UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia

**Isolamento e caracterização de cianopeptídeos produzidos por
Microcystis aeruginosa e avaliação da toxicidade em embriões de
*Danio rerio***

Kazumi Kinoshita Teramoto

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia

Fisiopatologia e Toxicologia

**Isolamento e caracterização de cianopeptídeos produzidos por
Microcystis aeruginosa e avaliação da toxicidade em embriões de
*Danio rerio***

Kazumi Kinoshita Teramoto

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2020

Kazumi Kinoshita Teramoto

Isolamento e caracterização de cianopeptídeos produzidos por *Microcystis aeruginosa* e avaliação da toxicidade em embriões de *Danio rerio*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Dr. Ernani Pinto Junior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020

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

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T315i Teramoto, Kazumi Kinoshita
Isolamento e caracterização de cianopeptídeos produzidos por
Microcystis aeruginosa e avaliação da toxicidade em embriões de *Danio rerio*. / Kazumi Kinoshita Teramoto. -- São Paulo, 2020.
189p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e
Toxicologia)
Orientador: Pinto, Ernani.

1. Toxicologia 2. Ecotoxicologia. 3. Cianobactéria. 4.
Espectrometria de massa : Análise : Toxicologia. I. T. II. Pinto, Ernani,
orientador.

615.9 CDD

Dedico este trabalho ao meu
marido, pelo amor incondicional e
por sempre acreditar em mim
mesmo quando eu já havia
desistido.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Ernani, pela oportunidade, orientação e pelo voto de confiança nesses 8 anos de parceria. Obrigada por sempre acreditar no meu trabalho. O ciclo irá se concluir, mas que a amizade perdure.

Aos meus pais pelo carinho e amor incondicional. Não seria nada sem vocês! Itsumo Arigatou!

Ao meu irmão Noboru por sempre estar presente e disposto a me ajudar nos momentos de sufoco e por sempre topar as minhas loucuras.

À minha família por todo o apoio. Em especial à Eiko titia por sempre lembrar da sobrinha querida e à minha sogra Armilinda e à Batian por me tratarem com tanto carinho e amor.

Ao Teras, por ser simplesmente a melhor pessoa que já conheci na vida! Obrigada por não me deixar desistir e acreditar em mim até o final. Sem você nada disso seria possível. Te amo incondicionalmente!

Aos colegas e amigos do LTPNA, por tornarem o dia-a-dia do trabalho mais divertido e agradável. Agradeço a todos, inclusive aos que já passaram por lá, por todos os ensinamentos, conselhos, ajudas, risadas e gordices.

À Miriam Sanz e ao Felipe Dorr pelos ensinamentos e auxílio nas análises por espectrometria de massas e RMN

Ao Prof. Roberto R. Salinas do Instituto de Química da USP pelas análises de RMN

À Dra. Luciani Carvalho e Bianca Ventura da Faculdade de Medicina da USP pelos experimentos com zebrafish

Às grandes amigas que o laboratório me deu e que levarei para a vida toda, Fabi, Raquel e Fê, obrigada pela companhia, conselhos, bagunça, risadas. Nossas vidas seguiram caminhos diferentes, mas vocês terão sempre um lugar especial no meu coração.

Às minhas melhores amigas de infância, Melissa e Priscilla, que, apesar de não vê-las com a frequência que gostaria, estão sempre lá quando preciso e não há distância que abale nossa amizade.

Ao bonde do Japão por todos os momentos de descontração, churrascos, viagens, baladas, barzinhos. Obrigada por me fazerem esquecer um pouco da loucura desse mundão e tornar os dias mais engraçados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Farmácia

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e FUSP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que estiveram presentes na minha vida, Muito Obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

TERAMOTO, K.K. **Isolamento e caracterização de cianopeptídeos produzidos por *Microcystis aeruginosa* e avaliação de toxicidade em embriões de *Danio rerio***. 2020. f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Cianobactérias do gênero *Microcystis* são consideradas cosmopolitas e são as mais recorrentes em florações, sendo frequentemente associadas às hepatotoxinas microcistinas. Além das conhecidas toxinas, as cianobactérias produzem uma vasta gama de metabólitos secundários com um amplo repertório de atividades bioativas. A co-ocorrência de cianotoxinas e outros cianopeptídeos em concentrações semelhantes durante eventos de floração de cianobactérias é bastante comum e nem sempre os efeitos negativos são limitados às toxinas produzidas, o que torna indispensável a caracterização e a investigação da toxicidade desses outros compostos de forma individual. O objetivo do trabalho foi identificar e isolar cianopeptídeos produzidos por *M. aeruginosa* LTPNA 08, caracterizá-los estruturalmente por RMN e LC-HR-QTOF-MS/MS e avaliar sua toxicidade aguda em embriões de *D. rerio*. Foram isolados dois cianopeptídeos, a MG 770, reportada em trabalhos anteriores, e um composto desconhecido de 582 Da, que foram caracterizados por RMN e LC-HR-QTOF-MS/MS. Os dados espectroscópicos obtidos, comparados com dados da literatura, revelaram que a MG 770 apresenta a mesma estrutura molecular da MG 478 e o composto de 582 Da foi confirmado como sendo uma microciclâmida, reportados por Ishida et al. (2000 a, b), respectivamente. Os dados de RMN comparativos identificaram a microciclâmida (A) e a microciclâmida GL582, ambos reportados por Raveh et al. (2010) como possíveis estruturas do composto de 582 Da. O efeito tóxico dos cianopeptídeos isolados foi avaliado por meio do ensaio FET com embriões de *D. rerio*. A microciclâmida (583 Da) causou letalidade em 62% dos animais, após 96 h de exposição na concentração de 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, com evidências de cardiotoxicidade (edemas cardíacos). O valor de CL_{50} calculado para a microciclâmida foi de 42,98 (37,79-48,89) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A MG 770, por outro lado, não apresentou efeitos tóxicos ou teratogênicos, após 96 hpf, em nenhuma das concentrações testadas e por isso a sua CL_{50} não pode ser calculada. Ambos os compostos foram considerados de baixa toxicidade. Extratos brutos aquoso (EBA) e metanólico (EBM) de LTPNA 08 também foram avaliados por 96 h e mostraram alta taxa de letalidade na concentração de 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os valores de CL_{50} obtidos para o EBA e o EBM foram de 0,25 (0,15-0,27) e 0,46 (0,40-0,52) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Não foram observados efeitos teratogênicos em nenhum dos extratos e o efeito cardiotóxico foi observado apenas no EBM na concentração de 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. O método de triagem desenvolvido para a detecção de microgininas por LC-QqQ-MS/MS em modo *precursor ion scan* identificou compostos suspeitos em 11 amostras de cianobactérias. A confirmação dos compostos foi feita por LC-HR-QTOF-MS/MS, que identificou a presença das microgininas em 7 das 9 amostras de cianobactérias isoladas e em 2, no amostras ambientais. Foram identificadas no total, 19 variantes de MG, das quais 11 já foram descritas na literatura e as demais foram tentativamente caracterizadas através da comparação dos espectros de fragmentação de MG conhecidas. O método de *precursor ion scan* se mostrou rápido e sensível na busca por espécies produtoras de microgininas e triagem desses compostos em amostras de biomassa de cianobactérias. Os cianopeptídeos estudados neste trabalho apresentaram baixa toxicidade aguda em *D. rerio*.

