão, A.D., Kozłowsky-Suzuki, B., Azevedo, S.M.F.O., 2002. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology* 59 (3–4), 201–208.
- Ferrão-Filho, A.D., Soares, M.C.S., Magalhães, V.D., Azevedo, S.M.F.O., 2009. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2), 479–489.
- Frias, H.V., Mendes, M.A., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Tomazela, D., Colepicolo, P., Pinto, E., 2006. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344 (3), 741–746.
- Furtado, A., Calijuri, M.D., Lorenzi, A.S., Honda, R.Y., Genuario, D.B., Fiore, M.F., 2009. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* 627 (1), 195–209.
- Galvão, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, M.D., Gouvea-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P., 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicon* 54 (6), 891–894.
- Gardner, W.S., Cavaletto, J.F., Bootsma, H.A., Lavrentyev, P.J., Troncone, F., 1998. Nitrogen cycling rates and light effects in tropical Lake Maracaibo, Venezuela. *Limnology and Oceanography* 43 (8), 1814–1825.
- Gonzalez, E.J., 2000. Nutrient enrichment and zooplankton effects on the phytoplankton community in microcosms from El Andino reservoir (Venezuela). *Hydrobiologia* 434 (1–3), 81–96.
- Gonzalez, E.J., Ortaz, M., Matos, M.L., Mendoza, J., Penaherrera, C., Carrillo, V., 2002. Zooplankton from two neotropical reservoirs with different trophic states. *Interciencia* 27 (10), 551–558.
- Gonzalez, E.J., Ortaz, M., Penaherrera, C., Matos, M.L., 2004. Phytoplankton from a hypertrophic tropical reservoir (Pao-Cachinche, Venezuela): abundance, biomass and primary production. *Interciencia* 29 (10), 548–552.
- Gonzalez, E.J., Ortaz, M., 1998. Effects of N and P enrichment on the phytoplankton community under “microcosms” conditions in a tropical embayment (La Mariposa, Venezuela). *Revista De Biología Tropical* 46 (1), 27–34.
- Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Coglian, V., 2006. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncology* 7 (8), 628–629.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999. Review: marine ecology – emerging marine diseases – climate links and anthropogenic factors. *Science* 285 (5433), 1505–1510.
- Hawkins, P.R., Novic, S., Cox, P., Neilan, B.A., Burns, B.P., Shaw, G., Wickramasinghe, W., Peerapornpisal, Y., Ruangyuttikarn, W., Itayama, T., Saitou, T., Mizuuchi, M., Inamori, Y., 2005. A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 54 (8), 509–518.
- Hersztyn, T., Nicholson, B.C., 2001. A colorimetric protein phosphatase inhibition assay for the determination of cyanobacterial peptide hepatotoxins based on the dephosphorylation of phosphatidylcholine by recombinant protein phosphatase 1. *Environmental Toxicology* 16 (3), 242–252.
- Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.M.F.O., 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicon* 46 (2), 218–221.
- Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J.C., Barton, H.A., Azevedo, S.M.F.O., 2007. Serologic evaluation of human microcystin exposure. *Environmental Toxicology* 22 (5), 459–463.
- Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., Luckas, B., 2007. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 42 (9), 1238–1250.
- Hirooka, E.Y., Pinotti, M.H.P., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Ueno, Y., 1999. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. *Natural Toxins* 7 (3), 103–109.
- Hitzfeld, B.C., Hoger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108, 113–122.
- Hooser, S.B., 2000. Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following microcystin-LR administration to rats. *Toxicologic Pathology* 28 (5), 726–733.
- Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S., Marinho, M., Domingos, P., Sant’Anna, C.L., 1998. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. In: 11th Workshop of the International-Association-of-Phytoplankton-Taxonomy-and-Ecology (IAP), Shrewsbury, England, pp. 67–77.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environmental Pollution* 150 (1), 177–192.
- Ibelings, B.W., Bruning, K., de Jonge, J., Wolfstein, K., Pires, L.M.D., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology* 49 (4), 487–500.
- Ito, E., Kondo, F., Harada, K., 2000. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon* 38 (1), 37–48.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.D., de Melo, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after

- exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338 (13), 873–878.
- Kaya, K., Sano, T., 1999. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Analytica Chimica Acta* 386 (1–2), 107–112.
- Komarek, J., Komarkova-Legnerova, J., Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.D., Senna, P.A.C., 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie Algologie* 23 (2), 159–177.
- Kruger, T., Christian, B., Luckas, B., 2009. Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. *Toxicon* 54 (3), 302–312.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Colepicolo, P., Pinto, E., 2006. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341 (1), 273–277.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Curi, R., Farsky, S.H.P., Pinto, E., 2008. Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. *Toxicon* 51 (7), 1274–1280.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Vinolo, M.A.R., Waismam, K., Cavalcanti, D.M.D., Curi, R., Farsky, S.H.P., Pinto, E., 2009. Microcystins-LA, -YR, and -LR action on neutrophil migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382 (1), 9–14.
- Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10 (2), 113–390.
- Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Extraction and high-performance liquid-chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119 (7), 1525–1530.
- Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial Microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264 (2), 187–192.
- Magalhães, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39 (7), 1077–1085.
- Magalhães, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S.M.F.O., 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brazil, RJ). *Toxicon* 42 (3), 289–295.
- Mancera, J.E.P., Vidal, L.A.V., 1994. Florecimiento de microalgas relacionado con mortandad de peces en el complejo lagunar cienega grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta de Betín* 23, 103–117.
- Martins, J.C., Vasconcelos, V.M., 2009. Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 12 (1), 65–82.
- Matthiensen, A., Beattie, K.A., Yunes, J.S., Kaya, K., Codd, G.A., 2000. [p-Leu (1)]microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55 (5), 383–387.
- Mazur-Marzec, H., Plinski, M., 2009. Do toxic cyanobacteria blooms pose a threat to the Baltic ecosystem? *Oceanologia* 51 (3), 293–319.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 219–230.
- Mekebi, A., Blondina, G.J., Crane, D.B., 2009. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (15), 3147–3155.
- Meriluoto, J., 1997. Chromatography of microcystins. *Analytica Chimica Acta* 352 (1–3), 277–298.
- Meriluoto, J., Karlsson, K., Spoof, L., 2004. High-throughput screening of ten microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatographia* 59 (5–6), 291–298.
- Metcalfe, J.S., Hyenstrand, P., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *Journal of Applied Microbiology* 89 (3), 532–538.
- Metcalfe, J.S., Beattie, K.A., Ressler, J., Gerbersdorf, S., Pflugmacher, S., Codd, G.A., 2002. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 51 (3), 145–151.
- Mikhailov, A., Harmala-Brasken, A.S., Meriluoto, J., Sorokina, Y., Dietrich, D., Eriksson, J.E., 2001. Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine. *Toxicon* 39 (4), 477–483.
- Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A., 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environmental Toxicology* 18 (2), 137–141.
- Moollan, R.W., Rae, B., Verbeek, A., 1996. Some comments on the determination of microcystin toxins in waters by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 121 (2), 233–238.
- Msagati, T.A.M., Siame, B.A., Shushu, D.D., 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology* 78 (4), 382–397.
- Nagata, S., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Ueno, Y., 1999. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody. *Natural Toxins* 7 (2), 49–55.
- Nasri, H., El Herry, S., Bouaicha, N., 2008. First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2), 535–544.
- Neumann, U., Campos, V., Cantarero, S., Urrutia, H., Heinze, R., Weckesser, J., Erhard, M., 2000. Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of *Microcystis* sp from a Chilean Lake. *Systematic and Applied Microbiology* 23 (2), 191–197.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin – a potent hepatotoxin from the blue-green-alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society* 114 (20), 7941–7942.
- Ott, J.L., Carmichael, W.W., 2006. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicon* 47 (7), 734–741.
- Picanço, M.R., Soares, R.M., Cagido, V.R., Azevedo, S.M.F.O., Rocco, P.R.M., Zin, W.A., 2004. Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 (8), 1225–1229.
- Piccini, C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., Pernthaler, J., 2006. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (10), 6560–6568.
- Pitois, S., Jackson, M.H., Wood, B.J.B., 2000. Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters. *International Journal of Environmental Health Research* 10 (3), 203–218.
- Poon, G.K., Griggs, L.J., Edwards, C., Beattie, K.A., Codd, G.A., 1993. Liquid-chromatography electrospray ionization mass spectrometry of cyanobacterial toxins. *Journal of Chromatography* 628 (2), 215–233.
- Quilliam, M.A., 1999. Phycotoxins. *Journal of AOAC International* 82 (3), 773–781.
- Ringuellet, R.A., Oliver, S.R., Guarrera, S.A., Aramburu, R.H., 1955. Observaciones sobre antoplanton y mortandade de peces en laguna del monte (Buenos Aires, Republica Argentina). *Universidad Nacional de Eva Peron, Faculadade de Ciencias Naturales y Museo Notas del Museo – Tomo (XVIII)*.
- Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T., 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research* 40 (19), 3485–3496.
- Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., Kaya, K., 1992. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green-algae). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 49 (3), 163–170.
- Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.D., 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71 (3–4), 359–385.
- Scarafia, M.E., Agnese, A.M., Cabrera, J.L., 1995. *Microcystis aeruginosa*: behaviour and toxic features in San Roque Dam (Argentina). *Natural Toxins* 3 (2), 75–77.
- Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J., Fabian, D., Bonilla, S., 2001. Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* 11 (1), 31–44.
- Schmidt, W., Bornmann, K., Imhof, L., Mankiewicz, J., Izydorczyk, K., 2008. Assessing drinking water treatment systems for safety against cyanotoxin breakthrough using maximum tolerable values. *Environmental Toxicology* 23 (3), 337–345.
- Schripsema, J., Dagnino, D., 2002. Complete assignment of the NMR spectra of [p-Leu(1)]-microcystin-LR and analysis of its solution structure. *Magnetic Resonance in Chemistry* 40 (9), 614–617.
- Sheng, J.W., He, M., Shi, H.C., Qian, Y., 2006. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies. *Analytica Chimica Acta* 572 (2), 309–315.
- Sim, A.T.R., Mudge, L.M., 1993. Protein phosphatase activity in cyanobacteria: consequences for microcystin toxicity analysis. *Toxicon* 31 (9), 1179–1186.

- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V., 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280 (1–4), 5–20.
- Soares, R.M., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M.F.O., 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 70 (1), 1–10.
- Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J.C., Delgado, A., Magalhaes, V.F., Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology* 21 (2), 95–103.
- Soares, R.M., Cagido, V.R., Ferraro, R.B., Meyer-Fernandes, J.R., Rocco, P.R.M., Zin, W.A., Azevedo, S.M.F.O., 2007. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon* 50 (3), 330–338.
- Sotero-Santos, R.B., Carvalho, E.G., Dellamano-Oliveira, M.J., Rocha, O., 2008. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). *Harmful Algae* 7 (5), 590–598.
- Spoof, L., Karlsson, K., Meriluoto, J., 2001. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C-18 and amide C-16 sorbents. *Journal of Chromatography A* 909 (2), 225–236.
- Svrcek, C., Smith, D.W., 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3 (3), 155–185.
- Thunell, R.C., Sigman, D.M., Muller-Karger, F., Astor, Y., Varela, R., 2004. Nitrogen isotope dynamics of the Cariaco Basin, Venezuela. *Global Biogeochemical Cycles* 18 (3).
- Torokne, A., Palovics, A., Bankine, M., 2001. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria – experimental evidence. *Environmental Toxicology* 16 (6), 512–516.
- Tsuji, K., Masui, H., Uemura, H., Mori, Y., Harada, K., 2001. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicon* 39 (5), 687–692.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (1), 7–60.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives* 108, 133–141.
- Vieira, J.M.D., Azevedo, M.T.D., Azevedo, S., Honda, R.Y., Correa, B., 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45 (7), 901–909.
- Ward, C.J., Beattie, K.A., Lee, E.Y.C., Codd, G.A., 1997. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *FEMS Microbiology Letters* 153 (2), 465–473.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 201–218.
- Wu, X., Xiao, B., Li, R., Wang, Z., Chen, X., Chen, X., 2009. Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 651 (2), 241–247.
- Xie, L.Q., Xie, P., Guo, L.G., Li, L., Miyabara, Y., Park, H.D., 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology* 20 (3), 293–300.
- Young, F.M., Metcalf, J.S., Meriluoto, J.A.O., Spoof, L., Morrison, L.F., Codd, G.A., 2006. Production of antibodies against microcystin-RR for the assessment of purified microcystins and cyanobacterial environmental samples. *Toxicon* 48 (3), 295–306.
- Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Watanabe, M.F., Rinehart, K.L., 1999a. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and $[M + H](+)$ to $[M + Na](+)$ ratio. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10 (11), 1138–1151.
- Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Rinehart, K.L., Sivonen, K., Watanabe, M.F., 1999b. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34 (1), 33–43.
- Zeck, A., Weller, M.G., Bursill, D., Niessner, R., 2001. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst* 126 (11), 2002–2007.

9.2.5 Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization

Rapid Commun. Mass Spectrom. **2011**, *25*, 1981–1992
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.5083

Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization

Felipe Augusto Dörr¹, Diogo Oliveira-Silva², Norberto Pepporine Lopes³, Jacobo Iglesias⁴, Dietrich A. Volmer^{4*} and Ernani Pinto¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo–SP, Brazil

²Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, Diadema–SP, Brazil

³Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto–SP, Brazil

⁴Institut für Bioanalytische Chemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany

Microcystins (MC) are a family of hepatotoxic cyclic heptapeptides produced by a number of different cyanobacterial species. Considering the recent advances in the characterization of deprotonated peptides by mass spectrometry, the fragmentation behavior of four structurally related microcystin compounds was investigated using collision-induced dissociation (CID) experiments on an orbitrap mass spectrometer. It is demonstrated in this study that significant structural information can be obtained from the CID spectra of deprotonated microcystins. A predominant ring-opening reaction at the *iso*MeAsp residue, as well as two major complementary fragmentation pathways, was observed, reducing the complexity of the product ion spectra in comparison with spectra observed from protonated species. This proposed fragmentation behavior was applied to characterize [Leu¹]MC-LR from a cyanobacterial cell extract. In conclusion, CID spectra of microcystins in the negative ion mode provide rich structurally informative mass spectra which greatly enhance confidence in structural assignments, in particular when combined with complementary positive ion CID spectra. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Microcystins (MC) are cyclic heptapeptides produced by a number of different cyanobacterial species. These secondary metabolites are potent inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A.^[1] They have a significant harmful impact on wildlife and humans worldwide through poisoning and mortality, including the first documented case of human death caused by cyanotoxins.^[2]

Microcystins exhibit the general cyclic structure Ala-X-MeAsp-Z-Adda-Glu-Mdha, where Ala is alanine, X is a variable amino acid, MeAsp is erythro-3-methylaspartic acid, Z is a second variable amino acid, Adda is 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, Glu is glutamic acid and Mdha is *N*-methyldehydroalanine (Fig. 1). The variable amino acids X and Z determine the nomenclature of microcystins according to the single-letter code for amino acids. For example, MC-LR, the most commonly reported congener, contains leucine (L) and arginine (R) on positions 2 and 4, respectively.^[3] In addition to the usual amino acid substitutions at positions 2 and 4, modifications may be present in every other position of the structure, particularly for amino acids 3 and 7, where the absence of the methyl group in one or both positions has

been observed.^[4] Along with other less common substitutions, these modifications result in more than 80 variants of microcystins that have been observed until now.^[5]

The structural elucidation of microcystins has been achieved by a combination of different complementary analytical techniques, including chemical degradation and chiral amino acid analysis, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.^[4,6–9] The application of electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) has greatly enhanced the identification of new variants.^[10–13] Currently, positive mode ESI and collision-induced dissociation (CID) experiments are widely employed for the characterization of microcystins.^[14–16] Recently, Diehnelt *et al.* demonstrated^[17,18] the importance of measuring accurate masses and deducing elemental formulae for the assignment of tentative structures of microcystins. A systematic investigation of the fragmentation behavior of microcystins was also conducted by Mayumi *et al.*^[19] Using a shifting technique with structurally related variants, these authors successfully confirmed the discovery of new microcystins using low-resolution ion trap mass spectrometry.

Although ESI-MS/MS has clearly demonstrated its potential for tentative structural identification and confirmation of microcystins, several reports show, however, that unequivocal structural proof based solely on mass spectrometry is not possible.^[11,14,17] For example, Mayumi *et al.*^[19] were unable to confirm methylation on positions 1 or 2 in a variant of MC-LR, since no informative ions were formed from

* Correspondence to: D. A. Volmer, Universität des Saarlandes, Institut für Bioanalytische Chemie, Campus B2.2, D-66123 Saarbrücken, Germany.
E-mail: Dietrich.Volmer@mx.uni-saarland.de

Figure 1. Chemical structure of MC-LA showing the numbering of amino acids in the peptide cycle. Structure variations of other congeners are also shown.

cleavages between Ala and Leu. Structural assignments were also hindered by multiple ring-opening reactions, leading to the formation of several isobaric linear peptides with different amino acid sequences.^[20] A selective bond cleavage during the ring-opening process, however, would potentially reduce the complexity of the MS/MS spectra and facilitate structural elucidation and discovery of new variants.

In this context, it is interesting to consider the dissociation of cyclic peptide anions and assess their potential for the characterization of microcystins. It is well known that peptides containing Glu and Asp exhibit abundant and characteristic backbone cleavage reactions in the negative ion mode.^[21] For example, Brinkworth *et al.*^[21] demonstrated that these acidic residues directed so-called γ and δ cleavages, which made identifications of their positions in the peptide sequence readily possible. A subsequent study by Andreazza *et al.*^[22] showed that these fragmentation reactions are even more pronounced when the peptide anion contains *iso*Asp instead of Asp. Negative ion CID of peptides may also provide useful sequence information through so-called α and β backbone fragmentations, which are equivalent to the *b* and *y* + 2 cleavages seen for positive ions.^[23] In addition, very characteristic neutral loss reactions within the side chains of some amino acids have been observed. These reactions have no counterparts in the positive ion mode spectra. All these features have been comprehensively reviewed by Bowie *et al.*^[24] and Bilusich and Bowie.^[25] Relating this behavior to microcystins, it is unfortunate that very little information on the dissociation of microcystin anions can be found in the literature. As mentioned above, microcystins usually present MeAsp and Glu residues on positions 3 and 6 of the cyclic structure, respectively. Interestingly, these amino acids are connected to the peptide backbone through their side-chain acidic residues, forming *iso* linkages. It is therefore not surprising that the remaining free carboxylic acid groups are easily deprotonated to form intense anions under electrospray conditions, as reported by Yuan *et al.*^[26] An attempt to characterize these peptides as negative ions by in-source CID has been made by Kubwabo *et al.*^[15] However, no useful structural information was shown by the authors, and only unspecific neutral losses of water were observed. More recently, Ferranti *et al.*^[27] quantified the hydrophobic variants MC-LW and MC-LF found in an Italian lake by using sequential mass analysis of $[M-H]^-$ and $[M-H-H_2O]^-$ ions in

an ion trap instrument and demonstrated good detection sensitivity. Although multistep mass spectrometry experiments were performed, the authors offered no explanation for the identity of the structurally diagnostic product ions seen in the MS³ spectra. Nevertheless, they clearly demonstrated the practical use of the negative ion mode for the analysis of arginine-lacking congeners, the quantitation of which can be difficult in the positive mode, mainly due to the formation of metal adducts.^[28] It is evident, however, that deprotonated microcystins and their dissociation products have not received the same attention as positive ions and no systematic investigation on their fragmentation behavior has been published.