Palavras-chave: Cianobactérias, microginina, microciclâmida, *zebrafish*

ABSTRACT

TERAMOTO, K.K. **Isolation and characterization of cyanopeptides produced by *Microcystis aeruginosa* and toxicity evaluation in *Danio rerio* embryos.** 2020. f. Thesis (Doctorate degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Microcystis is a common bloom forming cyanobacterial genus which has a cosmopolitan distribution and frequently associated with the hepatotoxins microcystin. Beyond the well-known cyanotoxins, cyanobacteria produce a wide range of biologically active secondary metabolites. The co-occurrence of cyanotoxins and other cyanopeptides at similar concentrations during cyanobacterial blooms events is common and the negative effects are not always limited to the toxins produced, which makes it essential to investigate and characterize the toxicity of these other compounds individually. The aim of this work was to identify and isolate cyanopeptides produced by *M. aeruginosa* LTPNA 08, characterize them structurally by NMR and LC-HR-QTOF-MS / MS and evaluate their acute toxicity in *D. rerio* embryos. Two cyanopeptides, MG 770 and an unknown compound of 582 Da, were isolated and characterized by NMR and LC-HR-QTOF-MS/MS. The spectroscopic data obtained, compared with data from the literature, revealed that MG 770 has the same molecular structure as MG 478 and the 582 Da compound was confirmed to be a microcyclamide, previously reported by Ishida et al. (2000 a, b), respectively. Comparative NMR data identified microcyclamide (A) and microcyclamide GL582, both reported by Raveh et al. (2010), as possible structures of the 582 Da compound. The toxic effect of the isolated cyanopeptides was evaluated using *D. rerio* embryos (FET assay). Microcyclamide (583 Da) caused lethality in 62% of the animals, after 96 h of exposure to 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, with evidence of cardiotoxicity (pericardiac edema). The LC_{50} value calculated for microcyclamide was 42.98 (37.79-48.89) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. MG 770, on the other hand, had no toxic or teratogenic effects, after 96 hpf, in any of the tested concentrations and LC_{50} cannot be calculated. Both compounds were considered to be of low toxicity. Crude aqueous (EBA) and methanolic (EBM) extracts of LTPNA 08 were also evaluated for 96 h and showed a high lethality rate at a concentration of 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The LC_{50} values obtained for EBA and EBM were 0.25 (0.15-0.27) and 0.46 (0.40-0.52) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. No teratogenic effects were observed in any of the extracts and the cardiotoxic effect was observed only in EBM at a concentration of 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The screening method developed for the detection of microginins by LC-QqQ-MS/MS on precursor ion scan mode identified suspicious compounds in 11 samples. Microginins confirmation was performed by LC-HR-QTOF-MS/MS, which identified the presence in 7 of the 9 isolated cyanobacteria samples and in 2 environmental samples. In total, 19 MG variants were identified, of which 11 have already been described in the literature and the remaining have been tentatively characterized by comparing fragmentation spectra of known MG. The precursor ion scan method was shown to be fast and sensitive in the search for microginins producing species and screening these compounds in samples of cyanobacteria biomass. The cyanopeptides studied in this work showed low acute toxicity in *D. rerio*.

Keywords: Cyanobacteria, microginins, microcyclamide, *zebrafish*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> Kützing (Kützing).....	30
Figura 2: Estruturas químicas das principais cianotoxinas encontradas em corpos d'água com floração de cianobactérias.	33
Figura 3: Estrutura geral das microcistinas.	37
Figura 4: Estruturas químicas de algumas variantes das principais classes de cianopeptídeos.	39
Figura 5: Estrutura geral das microgininas (Okino et al. 1993a) e esquema das possíveis combinações de aminoácidos.....	41
Figura 6: Estrutura química de uma A. microciclâmica (Ishida et al. 2000b) e B. aeruciclâmica (Ishida et al. 2000b).....	43
Figura 7: Padrão de fragmentação de peptídeos, com formação de íons -a, -b, -c e -x, -y e -z (nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann).	51
Figura 8: Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento do <i>D. rerio</i>	58
Figura 9: Fluxograma ilustrativo do processo de extração e fracionamento do extrato bruto de LTPNA 08 e NIES-299.....	68
Figura 10: Fluxograma ilustrativo do preparo dos extratos brutos EBA e EBM utilizados nos ensaios de FET.....	79
Figura 11: Fluxograma ilustrativo do teste de toxicidade com embriões de <i>D. rerio</i>	82
Figura 12: Curvas de crescimento da <i>M.aeruginosa</i> (LTPNA 08) em meio ASM-1. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	84
Figura 13: Cromatograma representativo do extrato bruto hidroalcoólico de <i>M.aeruginosa</i> LTPNA 08 obtido por LC-HR-QTOF-MS/MS (ESI+). Os picos enumerados correspondem a (1) MC-RR; (2) desconhecido; (3) desconhecido; (4) desconhecido; (5) MG 756; (6) Micropeptina B; (7) Cianopeptolina 972C (8) Micropeptina A (9) MG770; (10) desconhecido; (11) MC-YR; (12) MC-LR e (13) MC-HilR.	85
Figura 14: Espectros de massas (MS e MS ²) dos cianopeptídeos identificados na linhagem de <i>Microcystis</i> sp. LTPNA 08, analisados por LC-ESI-MS/MS (QTOF) em modo positivo. a) MC-RR (m/z 519.7899); b) desconhecido (m/z 569.1758); c) desconhecido (m/z 583.1936); d) desconhecido (m/z 742.4420); e) MG 756 (m/z 756.4563); f) micropeptina B (m/z 959.5488); g) cianopeptolina 972C (m/z 973.5634); h) micropeptina A (m/z 987.5780); i) MG 770 (m/z 770.4746); j) desconhecido (m/z 784.4880); k) MC-YR (m/z 1045.5383); l) MC-LR (m/z 995.5626) e m) microcistina (m/z 1009.5737). Em vermelho estão identificados os fragmentos considerados diagnósticos de determinadas classes de cianopeptídeos.....	87
Figura 15: Cromatogramas de pico base (Base peak chromatogram) do extrato bruto metanólico de NIES-299 (A) e dos íons extraídos (m/z 887.5, 921.4, 853.5 e 758.4) (B).	96
Figura 16: Cromatograma de pico base (Base peak chromatogram) das frações obtidas por extração em fase sólida (elução com 40, 60, 80 e 100% de metanol acidificado com 0,1% HCOOH) a partir de 1g de extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08. Os picos enumerados correspondem a (1) MC-RR, (2) desconhecido (m/z 583), (3) cianopeptolinas, (4) MG 756, (5) MG 770 e (6) MC-LR.	97
Figura 17: a) Cromatograma de pico base (Base peak chromatogram) das frações obtidas por extração em fase sólida (elução com 20, 40, 60 e 80% de metanol acidificado com 0,1% de HCOOH), a partir de 1g de extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i> NIES-299. b) Cromatograma de íon extraído (m/z 887.5, 921.4,	

853.5 e 758.4). Os picos enumerados correspondem a (1) MG 299-A (m/z 887.5), (2) MG 299-C (m/z 853.5), (3) MG 299-D (m/z 758.4) e (4) MG 299-B (m/z 921.4) 98

Figura 18: Cromatograma representativo da fração metanólica acidificada de 60% (SPE), obtidas a partir do extrato de 1 g de biomassa de *M. aeruginosa* LTPNA 08, e os espectros de absorção UV dos respectivos picos coletados, monitorados em comprimento de onda 225 nm. As listras diagonais enumeradas indicam as subfrações coletadas que correspondem aos compostos (1) MC-RR; (2) pico desconhecido; (3) mistura de cianopeptídeos; (4) MG765; (5) MG770 e (12) MC-LR..... 100

Figura 19: Cromatograma representativo da fração metanólica acidificada de 80% (SPE) obtido a partir do extrato de 1 g de biomassa de *M. aeruginosa* LTPNA 08, e espectros de absorção UV dos respectivos picos coletados em gradiente isocrático de 40% de B e monitorados em 278 nm. As listras diagonais enumeradas indicam as subfrações coletadas que correspondem aos compostos (1) MG765; (2) MG770 e (3) MC-LR. 101

Figura 20: Cromatograma representativo da subfração contendo o composto desconhecido (3) e os respectivos espectros MS e MS₂, adquiridos por LC-HR-QTOF-MS/MS 103

Figura 21: Cromatograma representativo da subfração contendo MG 756 (5) e os respectivos espectros MS e MS₂, adquiridos por LC-HR-QTOF-MS/MS..... 103

Figura 22: Cromatograma representativo da subfração contendo MG 770 (9) e os respectivos espectros MS e MS₂. 104

Figura 23: Cromatograma representativo da fração metanólica acidificada de 80% obtida a partir do pré-fracionamento por SPE de 2 g de biomassa de NIES-299. As listras diagonais enumeradas indicam as subfrações coletadas, monitoradas nos comprimentos de onda de 278 nm, que correspondem aos compostos (1) MG 299-A (m/z 887); (2) MG 299-C (m/z 853); (3) MG 299-D (m/z 758) e MG 299-B (m/z 921). 105

Figura 24: Cromatograma representativo da subfração purificada contendo MG-299A e os respectivos espectros de absorção UV e massas *full scan* (MS). 106

Figura 25: Cromatograma representativo da subfração purificada contendo MG-299C e os respectivos espectros de absorção UV e massas *full scan* (MS). 106

Figura 26: Cromatograma representativo da subfração purificada contendo MG-299B e os respectivos espectros de absorção UV e massas *full scan* (MS). 107

Figura 27: Estrutura química proposta para o composto 3, mostrando as correlações assinaladas nos experimentos de RMN..... 109

Figura 28: Espectro de RMN ¹H (geral e ampliado) do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆. 110

Figura 29: Espectros de ¹H-¹⁵NHSQC do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆. 111

Figura 30: Espectros de ¹H-¹³C HSQC do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆. 111

Figura 31: Espectros de ¹H-¹³C HSQC editado do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆. Em rosa estão assinalados os carbonos CH₃ e CH e em verde os carbonos CH₂. 112

Figura 32: Espectros de ¹H-¹H TOCSY do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆, indicando os sistemas de spin dos aminoácidos alanina (Ala), isoleucina (Ile) e *N*-Metilhistidina (*N*-MeHis). . 113

Figura 33: Espectros de ¹H-¹³C HMBC do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆. A) Espectro ampliado da região dos aromáticos; B) Espectro ampliado da região dos alifáticos 114

Figura 34: Espectros ¹H-¹H NOESY do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d₆. 115

Figura 35: (A) Estrutura química da Microciclâmida, isolada da *Microcystis aeruginosa* NIES-299 (Ishida et al. 2000b) e da Microciclâmida A isolada de uma floração de *Microcystis* sp. (Raveh et al. 2010). (B) Estrutura química da Microciclâmida GL582 (Raveh et al. 2010) 116

Figura 36: Espectros MS e MS ₂ obtidos por LC-HR-ESI-QTOF-MS/MS para o composto 3 , de <i>m/z</i> 583.	117
Figura 37: Estrutura química proposta para a MG 770, mostrando as correlações assinaladas nos experimentos de RMN.	122
Figura 38: Espectro 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC do composto MG 770 em DMSO- <i>d</i> ₆	122
Figura 39: Espectro 1D ¹ H do composto MG 770 em DMSO- <i>d</i> ₆	123
Figura 40: Espectro 2D ¹ H- ¹³ C HSQC editado do composto MG 770 em DMSO- <i>d</i> ₆	123
Figura 41: Espectro 2D de ¹ H- ¹ H TOCSY do composto MG 770 em DMSO- <i>d</i> ₆ , destacando os (a) hidrogênios fenólicos e os sistemas de <i>spins</i> dos aminoácidos: (b) valina, (c) tirosina, (d) <i>N</i> -metilvalina, (e) <i>N</i> -metiltirosina.	124
Figura 42: Espectros MS e MS ² da MG 770, isolada da linhagem <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08, obtidos por LC-ESI-QTOF-MS/MS	127
Figura 43: Espectros MS e MS ² da MG 756 obtidos por LC-ESI-QTOF-MS/MS em modo positivo de ionização.	129
Figura 44: Espectros MS da amostra CCIBt 3106 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas na amostra por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	138
Figura 45: Espectros MS das amostras LTPNA 08 e 09 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	140
Figura 46: Espectros MS da amostra NPCD-01 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	143
Figura 47: Espectros MS da amostra NIES-99 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	144
Figura 48: Espectros MS da amostra NIES-299 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	145
Figura 49: Espectros MS da amostra NIES-478 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	147
Figura 50: Espectros MS da amostra ambiental AMERICANA obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	150
Figura 51: Espectros MS da amostra ambiental FUNIL obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo <i>Precursor ion scan</i> (A) e os espectros MS e MS ₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).	152
Figura 52: Gráfico representativo da produção de cianopeptídeos no EBA e EBM.	155
Figura 53: Coloração dos EBA (A) e EBM (B) obtidos após extração de 200 mg de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08 com (A) água reconstituída e (B) metanol 70%.	156
Figura 54: Taxa de mortalidade (%) dos embriões expostos por 96 hpf às concentrações de 0,0016, 0,008, 0,04, 0,2 e 1 mg.mL ⁻¹ de extrato bruto aquoso (EBA), em comparação ao controle negativo.	156