The present study systematically investigates the dissociation behavior of some important structurally related microcystins employing the ESI negative ion mode and high-resolution tandem mass spectrometry at different collision energies. It will be demonstrated that product ion spectra obtained in the negative ion mode offer valuable complementary structural information to aid the characterization of unknown microcystin variants or to confirm structure proposals.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Microcystin standards MC-LR, MC-YR, MC-RR and MC-LA were acquired as 10 μ g/mL methanolic solutions from Abraxis (Warminster, PA, USA). $[D\text{-Asp}^3, E\text{-Dhb}^7]\text{MC-RR}$ was obtained from Fluka (Seelze, Germany). $[\text{Leu}^1]\text{MC-LR}$ was achieved by in-house purification from a cultured strain of *M. aeruginosa*. Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker (Xalostoc, Mexico). EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA) supplied trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade). Purified water was obtained from a Direct-Q8 water purification system (Millipore, Milford, MA, USA).

Sample extraction

Lyophilized cell material (50 mg) from a culture of *Microcystis* was extracted twice with methanol/water 50:50 (v/v) in an ultrasonic bath. The combined supernatants were fractionated by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a Shimadzu Prominence instrument equipped with a diode-array detector and a fraction collector (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation was performed on a Luna C18(2) column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA) by gradient elution using water and acetonitrile as eluents, both containing 0.05% TFA.^[29] Putative microcystins peaks at 240 nm were collected and analyzed by direct infusion MS.

Mass spectrometry

Microcystin standards were analyzed by direct infusion using a chip-based ESI source (TriVersa NanoMate, Advion, Harlow, UK) coupled to an LTQ Orbitrap Velos hybrid Fourier-transform mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Multi-stage MSⁿ analyses were performed using the linear ion trap by low-energy CID as well as within the multipole collision cell adjacent to the C-trap by higher collisional dissociation (HCD). The collisional activation in the

linear ion trap corresponds to a resonance activation process whereas the HCD process is very similar to CID in the collision cell of a triple quadrupole mass spectrometer. CID experiments were performed using helium as collision gas and normalized collision energies between 30 and 35%, while HCD analyses employed nitrogen as collision gas and normalized collision energies between 65 and 75%. All the product ions were analyzed in the orbitrap mass analyzer at a resolving power setting of 100 000. Product ion spectra of [D-Asp³, E-Dhb⁷]MC-RR were also acquired by direct infusion into a quadrupole time-of-flight (QTOF) instrument (MicroTOF-QII, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) using argon as the collision gas. The collision offset voltage was varied between 12 and 18 V.

RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned in the Introduction, there has been a number of studies on the structural characterization of positive ions of microcystins in recent years,^[15–19,27] whereas the dissociation of negative ions has not often been investigated.^[15,26,27] To study the dissociation behavior of anions of microcystins for application to structural identification, we investigated four congeners in this study, namely MC-LR, MC-YR, MC-RR and MC-LA (Fig. 1).

Table 1 summarizes the results for the high-resolution, accurate mass measurements of the [M–H][–] anions. As can be seen from the table, all experiments exhibited accurate *m/z* measurements with mass uncertainties of <2 ppm relative error, thus readily allowing assignments of elemental compositions to all analyzed microcystins. The full-scan mass spectra also revealed the presence of doubly charged [M–2H]^{2–} ions for all variants. As pointed out by Yuan *et al.*,^[26] the charge state directly relates to the number of free carboxylic groups, providing information on the *iso*MeAsp³ and *iso*Glu⁶ residues. This simple observation is very helpful when characterizing variants where acidic groups are modified or when acidic amino acids are present in other positions of the structure.^[12]

The product ion spectra acquired in the linear ion trap (LIT) of the hybrid instrument used in this study were dominated by water loss reactions, even at high collision amplitudes as also observed by Kubwabo *et al.*^[15] (Fig. 2). These simple neutral loss reactions result from the selective resonance activation of

the precursor ion in the LIT and originate from characteristic side-chain fragmentations of Asp and Glu residues in the negative ion mode.^[24,25] However, a secondary signal corresponding to the neutral loss of 112 Da from the [M–H][–] precursor ion was also seen in the spectra of all investigated variants (Fig. 2). Scheme 1 shows our proposal for the ring-opening mechanism and the subsequent formation of the [M–H–112][–] ions. This mechanism is based on γ and δ backbone cleavages similar to those in spectra of peptides containing acidic Asp and *iso*Asp residues.^[21,22,24] These specific fragmentations are believed to be initiated by an enolate anion to produce an α,β -unsaturated system (Scheme 1, ions B and C).^[22] A classical neutral elimination (E₂) without the direct participation of the charge, however, may also occur (Scheme 1, ion A, pathway 1), selectively opening the peptide cyclic ring. We propose a subsequent nucleophilic attack from the carboxylate anion on the neighboring carbonyl group, which leads to neutral elimination of 3-methylfuran-2,5-dione and formation of the [M–H–112][–] ion (Scheme 1, ions D). It should be noted that the product ion spectra of [D-Asp³, E-Dhb⁷]MC-RR, a des-methylated variant in position 3, revealed the same ion at *m/z* 924 as MC-RR (Fig. 3). The respective neutral loss of 98 Da supports the proposed mechanisms, confirming that ring opening is taking place at amino acid 3. Accurate mass measurement data for these ions are presented in Table 2.

Interestingly, taking a linear peptide as an example, the sequential steps proposed here would generate product ions equivalent to those resulting from α backbone cleavage at the C-terminal end of *iso*Asp. As shown by Andreazza *et al.*,^[22] these product ions are observed in the negative ion CID spectra of Asp/*iso*Asp-containing linear peptides. These authors rationalized the formation of the ions through a regular α backbone cleavage, an energetically unfavorable mechanism as demonstrated by their theoretical calculations. The authors investigated only linear peptides and we believe that the sequential step proposed here also applies to Andreazza *et al.*'s investigation since the final product ions of both mechanisms are essentially the same. The proposal of E₂ or γ backbone fragmentations followed by neutral loss of 112 Da for MeAsp (or 98 Da for Asp) is only possible due to the cyclic structures of the microcystins, where the eliminated neutral part seen for linear peptides remains attached to the ion. Moreover, the ion series that originated from regular α backbone cleavages (Scheme 1, ions E) cannot be found in the

Table 1. Accurate mass data for deprotonated microcystin standards obtained with a LTQ Orbitrap following chip-based nanospray ionization

MC	Charge state	Observed <i>m/z</i>	Calculated <i>m/z</i>	Error (ppm)
MC-LR	[M–H] [–]	993.5408	993.5415	–0.7
	[M–2H] ^{2–}	496.2667	496.2671	–0.8
MC-YR	[M–H] [–]	1043.5188	1043.5208	–1.9
	[M–2H] ^{2–}	521.2560	521.2567	–1.4
MC-RR	[M–H] [–]	1036.5594	1036.5585	0.9
	[M–2H] ^{2–}	517.7753	517.7756	–0.7
MC-LA	[M–H] [–]	1043.5188	1043.5208	–1.9
	[M–2H] ^{2–}	521.2560	521.2567	–1.4

Figure 2. Negative ion product ion spectra of microcystins obtained by low-energy CID within a linear ion trap: (A) MC-LR; (B) MC-YR; (C) MC-RR; and (D) MC-LA.

Scheme 1. Proposed ring-opening fragmentation routes (gamma and E_2) and neutral elimination of *iso*MeAsp/*iso*Asp residues.

spectra of any of the investigated microcystin variants. In conclusion, we propose that α backbone cleavages observed in the CID spectra of Asp/*iso*Asp-containing linear peptides may be initiated by a γ fragmentation followed by neutral elimination of a stable maleic anhydride molecule. Theoretical calculations are currently underway to support the proposed reaction intermediates in these sequential events.

It is also well known that γ backbone fragmentations driven by Asp and *iso*Asp residues are followed by water elimination reactions.^[22,24] Therefore, selective ring opening at the *iso*MeAsp position followed by water elimination might additionally contribute to the intense $[M-H-H_2O]^-$ ions encountered in the negative ion product ion spectra of all microcystins. However, as will be discussed below, other

Figure 3. Negative ion product ion spectrum of [D-Asp³,E-Dhb⁷]MC-RR obtained in a QTOF instrument. Neutral loss of 98 Da is demonstrated.

Table 2. Accurate mass data for MS² product ion spectra of deprotonated microcystin standards obtained by low-energy CID within a linear ion trap (LTQ Orbitrap) following chip-based nanospray ionization

MC	Ion composition	Observed <i>m/z</i>	Calculated <i>m/z</i>	Error (ppm)
MC-LR	[M-H-H ₂ O] ⁻	975.5298	975.5309	-1.1
	[M-H-C ₅ H ₄ O ₃] ⁻	881.5248	881.5254	-0.7
MC-YR	[M-H-H ₂ O] ⁻	1025.5088	1025.5102	-1.4
	[M-H-C ₅ H ₄ O ₃] ⁻	931.5039	931.5047	-0.9
MC-RR	[M-H-H ₂ O] ⁻	1018.5465	1018.5479	-1.4
	[M-H-C ₅ H ₄ O ₃] ⁻	924.5415	924.5425	-1.1
MC-LA	[M-H-H ₂ O] ⁻	890.4664	890.4669	-0.6
	[M-H-C ₅ H ₄ O ₃] ⁻	796.4605	796.4615	-1.2

sequence-informative ions suggest the lateral chain of Glu as another source for water elimination. Overall, the selective ring opening at the *iso*MeAsp³ residue is supported by the predominant sequence-informative ions observed as shown below.