Figura 55: Taxa de mortalidade (%) dos embriões expostos por 96 hpf às concentrações de 0,0016, 0,008, 0,04, 0,2 e 1 mg.mL ⁻¹ de extrato bruto metanólico (EBM), em comparação ao controle negativo.	157
Figura 56: Embriões com 96 hpf. (A) Animal do grupo controle negativo, com desenvolvimento cardíaco normal (*) e (B) Animal exposto ao tratamento com EBM (1 mg.mL ⁻¹) com edema no pericárdio (→)	158
Figura 57: Gráfico da taxa de mortalidade dos embriões expostos às concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 µg mL ⁻¹ do composto MG 770 por 96 hpf. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	160
Figura 58: (A) Gráfico da taxa de mortalidade dos embriões de <i>D. rerio</i> expostos às concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 µg mL ⁻¹ do composto 583 Da por 96 hpf e (B) Curva de dose-resposta obtido após 96 h de exposição. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	161
Figura 59: Embriões com 96 hpf. (A) Animal do grupo controle negativo, com desenvolvimento cardíaco normal (*) e (B) Animal exposto ao tratamento com EBM (50 µg.mL ⁻¹) com edema no pericárdio (→).	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Uma visão geral das cianotoxinas produzidas por cianobactérias e seus principais mecanismos de ação, efeitos e toxicidade.....	34
Tabela 2: Definições para o termo “Ecotoxicologia” encontradas da literatura.....	55
Tabela 3: Informações gerais sobre as microgininas isoladas neste trabalho.....	64
Tabela 4: Composição do meio ASM-1 (Gorham et al. 1964).....	66
Tabela 5: Gradientes de eluição utilizados no método de isolamento das microgininas e do composto de m/z 583 por HPLC-DAD semi-preparativo. A) Gradiente de eluição utilizado no primeiro isolamento e B) Gradiente de eluição otimizado utilizado no processo de re-isolamento e purificação.....	70
Tabela 6: Condições cromatográficas utilizadas para detecção e identificação análise por LC-MS/MS (Q-TOF).	72
Tabela 7: Parâmetros otimizados da fonte de ionização <i>electrospray</i> do espectrômetro de massas triplo-quadrupolo.....	75
Tabela 8: Parâmetros de aquisição em modo <i>precursor ion scan</i> otimizados para as análises de microgininas.....	75
Tabela 9: Condições cromatográficas utilizadas para a triagem de microgininas por LC-QqQ-MS/MS em modo <i>Precursor ion scan</i>	76
Tabela 10: Condições cromatográficas utilizadas para a confirmação das microgininas detectadas no método de <i>precursor ion</i>	77
Tabela 11: Composição da água reconstituída (ABNT, 2016).....	78
Tabela 12: Tempos de retenção (TR), m/z experimentais, fórmulas moleculares, erros e valores de mSigma para os peptídeos detectados nos extratos de <i>Microcystis</i> sp. LTPNA 08.....	86
Tabela 13: Massas de fragmentos indicativos de quatro estruturas parciais de peptídeos da classe das cianopeptolinas.....	95
Tabela 14: Cianopeptídeos isolados a partir de extrato bruto de <i>M.aeruginosa</i> LTPNA 08 (Fração SPE MeOH acidificado 60%)	102
Tabela 15: Dados de RMN do composto desconhecido de m/z 583, isolado da <i>Microcystis</i> sp. LTPNA08, em DMSO-d6 e dados comparativos obtidos da literatura (Ishida et al. 2000b).....	108
Tabela 16: Atribuição dos íons fragmento do composto 3 , de m/z 583, gerados por LC-HR-QTOF-MS/MS.	118
Tabela 17: Dados comparativos de ¹ H e ¹³ C RMN da microginina 478 (Ishida et al., 2000) e da MG770, isolado da <i>Microcystis</i> sp. LTPNA08, em DMSO-d6.....	120
Tabela 18: Atribuição dos fragmentos obtidos nos espectros MS ² para os compostos MG 756 e MG 770.	130
Tabela 19: Detecção e possível identificação de variantes de microgininas após triagem suspeita por LC-QqQ-MS/MS em modo <i>precursor ion scan</i>	131
Tabela 20: Tempos de retenção (TR), m/z experimental e teórica, fórmulas moleculares, erros e valores de mSigma para as microgininas detectadas em extratos de cianobactérias e amostras ambientais, por LC-ESI-QTOF-MS/MS.....	135
Tabela 21: Valores de CL ₅₀ , NOAEL e LOAEL com intervalos de confiança de 95% obtidos para os embriões/larvas de <i>D. rerio</i> expostos aos extratos aquoso e metanólico de <i>M. aeruginosa</i> (LTPNA 08) após 96 h de exposição.....	157

Tabela 22: Congeneres de Microgininas (MG) e suas respectivas sequencias de aminoácidos.....	183
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

1D – unidimensional

2D – bidimensional

AcF – ácido fórmico

ACN – acetonitrila

Ala – alanina

ANTX-a – anatoxina-a

ANTX-a (s) – anatoxina-a (s)

Adda – ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico

CP – cianopeptolinas

C₁₈ – cartucho de octadecil-silano

CE – energy collision / energia de colisão

CO₂ – dióxido de carbono

COSY – *homonuclear COrrrelation SpectroscopY*

CYL – cilindropermopsina

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido deuterado

DNA – *deoxyribonucleic acid* / ácido desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

Dpf – dias pós fertilização

dcSTX – decarbamoil saxitoxina

dcneoSTX – decarbamoil neosaxitoxina

dcGTX – decarbamoilgoniautoxina

doSTX – desoxicarbamoil saxitoxina

doneoSTX – desoxicarbamoil neosaxitoxina

doGTX – desoxicarbamoil gonautoxina

ECA - enzima conversora de angiotensina

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ESI – ionização por *electrospray*