When the abundant [M-H-H₂O]⁻ ions are submitted to another stage of low-energy CID in the LIT, additional structurally diagnostic ions are generated. Figure 4 illustrates the MS³ spectra for all tested MC variants. The well-described amino acid side-chain fragmentations observed for peptides in the negative ion mode are seen for MC-LR, MC-YR, and especially MC-RR. All variants showed characteristic neutral losses of HN=C=NH (42 Da) from the guanidine portion of arginine, confirming the presence of this amino acid in the peptide structure. The base peak product ion for these congeners, however, corresponded to the neutral loss of ammonia (17 Da). Ammonia loss is normally attributed to the presence of Asn or Gln residues in peptides.^[24] Since none of the investigated structures contained these residues, the intense NH₃ losses must have originated from a different source. It should be noted that in the MS³ spectra of MC-LA, product ions from NH₃ loss or HN=C=NH elimination did not form the base peaks (Fig. 4, panel IV). Considering that MC-LA does not possess an arginine residue in its sequence, the lack of the [M-H-42]⁻ ion is expected. On the other hand, the negligible amount of

ammonia elimination suggests that this neutral loss originates from the lateral chain of arginine. Our results are consistent with those reported by Pu *et al.*,^[30] who observed abundant ammonia and HN=C=NH elimination when studying the effect of basic arginine residues on peptide fragmentation in the negative ion mode. They concluded that, in addition to these particular side-chain eliminations, the presence of basic residues has almost no effect on backbone fragmentation reactions. The observation of these characteristic side-chain neutral losses can therefore provide valuable information about the presence of specific amino acids. For example, Ser-containing peptides exhibit pronounced losses of CH₂O (30 Da) from their side chains.^[25] This feature should be readily visible in the negative ion product ion spectra of microcystins containing Ser, e.g. [MeSer⁷]MC-LR.^[18]

Additional interesting mass spectral sequence features can be found in the lower *m/z* range of the MS³ spectra in Fig. 4, indicated with the letters **B1** to **B4**. Structure assignments were accomplished by using a similar shifting technique as employed by Mayumi *et al.*,^[19] but additionally supported by high-resolution, accurate *m/z* data. The results from these experiments are summarized in Table 3, corroborating the proposed ring-opening mechanism discussed above. In the observed ion series, the predominant water elimination reactions occurred at the *iso*Glu residue in position 6. The

Figure 4. MS³ product ion spectra of deprotonated microcystins obtained by low-energy CID within a linear ion trap: (I) MC-LR; (II) MC-YR; (III) MC-RR; and (IV) MC-LA.

second CID step (MS³) of the [M-H-18][−] ions revealed the formation of the sequence-informative ions after ring opening at the *iso*MeAsp³ residue (Scheme 1). The linear peptide formed, the C-terminal amino acid of which is amidated, eliminates this residue, leading to **B1** ions. In fact, as seen in Fig. 4 and Table 3, **B1** ions from MC-LR, MC-RR and MC-YR exhibited the same accurate *m/z* values, showing that the variable amino acid at position 2 is eliminated. As expected, the **B1** ions from MC-LA are at *m/z* values 85 *m/z* units lower than those from the other variants due to the difference of alanine versus arginine at position 4. The results also show that the **B2**, **B3** and **B4** ions corresponded to the eliminations of Ala¹-Leu²-NH₂, Mdha⁷-Ala¹-Leu²-NH₂ and *iso*Glu⁶(-H₂O)-Mdha⁷-Ala¹-Leu²-NH₂, respectively, for MC-LR, MC-YR and

MC-RR. The corresponding ions for MC-LA (−85 Da) were also identified (Table 3, Fig. 4). Unfortunately, further ions in this series were not observed due to the low mass cut-off inherent to the ion trap mass analyzer used.

From a mechanistic point of view, this ion series is very intriguing. Peptide bond fragmentations in negative ion CID experiments are believed to occur via enolate anions. These ions are formed when a deprotonated moiety in the molecule abstracts a proton from the α carbon of an amino acid residue, leading to the peptide bond cleavage through so-called α or β backbone fragmentations.^[24] The entire process is described as a charge-directed mechanism. For microcystins, the Mdha residue in position 7 is unable to form an enolate anion because no proton is available for abstraction

Table 3. Accurate mass data for MS³ product ion spectra of deprotonated microcystin standards obtained by low-energy CID within a linear ion trap (LTQ Orbitrap) following chip-based nanospray ionization. The **B** ion series is depicted (refer to Scheme 1, ions **B**, for C₅H₄O₃)

	MC-LR			MC-YR			MC-RR			MC-LA		
	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)
[M-H-17] ⁻	958.5036	958.5044	-0.83	1008.4826	1008.4836	-0.99	1001.5191	1001.5197	-0.60	-	-	-
[M-H-42] ⁻	933.5083	933.5091	-0.86	983.4873	983.4884	-1.12	976.5246	976.5247	-0.10	-	-	-
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda-(Glu-H ₂ O)-Mdha-Ala] ⁻	845.4193	845.4203	-1.18	845.4192	845.4203	-1.30	845.4193	845.4203	-1.18	760.3557	760.3563	-0.8
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda-(Glu-H ₂ O)-Mdha] ⁻	774.3821	774.3832	-1.42	774.3821	774.3832	-1.42	774.3824	774.3832	-1.03	689.3185	689.3192	-1.0
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda-(Glu-H ₂ O)] ⁻	691.3453	691.3461	-1.16	691.3451	691.3461	-1.45	691.3455	691.3461	-0.87	606.2817	606.2821	-0.7
[C ₅ H ₄ O ₃ -Z-Adda] ⁻	580.3135	580.3141	-1.03	580.3133	580.314	-1.20	580.3134	580.3140	-1.03	495.2498	495.2501	-0.6

from the α carbon (see Scheme 1). Therefore, the bond cleavage between Mdha⁷ and Ala¹ is not expected to occur. Surprisingly, ions corresponding to this cleavage are abundant in product ion spectra of all variants (**B2** ions in Fig. 4). An alternative mechanism has been proposed by Harrison and co-workers,^[31–33] where peptide bond cleavages occur through the formation of oxazolone derivatives in a similar way to protonated peptides. The proposal of Harrison *et al.* is based on the deprotonation of the acidic amide NH groups. Unfortunately, this mechanism is not directly applicable to microcystins since the nitrogen atom in Mdha is methylated. Therefore, although ion structure assignments can be performed with confidence based on the shifting technique as well as accurate *m/z* measurements (Table 3), the underlying mechanisms for the formation of **B2** ions remain unclear. Further studies using synthetic model peptides and theoretical calculations are currently underway to shed further light on these mechanisms.

Closer inspection of Fig. 4 revealed another ion series, identified as **A2** to **A4**. Because of the low intensity of some of the observed product ions, additional experiments were carried out using the so-called 'higher energy CID' (HCD) collision cell of the orbitrap mass spectrometer. The HCD cell is essentially a standard collision cell comparable with those used in triple quadrupole mass spectrometers. The HCD process provides spectra with a larger variety of product ions than CID on the LIT instrument, in particular at lower *m/z* values. These differences can be readily explained by the different modes of collision activation in the two different regions; i.e. selective resonance activation of the precursor ion in the LIT versus non-selective multiple collision activation in the HCD cell, in addition to low-mass cut-off discrimination effects of the ion trap.^[34] Figure 5 illustrates the product ion spectra for [M-H]⁻ precursor ions for all MC variants. Very informative sequence information can be observed from a single stage of MS/MS. Combining the HCD results with those obtained from low-energy CID experiments on the LIT instrument allowed the sequencing of microcystins (Table 4 and proposed mechanisms in Scheme 2).

The **A1–A5** ion series is proposed to proceed through α cleavages after ring opening at *iso*MeAsp³, as already discussed (*vide supra*). **A1** ions can be formed by neutral elimination of 112 Da from [M-H]⁻ ions, as shown in Scheme 1. The subsequent elimination of the next amino acid at position 4 (**Z**) generates ions **A2** (see Scheme 2). This elimination reaction is based on the proton shift reaction described by Eckersley *et al.*^[35] **A2** ions can also be formed when H₂O elimination takes place on the *iso*MeAsp³ residue after ring opening. In this case, the simultaneous expulsion of **Z** + 94 Da (mass of the variable **Z** amino acid plus 94 Da from *iso*MeAsp) leads to the identical **A2** ions. The corresponding mass-shifted ions can be found in the spectra of MC-YR and MC-RR; i.e. 50 and 43 *m/z* units higher arising from replacements of Leu at position 2 by Tyr and Arg, respectively. A mechanistic proposal for this water elimination can be found elsewhere^[22,24] and it explains the presence of ions belonging to the **A** series in the MS³ spectra from microcystins (Fig. 4). Further, **A2** ions can decompose into **A3'** and **A3** ions. These sequential steps are proposed because the rather exotic Adda residue is a beta amino acid, as seen in Scheme 2. Interestingly, **A3** ions can eliminate the Glu residue

Figure 5. MS² product ion spectra of deprotonated microcystins obtained by higher-energy HCD within a multipole HCD collision cell: (I) MC-LR; (II) MC-YR; (III) MC-RR; and (IV) MC-LA.

via an internal nucleophilic attack on the neighboring carbonyl group, leading to A4 ions. A charge-transfer reaction at the leaving cyclic acid unit, however, may produce the intense ions at m/z 128 found in all HCD spectra. Another nucleophilic attack on a carbonyl group may explain the ions A5 (see Scheme 2, pathway 2).

Overall, the combination of CID and HCD data provided significant structurally diagnostic information on the structures of microcystin variants and allowed us to propose a novel selective ring-opening mechanism at the *iso*MeAsp³ residue for deprotonated microcystins. This ring-opening mechanism is of great interest to analytical chemists since it reduces the complexity of the product ion spectra observed for the variants, a common problem affecting the sequencing

of cyclic peptides. Indeed, product ion spectra of microcystins in the negative ion mode showed a relatively simple pattern with two main ion series, both starting at the same selective ring-opening position.

Analysis of a cell extract

In order to utilize the proposed fragmentation mechanisms, an extract obtained from *Microcystis* freeze-dried cells was studied. A putative microcystin chromatographic peak was collected and analyzed by direct infusion in both the negative and positive ion modes. The results obtained in the negative ion mode are depicted in Fig. 6. As can be seen, the spectra revealed the [M-H]⁻ ions at m/z 1035.5892, with a corresponding

Table 4. Accurate mass data for MS² product ion spectra of deprotonated microcystin standards obtained by HCD within a LTQ Orbitrap following chip-based nanospray ionization. The A ion series is depicted (Scheme 2)

	MC-LR			MC-YR			MC-RR			MC-LA		
	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)
A2	725.4232	725.4243	-1.53	775.4022	775.4035	-1.77	768.4404	768.4414	-1.25	—	725.4243	—
A3'	468.2455	468.2464	-1.82	518.2247	518.2256	-1.76	511.2624	511.2634	-1.96	468.2453	468.2464	-2.2
A3	412.2195	412.2201	-1.55	462.1987	462.1994	-1.51	455.2363	455.2372	-1.96	412.219	412.2201	-2.8
A4	311.172	311.1725	-1.61	361.1513	361.1517	-1.11	354.1889	354.1895	-1.69	311.1717	311.1725	-2.6
A5	200.1404	200.1404	-0.20	250.1195	250.1197	-0.80	243.1571	243.1575	-1.60	200.1401	200.1404	-1.7
128	128.0354	128.0353	0.78	128.0354	128.0353	0.78	128.0354	128.0353	0.78	128.0353	128.0353	0.0

doubly charged ion at *m/z* 517.2909. This information provides preliminary information on the nature of the carboxylic acid groups; i.e. both groups are presumably not esterified. The product ion spectra of the ion at *m/z* 1035.5 were dominated by H₂O elimination. In addition, the observed neutral loss of 112 Da indicates that the *iso*MeAsp residue is unchanged (data not shown). When the MS³ spectra of the [M-H-18]⁻ ions are additionally considered (Fig. 6, panel II), characteristic neutral losses of 17 and 42 Da demonstrate the presence of an arginine residue in the structure. Interestingly, apart from **B1**, the apparent **B** ion series exhibits identical ions to MC-LR; i.e., *m/z* 774, 691 and 580 for **B2**, **B3** and **B4**, respectively (see Fig. 4). If we consider the **A** ion series (HCD spectrum in panel III, Fig. 6) and take MC-LR as a reference, a mass shift of 42 *m/z* units is readily apparent. These observations allow us to make the assumption that the amino acid residue responsible for this mass shift is located at position 1 of the ring, especially when **B1** ions are considered. In fact, a **B1** ion at *m/z* 887.5 can be found in the MS³ spectrum of the unknown variant when 42 *m/z* units are added to *m/z* 845, the **B1** ions from MC-LR. This result indicates that Ala is replaced by an amino acid 42 Da higher in mass, i.e., a residue of 113 Da (71 + 42). Considering the natural amino acids, we can assume that Leu or Ile has replaced Ala in position 1 of the ring. This hypothesis is also confirmed by ions **A5** at *m/z* 242, composed of Leu/Ile-Leu-NH₂ (113 + 113 + 16). Therefore, we suggest that the unknown compound is [Leu¹]MC-LR, a congener previously described in Brazilian cyanobacteria isolates by Matthiessen *et al.*^[36] Positive ion experiments confirmed this assumption (see Supporting Information). The theoretical molecular formula of C₅₂H₈₀O₁₂N₁₀ for this congener was confirmed by high-resolution, accurate mass measurements (0.8 ppm *m/z* uncertainty).

CONCLUSIONS

The product ion spectra of microcystin anions following electrospray ionization were systematically investigated in this study. The dissociation pathways of structurally related variants under low-energy CID conditions in the linear ion trap and the HCD cell of an orbitrap mass spectrometer were analyzed using accurate mass measurements at high resolving power. The experimental results allowed us to propose a novel dominant ring-opening cleavage mechanism at the *iso*MeAsp residues, greatly reducing the complexity of the product ion spectra in comparison with the corresponding positive ion spectra. Two complementary fragmentation pathways were shown here, providing highly structurally diagnostic spectra for the structural characterization of microcystins. The applicability of the proposed model was demonstrated by the identification of [Leu¹]MC-LR in a cyanobacteria cell extract. In conclusion, the negative ion product ion spectra of microcystins are a rich source of structurally specific ions which, when combined with the corresponding positive ion spectra, greatly enhance the confidence in structure assignments.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Scheme 2. Proposed mechanisms for the formation of the A ion series.

Figure 6. Mass spectra obtained for a putative microcystin in the negative ion mode: (I) MS scan; (II) MS^3 product ion spectrum by CID; and (III) MS^2 product ion spectrum obtained by HCD.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for research funding, fellowships and financial support. JI acknowledges Fundación Pedro Barrié de la Maza (Spain) for a postdoctoral fellowship. DAV acknowledges research support by the Alfried Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung (Germany) as well as the Medical Research Council (UK).

REFERENCES

- [1] C. Mackintosh, K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, G. A. Codd. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A from both mammals and higher-plants. *FEBS Lett.* **1990**, 264, 187.
- [2] E. M. Jochimsen, W. W. Carmichael, J. S. An, D. M. Cardo, S. T. Cookson, C. E. M. Holmes, M. B. D. Antunes, D. A. de Melo, T. M. Lyra, V. S. T. Barreto, S. Azevedo, W. R. Jarvis. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 873.
- [3] W. W. Carmichael, V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K. I. Harada, T. Krishnamurthy, M.J. Yu, R. E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg, M. Watanabe. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green-algae). *Toxicon* **1988**, 26, 971.
- [4] T. Krüger, B. Christian, B. Luckas. Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. *Toxicon* **2009**, 54, 302.
- [5] A. Furey, O. Allis, P. M. Ortea, M. Lehan, K. J. James, in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (2nd edn.), (Ed.: L. M. Botana), Taylor and Francis, **2008**, p. 845.
- [6] D. P. Botes, A. A. Tuinman, P. L. Wessels, C. C. Viljoen, H. Kruger, D. H. Williams, S. Santikarn, R. J. Smith, S. J. Hammond. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 2311.
- [7] K. L. Rinehart, K. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael. Nodularin, microcystin, and the configuration of ADDA. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8557.
- [8] K. L. Rinehart, M. Namikoshi, B. W. Choi. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green-algae (Cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* **1994**, 6, 159.
- [9] R. Luukkainen, M. Namikoshi, K. Sivonen, K. L. Rinehart, S. I. Niemela. Isolation and identification of 12 microcystins from 4 strains and 2 bloom samples of *Microcystis* spp. – structure of a new hepatotoxin. *Toxicon* **1994**, 32, 133.
- [10] G. K. Poon, L. J. Griggs, C. Edwards, K. A. Beattie, G. A. Codd. Liquid-chromatography electrospray ionization mass-spectrometry of cyanobacterial toxins. *J. Chromatogr.* **1993**, 628, 215.
- [11] K. P. Bateman, P. Thibault, D. J. Douglas, R. L. White. Mass-spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using online chromatographic and electrophoretic separations. *J. Chromatogr. A* **1995**, 712, 253.
- [12] M. Namikoshi, M. Yuan, K. Sivonen, W. W. Carmichael, K. L. Rinehart, L. Rouhiainen, F. Sun, S. Brittain, A. Otsuki. Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 143.
- [13] M. Yuan, M. Namikoshi, A. Otsuki, K. L. Rinehart, K. Sivonen, M. F. Watanabe. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 33.
- [14] J. A. Zweigenbaum, J. D. Henion, K. A. Beattie, G. A. Codd, G. K. Poon. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, 23, 723.
- [15] C. Kubwabo, N. Vais, F. M. Benoit. Characterization of microcystins using in-source collision-induced dissociation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 597.
- [16] H. V. Frias, M. A. Mendes, K. H. M. Cardozo, V. M. Carvalho, D. Tomazela, P. Colepicolo, E. Pinto. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 344, 741.
- [17] C. W. Diehnelt, S. M. Peterman, W. L. Budde. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 622.
- [18] C. W. Diehnelt, N. R. Dugan, S. M. Peterman, W. L. Budde. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 501.
- [19] T. Mayumi, H. Kato, S. Imanishi, Y. Kawasaki, M. Hasegawa, K. Harada. Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. *J. Antibiot.* **2006**, 59, 710.
- [20] L. C. M. Ngoka, M. L. Gross. Multistep tandem mass spectrometry for sequencing cyclic peptides in an ion-trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, 10, 732.
- [21] C. S. Brinkworth, S. Dua, A. M. McAnoy, J. H. Bowie. Negative ion fragmentations of deprotonated peptides: backbone cleavages directed through both Asp and Glu. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 1965.
- [22] H. J. Andreazza, T. F. Wang, C. J. Bagley, P. Hoffmann, J. H. Bowie. Negative ion fragmentations of deprotonated peptides. The unusual case of isoAsp: a joint experimental and theoretical study. Comparison with positive ion cleavages. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 1993.
- [23] K. Biemann, S. A. Martin. Mass-spectrometric determination of the amino-acid sequence of peptides and proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, 6, 1.
- [24] J. H. Bowie, C. S. Brinkworth, S. Dua. Collision-induced fragmentations of the (M-H)(-) parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, 21, 87.
- [25] D. Bilusich, J. H. Bowie. Fragmentations of (M-H)(-) anions of underivatized peptides. Part 2: characteristic cleavages of Ser and Cys and of disulfides and other post-translational modifications, together with some unusual internal processes. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, 28, 20.
- [26] M. Yuan, M. Namikoshi, A. Otsuki, M. F. Watanabe, K. L. Rinehart. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: Modulation of charge states and M+H(+) to M+Na(+) ratio. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, 10, 1138.
- [27] P. Ferranti, S. Fabbrocino, A. Nasi, S. Cairra, M. Bruno, L. Serpe, P. Gallo. Liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances

- and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1328.
- [28] W. M. Draper, D. D. Xu, S. K. Perera. Electrolyte-induced ionization suppression and microcystin toxins: ammonium formate suppresses sodium replacement ions and enhances protonated and ammoniated ions for improved specificity in quantitative LC-MS-MS. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4153.
- [29] L. A. Lawton, C. Edwards, G. A. Codd. Extraction and high-performance liquid-chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* **1994**, *119*, 1525.
- [30] D. Pu, N. L. Clipston, C. J. Cassady. A comparison of positive and negative ion collision-induced dissociation for model heptapeptides with one basic residue. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 297.
- [31] A. G. Harrison. Sequence-specific fragmentation of deprotonated peptides containing H or alkyl side chains. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 1.
- [32] A. G. Harrison, K. W. M. Siu, H. El Aribi. Amide bond cleavage in deprotonated tripeptides: a newly discovered pathway to $b(2)$ ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 869.
- [33] G. A. Chass, C. N. J. Marai, D. H. Setiadi, I. G. Csizmadia, A. G. Harrison. A Hartree-Fock, MP2 and DFT computational study of the structures and energies of $b(2)$ ions derived from deprotonated peptides. A comparison of method and basis set used on relative product stabilities. *J. Mol. Struct. Theochem* **2004**, *675*, 149.
- [34] Y. Zhang, S. B. Ficarro, S. Li, J. A. Marto. Optimized Orbitrap HCD for Quantitative Analysis of Phosphopeptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1425.
- [35] M. Eckersley, J. H. Bowie, R. N. Hayes. Collision-induced dissociations of deprotonated peptides, dipeptides and tripeptides with hydrogen and alkyl alpha-groups - an aid to structure determination. *Org. Mass Spectrom.* **1989**, *24*, 597.
- [36] A. Matthiensen, K. A. Beattie, J. S. Yunes, K. Kaya, G. A. Codd. D-Leu(1) microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 383.

9.2.6 Intriguing differences in the gas-phase dissociation behavior of protonated and deprotonated gonyautoxin epimers

Intriguing differences in the gas-phase dissociation behavior of protonated and deprotonated gonyautoxin epimers

Felipe A. Dörr,¹ Borislav Kovačević,² Zvonimir B. Maksić,^{2†}
Ernani Pinto,¹ Dietrich A. Volmer^{3*}

¹*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil*

²*Quantum Chemistry Group, Rudjer Bošković Institute, Zagreb, Croatia*

³*Institute of Bioanalytical Chemistry, Department of Chemistry, Saarland University, Saarbrücken, Germany*

[†]This paper is dedicated to the memory of Professor Zvonimir Maksić, who sadly passed away during this project (11.11.1938 – 27.03.2011)

*Corresponding author:

Prof. Dr. Dietrich Volmer
Saarland University
Institute of Bioanalytical Chemistry, Campus B2.2
D-66123 Saarbrücken, Germany
Tel +49 681 302 3433; Fax +49 681 302 2963
Email: Dietrich.Volmer@mx.uni-saarland.de

Abstract

The aim of this study was to investigate the unusual gas-phase dissociation behavior of two epimer pairs of protonated gonyautoxins (GTX) following electrospray ionization and compare this behavior to their deprotonated counterparts. GTX belong to a group of paralytic shellfish poisoning neurotoxins produced by several strains of marine dinoflagellates. The chemical structures of the investigated **GTX1-4** variants vary in their substitution pattern at N-1 ($-H$ for **GTX1/4** versus $-OH$ for **GTX2/3**) and the stereochemical orientation of the hydroxysulfate group at C-11 (11α for **GTX1/2** versus 11β for **GTX3/4**). The direct comparison of full-scan mass spectra of GTX compounds in the positive and negative ion modes illustrated two distinct features: firstly, an intriguing difference between protonated 11α and 11β species, where the 11α conformations exhibited an almost complete dissociation of the $(MH)^+$ ions via facile SO_3 elimination but the 11β species remained mostly intact as $(MH)^+$. Secondly, the lack of such differences for the deprotonated counterparts; that is, all four investigated species exhibited stable $(M-H)^-$ ions. In this study, we propose an elimination mechanism from density functional theory calculations, initiated by an acid-catalyzed proton transfer of a guanidinium proton to the hydroxysulfate group with simultaneous SO_3 release, which is only possible for the 11α conformation based on calculated intra-molecular distances. The same mechanism explains the lack of a comparable SO_3 loss in the negative ion mode. CID experiments supported this proposed mechanism for **GTX1** and **GTX2**. Computational modeling of the product ions seen in the CID spectra of **GTX3** and **GTX4** established that the lowest energy dissociation pathway for the 11β epimers is elimination of neutral water with the possibility for further SO_3 release from the intermediate product. Experimental data for the structurally analogous decarbamoyl gonyautoxins confirmed the evidence for the GTX compounds as well as the proposed elimination mechanisms.

Introduction

Paralytic shellfish poisons (PSPs) are neurotoxins produced by marine dinoflagellates during harmful algal blooms in the oceans [1]. Shellfish bioaccumulate these toxins from the algae during grazing, which is of great concern because of the PSP's high toxicity in humans after they consume shellfish [3]. PSPs have a multi-functional chemical framework despite their small sizes: they are composed of a tetrahydropurine skeleton to which a 5-membered ring is fused and also possess a unique hydrated ketone structure stabilized by two electron-withdrawing guanidinium moieties (Figure 1). A wide variety of PSP analogs exists from substitutions at N-1 (hydroxyl addition), C-11 (hydroxysulfate addition, gonyautoxin variants), and N-21 (sulfonate addition). Several studies have investigated the mass spectrometric and tandem mass spectrometric (MS/MS) analysis of PSP toxins, mostly by means of electrospray liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (*e.g.* ref. [4-10]).

We have previously discussed the dissociation behavior of two important PSP toxins in detail; *viz.*, saxitoxin (STX) and neosaxitoxin (NEO) [11,12]. Both compound's collision-induced dissociation (CID) spectra exhibited an unusually rich variety and abundance of species due to the large number of functional groups within the small skeletal structures and the two guanidinium moieties per molecule. We proposed the actual dissociation mechanisms of the PSPs after calculation of the proton affinities revealed that protonation took place at the pyrimidine guanidinium moieties of both STX and NEO. Most of the parallel and consecutive dissociation reactions were then rationalized through charge-remote and charge-mediated multiple neutral losses of H₂O, NH₃, CO, CO₂, CH₂O and different isocyanate, ketenimine and diimine species [11,12].

The closely-related gonyautoxins (GTX) exhibit several analogous dissociation reactions [11-13] because of their structural similarity (Figure 1). These well-described dissociation reactions are not the focus of the present article, however, but rather an unusual behavior seen for the two epimeric pairs of substituted PSPs, namely the gonyautoxins and the decarbamoyl gonyautoxin (dcGTX) metabolites (Figure 1). A notable difference in their dissociation behaviors in the gas phase was described by Della'Aversano *et al.* [13], who observed unusual fragmentation patterns for the two epimeric pairs of gonyautoxins **GTX1/GTX4** and **GTX2/GTX3** during electrospray

ionization (ESI) LC-MS and MS/MS analysis of the protonated molecules. In the measured full-scan mass spectra, the (MH)⁺ ion was the most abundant ion for those gonyautoxins having the 11-hydroxysulfate group in β -orientation (**GTX3/GTX4**), while the (MH-80)⁺ product ion, corresponding to loss of SO₃ from the protonated molecule, dominated the spectra of 11 α -hydroxysulfate toxins (**GTX1/GTX2**). The authors observed [13] the same pattern in the CID spectra of **GTX1-4** and also for the decarbamoyl gonyautoxin analogs **dcGTX1-4**. No mechanistic explanation was given for this observed discrepancy.

The present study investigates these differences of GTX and dcGTX epimers in detail and proposes a mechanism for the gas-phase intra-molecular elimination of SO₃ from the protonated 11 α variants based on density functional theory (DFT). Importantly, as will be shown in this study, the deprotonated GTX epimer pairs do not follow the same trend, which prompted the additional question, why are the protonated 11 α species so labile in comparison to their deprotonated anionic counterparts? This paper will also address this question mechanistically.

Experimental

Chemicals and Standard Solutions

Reference standard solutions of gonyautoxins and decarbamoyl gonyautoxins were obtained through the National Research Council/Institute for Marine Biosciences (NRC/IMB)'s Certified Reference Materials Program (CRMP, Halifax, NS, Canada) and were diluted 10-fold in water (+0.1% acetic acid) prior to analysis. Acetonitrile was purchased from J.T.Baker/Avantor (Phillipsburg, NJ). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) supplied LC-MS grade ammonium formate, acetic acid, formic acid and sodium formate. Organic-free water was generated by a Millipore (Bedford, MA) Direct-Q8 purification system.

Liquid Chromatography

The epimers **GTX1-4** and **dcGTX1-4** (Figure 1) were separated on a Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) liquid chromatography system using a zic-HILIC column (150x1.0 mm, 3.5 μ m particles) from Merck Sequant AB (Umeå, Sweden). Separations were achieved by gradient elution using (A) 4 mM ammonium formate + 0.03% formic acid and (B) acetonitrile/water 90:10 (v/v) at 35 μ L $\cdot$ min⁻¹. Solvent composition was linearly programmed from 50% B to 20% B within 15 min, held at 20% B for 5 min, returned to 50% B within 1 min and held for 14 min. The column effluent was directly coupled to the mass spectrometer *via* electrospray ionization.