GTX – gonautoxina

His – histidina

Hpf – horas pós fertilização

HPLC – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

HPLC-DAD – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HRMS – espectrometria de massas de alta resolução

HRFABMS – espectrometria de massas de alta resolução por bombardeamento de átomos rápidos

HSQC - Heteronuclear MultipleQuantum Coherence

HTyr – homotirosina

IC₅₀ – concentração de inibição à 50% dos organismos

i.p – intraperitoneal

Ile – isoleucina

LC-MS – Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS – Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

LC₅₀ – concentração letal à 50% dos organismos

LD₅₀ – dose letal à 50% dos organismos

Leu – leucina

LTPNA – Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas

Mdha - *N*-metil dehidroalanina

*Me*His – metilhistidina

MeOH – metanol

*Me*Oxz – metiloxazol

*Me*Tyr – metiltirosina

*Me*Val – metilvalina

MC – microcistinas

MG – microgininas

MIB – 2-metilisoborneol

MRM – monitoramento de reações múltiplas

MS2 – tandem MS

MS/MS – tandem MS

m/z – razão massa carga

NeoSTX – neosaxitoxina

NIES – National Institute for Environmental Studies

NOD – nodularina

NOESY – Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

PP1 – proteína fosfatase 1

PP2 – proteína fosfatase 2

PSP – *paralytic shellfish poisoning*

ppm – partes por milhão

QqQ – triplo quadrupolo

QTOF – Quadrupolo tempo-de-vôo

UV – ultravioleta

UV-Vis – ultravioleta visível

RMN – ressonância magnética nuclear

rpm – rotação por minuto

SPE – *solid phase extraction* / extração em fase sólida

STX – saxitoxina

Thz – tiazol

TOCSY – *T*otal *C*orrelation *S*pectroscopy

TOF – *Time-of-flight* – Tempo de vôo

TR – tempo de retenção

Tyr – tirosina

Val – valina

VMP – valor máximo permitido

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	29
1.1.	CIANOACTÉRIAS	29
1.1.1.	Gênero <i>Microcystis</i> (KÜTZING <i>ex</i> Lemmermann 1907).....	30
1.2.	EUTOFIZAÇÃO E FLORAÇÕES DE CIANOACTÉRIAS	31
1.3.	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR CIANOACTÉRIAS	33
1.3.1.	Cianotoxinas	33
1.3.2.	Cianopeptídeos.....	38
1.4.	MÉTODOS DE DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CIANOPEPTÍDEOS	46
1.4.1.	Elucidação estrutural de peptídeos por espectrometria de massas	49
1.4.2.	Elucidação estrutural de peptídeos por RMN	51
1.5.	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	54
1.5.1.	Organismo teste: <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	57
2.	JUSTIFICATIVA	60
3.	OBJETIVOS	62
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1.	SOLVENTES, REAGENTES E PADRÕES	63
4.2.	SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE CIANOACTÉRIAS	63
4.3.	MANUTENÇÃO E CULTIVO DE CIANOACTÉRIAS	66
4.4.	CRESCIMENTO CELULAR	67
4.5.	EXTRAÇÃO DOS CIANOPEPTÍDEOS PARA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO.....	67
4.6.	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CIANOPEPTÍDEOS	69
4.7.	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE CIANOPEPTÍDEOS.....	71
4.7.1.	Espectrometria de massas	71
4.7.2.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	73
4.8.	TRIAGEM DE MICROGININAS POR LC-MS/MS EM MODO DE VARREDURA DE ÍON PRECURSOR (<i>PRECURSOR ION SCAN</i>)	74
4.9.	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DE <i>DANIO RERIO</i>	77
4.9.1.	Preparo das soluções-teste	77
4.9.2.	Obtenção dos embriões de <i>D. rerio</i>	80
4.9.3.	FET - Ensaio de embriotoxicidade	80
4.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1.	SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE CIANOACTÉRIAS	83
5.2.	CRESCIMENTO CELULAR	83
5.3.	AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE OLIGOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS PELAS CIANOACTÉRIAS LTPNA 08 E NIES-299	84
5.4.	EXTRAÇÃO DOS CIANOPEPTÍDEOS PARA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO.....	96
5.5.	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CIANOPEPTÍDEOS DE INTERESSE.....	99
5.6.	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO 3 DE 582 DA.....	107
5.7.	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA MG 770	118
5.8.	TRIAGEM DE MICROGININAS PELO MÉTODO DE VARREDURA DO ÍON PRECURSOR (<i>PRECURSOR ION SCAN</i>) 130	
5.9.	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DE <i>D.RERIO</i>	154
5.9.1.	Avaliação da toxicidade de extratos brutos de <i>M. aeruginosa</i> (LTPNA 08).....	154
5.9.2.	Avaliação da toxicidade de cianopeptídeos isolados de <i>M. aeruginosa</i> (LTPNA 08)	160
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	166
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168

8. ANEXO 1..... 183

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cianobactérias

As cianobactérias pertencem a um grupo muito diverso de microrganismos procariontes, Gram-negativos e fotossintéticos, com mais de 350 gêneros e cerca de 1300 espécies já descritas e validadas pelo sistema de classificação taxonômico proposto por Komárek et al., 2014 ((Komarek et al. 2014); (Komárek 2016); (Shestakov e Karbysheva 2017); (Hauer e Komárek 2020). Consideradas uma das formas de vida mais antigas capazes de realizar fotossíntese oxigênica, as cianobactérias foram responsáveis pela criação da atmosfera aeróbica terrestre há 2,4 - 2,1 bilhões de anos, tornando possível a evolução de formas de vida mais complexas ((Shestakov e Karbysheva 2017), (Sánchez-Baracaldo e Cardona 2020)). No entanto, o seu aparecimento data de muitos anos antes, no Éon Arqueano (2,9 – 2,6 bilhões de anos atrás), habitando ambientes com baixo teor de oxigênio e tornando-se os principais produtores primários perto do final do período arqueano ((Shestakov e Karbysheva 2017); (Cardona et al. 2019)). Além de sua fundamental contribuição na oxigenação da atmosfera, elas desempenham também um importante papel no ciclo biogeoquímico do carbono, nitrogênio, fósforo, entre outros elementos ((Codd 2000); (Paerl e Paul 2012); (Shestakov e Karbysheva 2017)).

As cianobactérias desenvolveram ao longo dos milhares de anos de evolução, mecanismos e estratégias que permitiram a sua adaptação e crescimento nos mais diversos ambientes (Huang e Zimba 2019). São encontradas em praticamente todos os ecossistemas, desde aquáticos (ambientes de água doce, marinha ou salobra) a terrestres, inclusive em ambientes com condições extremas de temperatura e salinidade, tais como desertos, fontes termais, geleiras e salinas ((Paerl 2002); (Oliver e Ganf 2002); (Pentecost e Whitton 2002); (Oren 2002); (Vincent 2002); (Wynn-Williams 2002); (Imhoff 2017); (Hoham e Remias 2019)). Podem ser encontradas aderidas ao fundo de lagos e rios (bentônicos) ou aderidas às rochas e plantas, podendo viver em simbiose com plantas ou fungos ((Pentecost e Whitton 2002); (Adams 2002); (Rikkinen 2017)). A sua ampla distribuição geográfica reflete a grande variedade de espécies com propriedades morfológicas e fisiológicas diversas.

Em relação à morfologia, as formas unicelulares podem ser encontradas em formatos esféricos, ovóides, fusiformes ou cilíndricos e podem se agregar formando colônias, que são envoltas por uma bainha de mucilagem. As formas pluricelulares são encontradas na forma de filamentos (retos ou espiralados), compostos por uma cadeia de células denominadas tricomas (Chorus e Bartram 1999). Alguns grupos apresentam células diferenciadas como os

heterocistos, responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico, e os acinetos, células de resistência que se desenvolvem quando as condições ambientais não são favoráveis (Humbert e Fastner 2017).

O aparato fotossintético das cianobactérias é similar ao dos vegetais superiores e algas verdes, tendo como principal pigmento de captação de luz a clorofila-a. Sintetizam ainda pigmentos acessórios, como as ficobilinas (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) e alguns carotenoides, que auxiliam tanto na captação de luz, como na proteção contra a foto-oxidação da clorofila-a, permitindo que as cianobactérias cresçam em condições de pouca luz ((Yoo et al. 1995); (Takaichi e Mochimaru 2007); (Humbert e Fastner 2017)). A ficocianina, juntamente com os demais pigmentos, confere às cianobactérias coloração azul-esverdeada característica deste grupo. São capazes de adaptar a sua pigmentação de acordo com a intensidade luminosa e às vezes até de acordo com a cor da luz disponível, alterando, assim, todo o metabolismo da cianobactéria Maury (Maurya et al. 2014).

1.1.1. Gênero *Microcystis* (KÜTZING *ex* Lemmermann 1907)

Microcystis (Figura 1) é um gênero colonial, pertencente à ordem Chroococcales e à família Microcystaceae, tipicamente planctônico e que comumente forma florações em corpos d'água eutrofizados. As células apresentam morfologia esférica e são frequentemente encontradas na forma de colônias, envoltas por uma camada de mucilagem incolor. As colônias podem ser microscópicas ou macroscópicas, esféricas, irregulares ou alongadas e às vezes formadas por subcolônias (Bicudo e Menezes 2006). Possuem também vacúolos de gás e aerótopos que permitem a sua movimentação na coluna d'água em função da disponibilidade de luz e nutrientes.

Figura 1: Fotomicrografia da espécie *Microcystis aeruginosa* Kützing (Kützing).

Fonte: Guiry e Guiry, 2015

São conhecidas mundialmente cerca de 25 espécies de *Microcystis*, todas de ambientes aquáticos ((Bicudo e Menezes 2006); (Hauer e Komárek 2020)). Entretanto, a identificação em nível específico é bastante difícil e, por vezes, problemática. Muitas espécies de *Microcystis* são produtoras de microcistina, uma potente cianotoxina com ação hepatotóxica, frequentemente associada à episódios de intoxicação. Conforme Sant'Anna et al. (2008), *Microcystis* é o gênero com mais ampla distribuição em território brasileiro e que apresenta a maior incidência em florações tóxicas e não-tóxicas em reservatórios de abastecimento público. Por esse motivo estão entre as cianobactérias mais estudadas do ponto de vista ecológico e toxicológico, já que representam um sério problema de saúde pública.

1.2. Eutofização e florações de cianobactérias

As cianobactérias planctônicas podem proliferar de forma muito rápida quando as condições do meio são favoráveis para o seu crescimento, tais como alta temperatura, alta incidência de luz na coluna d'água e elevada disponibilidade de nutrientes no meio ((Zanchett e Oliveira-Filho 2013); (Janssen 2019)). A eutrofização dos corpos d'água é um dos principais fatores que influenciam na proliferação de cianobactérias em águas superficiais, que, somada aos efeitos das mudanças climáticas (aquecimento global, mudança nos padrões de precipitação, secas mais intensas) tem tornado os eventos de florações tóxicas mais frequentes e persistentes ((Paerl e Huisman 2009); (Zanchett e Oliveira-Filho 2013), (Huisman et al. 2018); (Svircev et al. 2019)).

A eutrofização é um processo natural no qual um corpo d'água recebe lenta e continuamente nutrientes do seu entorno. Entretanto, esse processo pode ser acelerado pela ação antrópica, através do aporte intenso de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) provenientes do despejo de efluentes domésticos, industriais e agrícolas na água (Khan e Mohammad 2014). O lançamento desses efluentes diretamente no ambiente sem tratamento ou tratados de forma inadequada é um dos maiores agravantes da ocorrência de florações de cianobactérias (Glibert 2017).

As florações ou *blooms* são caracterizadas pelo aumento da biomassa de cianobactérias em um período de tempo relativamente curto (entre alguns dias e 1 ou 2 semanas) em que se observa a dominância de mais de 80% de uma ou poucas espécies dentro da comunidade fitoplanctônica ((Azevedo e Brandão 2003); (Humbert e Fastner 2017)). O crescimento acelerado desses organismos nos meses mais quentes do ano pode formar densas camadas de

células na superfície dos reservatórios de água, comprometendo o seu uso para fins recreativos, e limitando o seu uso para a irrigação e consumo de água potável (Janssen 2019).

As florações de cianobactérias podem causar efeitos deletérios no meio ambiente e nas atividades humanas por meio do aumento da turbidez, limitando a passagem de luz na coluna d'água; redução do oxigênio dissolvido, causando a morte de peixes e invertebrados bentônicos; produção de compostos que conferem sabor e odor desagradáveis, perda de biodiversidade; e principalmente através da produção de compostos tóxicos (cianotoxinas) ((Codd 2000) ; (Merel et al. 2013); (Glibert 2017); (Huisman et al. 2018); (Janssen 2019)). Tudo isso gera grandes prejuízos econômicos e afeta diretamente a saúde pública, pois compromete a disponibilidade de água potável, recreação, agricultura, aquicultura e pesca (Janssen 2019).

Apesar da recorrência sazonal das florações tóxicas, nem todas as espécies são nocivas e nem todas as cepas dentro de uma espécie são capazes de sintetizar toxinas (Spoof et al. 2003). Assim como os pigmentos, a produção de cianotoxinas pode variar também em resposta às mudanças ambientais, ou outros interferentes. Uma espécie de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina e dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras e não produtoras de cianotoxinas (Dolman et al. 2012).