Mass Spectrometry

Electrospray data were acquired on Bruker Daltonics (Billerica, MA) MicroTOF-QII quadrupole-time-of-flight (QTOF) and Esquire HCT ion trap mass spectrometers in positive (-3.5 kV) and negative (+3.5 kV) ion modes. The QTOF instrument was operated with the following settings: nebulizer gas, 30 psi; drying gas, 4 L $\cdot$ min⁻¹; drying temperature, 200 °C; collision gas, argon. Collision energy/RF sweeping were activated in the collision cell. 5000 spectra were summed for each data point. The settings for the ion trap instrument were as follows: nebulizer gas, 30 psi; drying gas, 5 L $\cdot$ min⁻¹; drying temperature, 250 °C; smart ion charge control (ICC), 100,000; maximum accumulation time, 50 ms; SmartFrag, off. Helium was used as the buffer gas. An isolation width of 4 u

was used in all MSⁿ experiments. Both instruments were calibrated with a solution of sodium formate (1 mg·mL⁻¹, isopropanol/water 50:50).

Computational Methods

Density functional theory (DFT) [14] was applied using the Gaussian 03 program package [15]. The search for the Born-Oppenheimer energy hyper-surfaces was performed using an efficient B3LYP computational scheme [14] employing the 6-31G* basis set. Energy minima and transition structures were verified by calculating the corresponding Hessian at the same level of theory. For transition structures, intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations were performed to confirm that each structure connects minima in both the forward and reverse directions. Higher level single point energies were obtained with BMK/6-311+G(2df,p). The BMK (Boese-Martin for Kinetics) functional was chosen since it is advocated as the best DFT approach for estimating the barrier heights [16]. Relative energy profiles were calculated using free energy of isolated species in the gas phase at 298 K.

Results and Discussion

As mentioned in the Introduction, the aim of this study was to find answers for two questions raised during the mass spectrometric analysis of GTX epimer pairs in the positive and negative ion modes; *viz.*, *what is the exact mechanism of elimination of SO₃ from 11 α -hydroxysulfate GTX epimers (GTX1, GTX2) when, under the same conditions, their 11 β counterparts do not undergo this fragmentation reaction. And, as will be demonstrated below, why are deprotonated molecules of 11 α epimers much more stable than the protonated species?*

To answer these questions, we conducted a first set of experiments where we studied protonated species of the two epimeric pairs of gonyautoxins – **GTX1/GTX4** and **GTX2/GTX3** – after electrospray ionization. The measured full-scan spectra in the positive and negative modes are illustrated in Figure 2. It is evident from this comparison that 11 α and 11 β variants differed significantly in their dissociation properties (Figures 2a-d). Firstly, the protonated 11 β -hydroxysulfate species were much more stable than their corresponding 11 α compounds, showing mostly intact (MH)⁺ ions. The (MH)⁺ ions of the 11 α variants on the other hand almost completely dissociated into (MH-SO₃)⁺ ions *via* elimination of neutral SO₃ (Figure 2a,c). No analogous SO₃ loss reactions were observed for the 11 β species to a significant extent (Figure 2b,d), confirming the results of Della'Aversano *et al.* [13]. When these experiments were repeated in the negative ion mode, all four GTX species formed stable deprotonated molecules, (M-H)⁻ at *m/z* 394 and 409, respectively (Figures 2e-h).

To elucidate the mechanistic differences for the stabilities and the dissociation reactions of GTX epimers, we conducted density functional theory (DFT) calculations. The most stable conformers of the GTX' (MH)⁺ ions in the gas-phase are shown in Figure 3. Close inspection of the three-dimensional structures revealed that for **GTX1** and **GTX2**, the 11 α -hydroxysulfate group is in close proximity to the charge-carrying, protonated guanidine group (Figure 3, right-hand side of the structure). The distances between oxygen of the 11 α -hydroxysulfate group and hydrogen of the protonated guanidine group at N-9 are only 2.105 Å and 2.121 Å for **GTX1** and **GTX2**, respectively (Figure 3). As can also be easily seen from the figures, for **GTX3** and **GTX4**, the 11 β -

hydroxysulfate group is far removed from the guanidinium group. Based on these molecule geometries, we are proposing a SO_3 elimination mechanism, which is illustrated in Figure 4. In this reaction, protonated guanidine acts as an acid that readily catalyzes breaking of the S-O bond, followed by elimination of SO_3 . The second guanidinium group on the left-hand side of the molecule does not possess an acidic proton at N-1 or N-3, which could trigger a similar reaction as proposed for the dissociation mechanism.

The calculated free energy profiles for these dissociation reactions of protonated **GTX1** and **GTX2** are shown in Figure 5 (see Experimental for the theoretical model used). For reasons of simplicity, the structures of the reactant (*R*), transition state (*TS*) and product (*PR*) are presented only for **GTX1**. The transition state for both ions corresponds to migration of a proton from the protonated guanidinium group to the hydroxysulfate group. After proton transfer, the hydroxysulfate group spontaneously dissociates and forms SO_3 and **GTX1-OH/GTX2-OH**. The calculated reaction barriers for dissociation of **GTX1** and **GTX2** ions are 56.7 and 54.8 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively.

For the 11 β -hydroxysulfates (**GTX3/GTX4** epimers), the distances of the hydroxysulfate group to the protonated guanidinium groups are much larger (Figure 3), making a comparable dissociation reaction unlikely to occur. For these epimers, an elongation of the C-O bond is required for elimination of SO_3 but this led to a calculated increase of the required energy of $>120 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. At the same time, no energy minima were observed for the dissociated products in the calculations.

Importantly, the proposed elimination mechanism shown in Figure 4 also explains the stabilities of the deprotonated 11 α variants **GTX1** and **GTX2** in comparison to their protonated counterparts. In our experiments, the deprotonated molecules of all four investigated variants (**GTX1-4**) exhibited identical behaviors; *viz.*, virtually solitary (M-H^-) ions were formed during electrospray ionization and no fragmentation reactions, particularly no SO_3 eliminations, were observed (Figure 2e-h). Mechanistically this can be readily described by the lack of the acidic proton that catalyzes the dissociation reaction shown in Figure 4, as both **GTX1** and **GTX2**'s guanidine groups are neutral in the negative ion mode.

In the second set of conducted experiments, we conducted additional CID experiments, to support and validate the experimental findings and proposed mechanism.

For this, we investigated the dissociation of GTX compounds after collisional activation of the (MH)⁺ ions at *m/z* 396 and 412 for **GTX1/GTX4** and **GTX2/GTX3**, respectively, and the corresponding deprotonated molecules at *m/z* 394 and 410. After activation, the protonated 11 α -hydroxysulfate variants of **GTX1** and **GTX2** readily eliminated neutral SO₃ to give (MH-SO₃)⁺ as virtually sole product ion in the CID spectra (seen at *m/z* 332 and 316 for **GTX1** and **GTX2**, Figure 6a,b), confirming the behavior in the full scan mode (*vide supra*). When the more stable **GTX3** and **GTX4** precursor ions of the 11 β species were made to undergo CID, they produced a more diverse spectrum of product ions, comprising primarily of (MH-H₂O)⁺, (MH-SO₃)⁺, and (MH-H₂O-SO₃)⁺ ions. Because no comparable H₂O or combined H₂O+SO₃ losses were seen in the CID spectra of the 11 α -hydroxysulfate species (Figures 6a,b), it was hypothesized that initial H₂O elimination may provide an intermediate structure that could more easily eliminate SO₃ for **GTX3** and **GTX4**, leading to (MH-H₂O-SO₃)⁺ ions. Direct SO₃ elimination from the precursor ions was assumed to be the energetically less favorable route in this hypothesis.

To further elucidate this mechanistic proposal, we considered the previous results of the DFT calculations (Figure 3). As discussed above, the 11-hydroxysulfate groups of **GTX3** and **GTX4** are too far removed from the protonated guanidino group to catalyze elimination of SO₃ by the mechanism described in Figure 4 (*vide supra*). These calculations also revealed, however, that for the **GTX3** and **GTX4** variants, one of the geminal hydroxyl groups at C-12 is in much closer proximity to the protonated guanidine function than is the case for the corresponding **GTX1** and **GTX2** compounds (see Figure 3). The distances between the oxygen atom of this hydroxyl group and the hydrogen atom on the protonated guanidine group are 2.127 Å and 2.188 Å for **GTX3** and **GTX4**, whereas distances are much larger for **GTX1** and **GTX2**, 2.936 Å and 2.909 Å, respectively. As a result, we are proposing that this -OH group could be readily protonated by transfer from the guanidinium group. The transition structure then eliminates the protonated hydroxyl group as neutral H₂O and simultaneously expels SO₃. Importantly, for this SO₃ expulsion mechanism to work, the 11-hydroxysulfate group does not have to be in close proximity to the guanidinium function because the proton is transferred via the bridging -OH group at C-12 (which in turn forms the keto group) to the oxygen atom of the -OSO₃⁻ group.

In order to test this hypothesis, a computational study was performed for **GTX3** and **GTX4**, as summarized in Figure 6, which illustrates the mechanism and the energetic profiles along with structures of the transition states. The first step of this mechanism involves proton transfer from the guanidinium group to the hydroxysulfate group. This step actually comprises a double proton transfer, where the hydroxyl group at C-12 acts as a bridge. The proton from the guanidinium group (denoted in red) shifts to the hydroxyl group, and, simultaneously, the proton from the hydroxyl group (denoted in green) migrates to the hydroxysulfate group. The reaction barrier for this process is relatively low, 37.6 kJ·mol⁻¹ for **GTX3** and 38.2 kJ·mol⁻¹ for **GTX4**. The resulting tautomers are more stable than the precursors **GTX3** and **GTX4** by amounts of 29.0 and 29.2 kJ·mol⁻¹. The next step involves the migration of a proton from the hydroxysulfate group to the hydroxyl group, with simultaneous dissociation of the C-O bond and elimination of neutral H₂O (*TS2*). At the same time, the proton from the second hydroxyl group at C-12 moves to the hydroxysulfate group, which leads to a keto group at C-12 and (MH-H₂O)⁺ ion formation. The calculated barrier for this process is 50.5 and 51.6 kJ·mol⁻¹ for **GTX3** and **GTX4**, respectively. In the second stage of our proposal (*TS3*), the (MH-H₂O)⁺ product ion would then lose SO₃ *via* S-O bond cleavage and proton migration between oxygen atoms of the SO₃ group (Figure 6). The barrier for this SO₃ elimination is relatively high, however, at 130.0 and 129.0 kJ·mol⁻¹ for **GTX3** and **GTX4**, respectively, which is similar to the calculated energies for direct elimination after C-O bond elongation as described above; this proposed mechanism *via TS3*, however, results in an energy minimum for the dissociation product as opposed to the C-O elongation mechanism. Figure 6 also shows the measured breakdown curve for the (MH)⁺ ion of **GTX3** as well as the appearance curves for the (MH-H₂O)⁺ and (MH-H₂O-SO₃)⁺ ions from collisional activation experiments on an ion trap instrument, which are consistent in their energetic requirements with the above proposal (the observed behavior of **GTX4** was virtually identical to **GTX3**).