Eventos de florações de cianobactérias são relatados em praticamente todos os continentes do mundo (Benayache et al. 2019). Os gêneros formadores de floração mais comuns incluem *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* e *Trichodesmium* (Huisman et al. 2018). No Brasil, os gêneros *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* e *Microcystis*, são os de maior dominância, sendo o primeiro mais comum durante períodos secos e os dois últimos em períodos quentes e chuvosos (Soares et al. 2013). O gênero *Microcystis*, no entanto, é considerado o mais invasivo e de maior ocorrência em ambientes de água doce, frequentemente associado às florações tóxicas. Harke e colaboradores (2016) compilaram em um artigo de revisão a ocorrência e distribuição geográfica de florações de cianobactérias do gênero *Microcystis* e identificaram florações em pelo menos 108 países, dos quais, 79 relataram também a presença da hepatotoxina microcistina (Harke et al. 2016). Svirčev e colaboradores (2019) realizaram uma extensa revisão da literatura sobre a distribuição global das principais classes de cianotoxinas. Foram reportados a presença de cianotoxinas em ecossistemas de água doce de 66 países, em sua maioria europeus. Com exceção da Antártida, em todos os continentes (África, América (América do Norte, América Central e América do Sul), Ásia, Europa e Oceania (Austrália e Nova Zelândia)), o gênero mais

comumente encontrado em ambientes de água doce foi *Microcystis* spp. e as microcistinas as cianotoxinas mais dominantes (Svircev et al. 2019).

1.3. Metabólitos Secundários Bioativos produzidos por cianobactérias

1.3.1. Cianotoxinas

Em razão de sua diversificada composição bioquímica, as cianobactérias são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos, que podem afetar a atividade das enzimas celulares, interferir nas vias de sinalização das células, causar apoptose dos tecidos e causar inclusive a morte de organismos (Huang e Zimba 2019).

Dentre esses metabólitos, destacam-se as cianotoxinas, um grupo diverso de toxinas naturais com potencial para causar problemas ecotoxicológicos e afetar a saúde humana e animal. As cianotoxinas (Figura 2) são classificadas de acordo com suas estruturas químicas em peptídeos cíclicos, alcaloides ou lipopolissacarídeos, e ainda, classificadas de acordo com seus efeitos tóxicos em neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas e toxinas irritantes ao contato ((Chorus e Bartram 1999); (Hudnell 2008); ((Sarma 2012); (Metcalf e Codd 2012); (Meriluoto et al. 2017)). Na Tabela 1 estão listadas as principais classes de cianotoxinas e uma relação dos principais gêneros de cianobactérias produtoras, a natureza química das toxinas, mecanismo de ação e toxicidade da exposição aguda.

Figura 2: Estruturas químicas das principais cianotoxinas encontradas em corpos d'água com floração de cianobactérias.

Fonte: Adaptado de Cardozo et al. (2007).

Tabela 1: Uma visão geral das cianotoxinas produzidas por cianobactérias e seus principais mecanismos de ação, efeitos e toxicidade.

Cianotoxina	Gênero Produtor da toxina	Natureza química	Mecanismo de ação	LD ₅₀ *
Hepatotoxinas				
Microcistinas	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Plankthrix</i> , <i>Raphidiopsis</i> <i>Synechocystis</i>	Heptapeptídeo o cíclico	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	50 - >- 1200 µg/kg
Nodularinas	<i>Nodularia</i>	Pentapeptídeo cíclico	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	30 - 50 µg/kg
Neurotoxinas				
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> <i>Cylindrospermum</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> ,	Alcaloide	Agonista nicotínico irreversível	200-250 µg/kg
Anatoxina-a(s)	<i>Anabaena</i>	Alcaloide organofosforado	Inibição da acetilcolinesterase	20 µg/kg
Saxitoxinas (PSPs)	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Plankthrix</i>	Alcaloide carbamato	Bloqueio dos canais de sódio	10 µg/kg
Citotoxinas				
Cilindrospermopsinas	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Umezakia</i>	Alcaloide de guanidina	Inibição da síntese proteica e efeito genotóxico	2100 µg/kg (24h) 200 µg/kg (72h)
Dermatotoxinas				
Lungbiatoxinas	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>	Alcaloide	Causa eritema (dermatite), bolhas e necrose em mamíferos; potentes promotores de tumor dérmico	-
Afisiatoxina e Debromoafisiatoxina	<i>Lyngbya</i> , <i>Stylocheilus</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>	Alcaloide	Ativação da proteína quinase C; agente inflamatório e potentes promotores de tumor	300 µg/kg
Lipopolissacarídeos	Cianobactérias em geral	Lipopolissacarídeo	Agente inflamatório, irritantes gastrointestinais	45 – 190 mg/kg

* A LD₅₀ representa o valor da dose de toxina letal a 50% dos animais expostos; representada por µg de toxina/kg de peso corpóreo, com administração intra peritoneal).

Fonte: Adaptado de YADAV *et al.*, 2011 e SINGH *et al.*, 2017.

As toxinas são predominantemente encontradas no interior de células viáveis das cianobactérias tóxicas (fração intracelular), com pequenas concentrações sendo liberadas naturalmente para o meio (fração extracelular) (Hart et al. 1998); (Senogles et al. 2000)). No entanto, quando as células atingem a fase de senescência ou quando sofrem algum tipo de

estresse que cause danos à parede celular, sofrem lise liberando quantidades significativas da toxina intracelular para a coluna d'água ((Yoo et al. 1995); (Hart et al. 1998); (Azevedo e Brandão 2003)). Algumas retêm as toxinas durante a maior parte do ciclo de vida, enquanto outras as liberam no meio circundante à medida que são produzidas. A produção de cianotoxinas também pode variar, com produção constante ao longo de todo o crescimento, ou ainda, concentrando a produção em um determinado estágio do crescimento (fase exponencial ou estacionária).

Apesar da recorrência sazonal das florações tóxicas, nem todas as espécies são nocivas e nem todas as cepas são capazes de sintetizar toxinas (Spoof et al. 2003). Uma determinada espécie pode produzir mais de um tipo de toxina e dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras e não produtoras de cianotoxinas (Dolman et al. 2012). Assim como os pigmentos, a produção de cianotoxinas pode variar também em resposta às mudanças ambientais, ou outros interferentes ((Sivonen 1990); (Lukač e Aegerter 1993); (Kearns e Hunter 2000); (Briand et al. 2012); (Pimentel e Giani 2014); (Gehring e Wannicke 2014)).