It is important to emphasize that the process of proton transfer (=TS1) preceding the elimination of water (=TS2) is energetically less favored for the **GTX1** and **GTX2** compounds than for **GTX3** and **GTX4**; the calculated reaction barriers *TS1* for **GTX1** and **GTX2** are 89.9 and 90.4 kJ·mol⁻¹, respectively. Because the process of SO₃

elimination requires significantly less energy (56.7 and 54.8 kJ·mol⁻¹) for **GTX1** and **GTX2**, we conclude that the elimination of water is not a favorable reaction for **GTX1** and **GTX2**, as confirmed by the experimental findings (Figures 2 and 5), which exhibit almost solitary SO₃ elimination.

The CID analysis of the deprotonated molecules of **GTX1-4** revealed identical dissociation properties for all molecules, reflecting the uniform behavior in the full scan mode (*vide supra*). In these analyses, the CID spectra exhibited two major neutral losses from the (M-H)⁻ ions for all investigated GTX compounds; namely charge-remote neutral losses of H₂O and isocyanate NH=C=O (43 Da, from R₃; Figure 1), as reported for other PSP toxins [11]. The CID spectra for the GTX anions are summarized in the *Supplementary Material*.

Finally, for confirming the observed 11 α /11 β differences in the positive ion mode and the uniform behavior of the 11 α /11 β negative ions, we also investigated the corresponding decarbamoyl GTX derivatives (Figure 1), which were assumed to show identical behavior to the GTX molecules. As expected, our experiments revealed the same differences and the same trends in the mass spectra for the stereochemical variants, for both positive and negative ions, in full-scan and CID spectra (the mass spectra are summarized in the *Supplementary Material*).

Conclusions

In this study we have compared the stabilities of protonated and deprotonated GTX compounds after electrospray ionization as well as collision-induced dissociation. Inspection of the full-scan spectra of epimers of GTX highlighted two distinct features: firstly, a notable difference between protonated 11α - (**GTX1/GTX2**) and 11β - (**GTX3/4**) hydroxysulfate species, where the 11α conformations exhibited an almost complete dissociation of the $(MH)^+$ ions *via* facile SO_3 elimination but the 11β species remained mostly intact. Secondly, a complete lack of such dissociations for the deprotonated counterparts was observed. An elimination mechanism for the protonated 11α compounds was proposed based on density functional theory calculations, which comprised an acid-catalyzed proton transfer of a guanidinium proton to the hydroxysulfate group with simultaneous SO_3 release, which is only possible for the 11α conformation. The same mechanism was used to explain the lack of a comparable SO_3 loss in the negative ion mode. CID experiments supported this proposed mechanism for **GTX1** and **GTX2**. Computational modeling of the product ions seen in the CID spectra of **GTX3** and **GTX4** established that the lowest energy dissociation pathway for the 11β epimers is elimination of neutral water with the possibility for further SO_3 release from the intermediate product.

Importantly, the findings shown in this study have direct implications for the trace analysis of PSP toxins in environmental samples, where most scientists use the positive ion mode for detection. GTX analogs can be analyzed in the negative ion mode with similar detection sensitivity as compared to the positive ion mode, but with the advantage of stable deprotonated molecule ions of the precursor ions during electrospray ionization. Structure diagnostic product ions for sensitive MRM can be readily generated by CID.

Acknowledgements

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for fellowships and financial support. DAV acknowledges support by the Alfried Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung.

References

1. Luckas, B. Phycotoxins in Seafood—Toxicological and Chromatographic Aspects. *J. Chromatogr.* **1992**, 624, 439–456.
2. Hallegraeff, G.M. A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase. *Phycologia* **1993**, 32, 79–99.
3. Van Egmond, H.P.; Aune, T.; Lassus, P.; Speijers, G.J.A.; Waldock, M. Paralytic and Diarrhetic Shellfish Poisons. Occurrence in Europe, Toxicity, Analysis, and Regulation. *J. Nat. Toxins* **1993**, 2, 41–83.
4. Quilliam, M.A. The Role of Chromatography in the Hunt for Red Tide Toxins. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 527–548.
5. Thibault, P.; Pleasance, S.; Laycock, M.V. Analysis of Paralytic Shellfish Poisons by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr.* **1991**, 542, 483–501.
6. Quilliam, M.A.; Janecek, M.; Lawrence, J.F. Characterization of the Oxidation Products of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 482–487.
7. Dahlmann, J.; Budakowski, W.R.; Luckas, B. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Based Methods for the Simultaneous Determination of Algal and Cyanobacterial Toxins in Phytoplankton from Marine Waters and Lakes Followed by Tentative Structural Elucidation of Microcystins. *J. Chromatogr. A* **2003**, 994, 45–57.
8. Arakawa, O.; Noguchi, T.; Shida, Y.; Onoue, Y. Occurrence of Carbamoyl-N-Hydroxy Derivatives of Saxitoxin and Neosaxitoxin in a Xanthid Crab *Zosimus aeneus*. *Toxicon* **1994**, 32, 175–183.
9. Pleasance, S.; Thibault, P.; Kelly, J. Comparison of Liquid-Junction and Coaxial Interfaces for Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry with Application to Compounds of Concern to the Aquaculture Industry. *J. Chromatogr.* **1992**, 591, 325–339.
10. Johnson, R.C.; Zhou, Y.; Statler, K.; Thomas, J.; Cox, F.; Hall, S.; Barr, J.R. Quantification of Saxitoxin and Neosaxitoxin in Human Urine Utilizing Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2009**, 33, 8–14.
11. Sleno, L.; Volmer, D.A.; Kovacević, B.; Maksić, Z.B. Gas-phase Dissociation Reactions of Protonated Saxitoxin and Neosaxitoxin. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 462–477.

12. Sleno, L.; Volmer, D.A.; Marshall, A.G. Assigning Product Ions from Complex MS/MS Spectra: The Importance of Mass Uncertainty and Resolving Power. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 183–198.
13. Dell'Aversano, C.; Hess, P.; Quilliam, M.A. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Toxins. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1081*, 190–201.
14. Koch, W.; Holthausen, M.C. A Chemists Guide to Density Functional Theory; Wiley-VCH: Weinheim/New York, **2000**, and references cited therein.
15. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, Jr., J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; and Pople, J.A. Gaussian 03, Revision E.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
16. Boese, A.D.; Martin, J.M.L. Development of Density Functionals for Thermochemical Kinetics. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 3405-3416.

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	M _n
GTX1	H	OSO ₃ H	CO ₂ NH ₂	OH	411
	GTX2	H	OSO ₃ H	CO ₂ NH ₂	H	395
	GTX3	OSO ₃ H	H	CO ₂ NH ₂	H	395
	GTX4	OSO ₃ H	H	CO ₂ NH ₂	OH	411
	dcGTX1	H	OSO ₃ H	H	OH	368
	dcGTX2	H	OSO ₃ H	H	H	352
	dcGTX3	OSO ₃ H	H	H	H	352
	dcGTX4	OSO ₃ H	H	H	OH	368

Figure 1. Chemical structures and nominal molecular weights (M_n) of the investigated gonyautoxins (GTX) and decarbamoyl gonyautoxins (dcGTX). (**GTX1** and **GTX2**, 11 α -hydroxysulfate; **GTX3** and **GTX4**, 11 β -hydroxysulfate.)

Figure 2. Full-scan mass spectra of GTX variants under positive (a-d) and negative (e-h) electrospray ionization conditions.

Figure 3. The most stable conformers of protonated gonyautoxins **GTX1-4** (note: **GTX1** and **GTX2**, 11 α -hydroxysulfate; **GTX3** and **GTX4**, 11 β -hydroxysulfate). Also shown are calculated hydrogen bond distances between oxygen of the hydroxysulfate group and hydrogen from the guanidinium group for **GTX1** and **GTX2** (values given in Å.)

Figure 4. The proposed transition state for the formation of $(\text{MH-SO}_3)^+$ product ions from protonated **GTX1** and **GTX2** correspond to migration of a proton (top, shown in red) from the protonated guanidinium group to the 11-hydroxysulfate group, followed by spontaneous dissociation of the hydroxysulfate group to form SO_3 and **GTX1-OH/GTX2-OH**. For the **GTX3/GTX4** epimers, the distances from the oxygen atom of the hydroxysulfate group to the hydrogen atom of the protonated guanidine group at N-9 are much larger, making comparable dissociation reactions very unlikely to occur. The calculated free energy profiles is shown below for dissociation of **GTX1** (red line) and **GTX2** (black line). The structures for the reactant (R), transition state (TS) and product (PR) are shown exemplary for the dissociation of **GTX1**.

Figure 5. CID spectra of protonated GTX precursor ions: collisional activation of (a, b) m/z 412, **GTX1** and **GTX4**; (c, d) m/z 396, **GTX2** and **GTX3**.

Figure 6. The proposed mechanism for H_2O and SO_3 eliminations from protonated **GTX3/GTX4** and measured breakdown and appearance curves for ion species involved in this mechanism (shown for **GTX3**) (*top*). Calculated free energy profile for these reactions (*bottom*). (For reasons of simplicity, only the structures for **GTX3** are shown in the bottom diagram.)