As cianotoxinas podem se acumular em vários organismos aquáticos, especialmente em peixes, moluscos e frutos do mar ((Landsberg 2002); (Cazenave et al. 2006); (Ibelings e Chorus 2007); (Ferrão-Filho e Kozłowsky-Suzuki 2011); (Hardy et al. 2015)). A bioacumulação destes compostos pode afetar severamente a saúde de animais domésticos, selvagens e humanos, causando vários efeitos toxicológicos (Kujbida et al. 2006). Os sintomas causados pela intoxicação por cianotoxinas podem incluir náusea, fraqueza, insuficiência renal, irritação dérmica, gastroenterite, pneumonia, hepatotoxicidade e neurotoxicidade (Svircev et al. 2019). Dentre as cianotoxinas, os peptídeos hepatotóxicos (MCs) e as alcalóides neurotóxicos (ATXs e STXs) são consideradas as mais perigosas tanto para humanos como para os animais devido ao seu potencial bioacumulativo em órgãos como o fígado e o rim (Wiegand e Pflugmacher 2005).

As vias de exposição às florações de cianobactérias e cianotoxinas associadas incluem ingestão de água ((Francis 1878); (Stewart et al. 2008); (Svircev et al. 2019)), peixes e mariscos (Bhunja 2018) e suplementos alimentares e dietéticos contaminados ((Manali et al. 2019); (Bautista et al. 2015)) ou pelo uso recreacional de reservatórios, lagos e rios (Koreivienė et al. 2014), inalação de aerossóis (Turner et al. 1990) ou por hemodiálise (Pouria et al. 1998).

Casos de intoxicação animal e humana após exposição a cianobactérias tóxicas por meio do contato com água recreacional ou consumo de água contaminadas foram documentados em todo o mundo ((Stewart et al. 2008); (Metcalf e Codd 2012); (Svircev et al. 2017); (Svircev et

al. 2019)). O caso mais grave de intoxicação humana comprovado ocorreu na cidade de Caruaru-Pernambuco (1996), quando pacientes com problemas renais crônicos, passaram a apresentar um quadro clínico de distúrbios visuais, náusea e vômito após serem submetidos a sessões de hemodiálise. Os pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda e 76 vieram a falecer. Testes realizados nos filtros de carvão ativado utilizado na hemodiálise indicaram a presença de cianotoxinas MC e CYN ((Jochimsen et al. 1998); (Pouria et al. 1998); (Azevedo 2002)).

A conscientização sobre o potencial risco associado às cianotoxinas despertou o interesse em se avaliar a toxicidade desses compostos e monitorar as concentrações ambientais, estimulando a implementação de tratamentos adequados de água bruta e planos de monitoramento em muitos países do mundo. Com isso, através de dados de estudos de toxicidade, a Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO - *World Health Organization*) publicou uma diretriz recomendando um valor máximo permitido de 1 µg/mL de MC-LR(eq) em água potável (WHO 1998). No Brasil, a Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de Setembro de 2017 segue o estabelecido pela OMS e incluiu o monitoramento de MCs (valor máximo permitido (VMP) de 1 µg/L) para água destinada ao abastecimento público, incluindo também o monitoramento de STXs (VPM de 3 µg/L), adotado pela UE. (BRASIL, 2017).

Embora não se saiba ao certo o significado ecológico e ou ecofisiológico da produção destas toxinas, têm-se assumido que esses compostos tenham função protetora contra a predação pelo zooplâncton e vantagem competitiva em relação a outras espécies do fitoplâncton e até mesmo de plantas aquáticas ((Carmichael 1992); (Azevedo e Brandão 2003)).

1.1.1.1. Microcistinas

Microcistinas (MC) (Figura 3) são toxinas hepatotóxicas, frequentemente encontradas em florações de água doce, produzidas por espécies de vários gêneros de cianobactérias, incluindo *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Anabaena*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* e *Hapalosiphon*.

Tratam-se de peptídeos cíclicos com peso molecular que variam de 800 a 1.100 Da, constituídos por 7 aminoácidos ligados, 5 aminoácidos praticamente invariáveis e 2 variáveis, os quais são normalmente L-aminoácidos (X e Z); D-alanina¹ – X² – ácido D-metilaspártico³ – Z⁴ – Adda⁵ – ácido D-glutâmico⁶ N-metil dehidroalanina⁷. As MC são nomeadas de acordo com os dois L-aminoácidos variáveis (Carmichael et al. 1988). Por exemplo, MC-LR (leucina-arginina), MCRR (arginina-arginina), MC-LA (leucina-alanina) e MC-YA (tirosina-alanina).

As MC são sintetizadas pela via não-ribossomal por meio de grandes complexos multi-enzimáticos denominados policetídeo sintases (PKS - *Polyketide Synthase*) e peptídeo-sintetases não-ribossomais (NRPS - *Non-Ribossomal Peptide Synthetase*). Esses complexos enzimáticos são responsáveis pela incorporação de aminoácidos na molécula e sua posterior modificação (epimerização, ciclização, N-metilação), gerando peptídeos altamente complexos (Finking e Marahiel 2004, Tillett et al. 2000).

Há mais de 240 variantes de MC já identificadas, sendo que as variantes mais tóxicas são aquelas que apresentam em sua estrutura L-aminoácidos mais hidrofóbicos, como por exemplo, MC-LA, -LR, -YR e -YM, e as menos tóxicas aquelas com aminoácidos mais hidrofílicos, tal como a MC-RR ((Falconer e Humpage 2005); (Svircev et al. 2017)). Com base em estudos de toxicidade aguda, dentre as diferentes variantes, a MC-LR é considerada a hepatotóxina mais potente (Funari e Testai 2008).

O Adda (ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienoico) e o resíduo N-metil dehidroalanina (Mdha) são responsáveis pela atividade biológica, conferindo toxicidade ao composto, e seu principal mecanismo de ação é a inibição das proteínas fosfatases tipo 1 (PP1) e tipo 2 (PP2A) (Chorus e Bartram 1999). A inibição da atividade dessas enzimas induzidas pelas MCs é resultado de uma interação não-covalente inicial, mediada pelo Adda hidrofóbico, da cadeia lateral das MC e a parte apolar do triptofano da enzima. Seguida de uma ligação covalente do α , β -carbonil insaturado do resíduo de Mdha das MC com o grupamento tiol da cisteína-273 da PP1 e da cisteína-266 da PP2 (Dawson 1998).

Figura 3: Estrutura geral das microcistinas.

Fonte: Adaptada de Cardozo et al. (2007)

1.3.2. Cianopeptídeos

Além das conhecidas cianotoxinas, as cianobactérias são fontes de inúmeros outros metabólitos biologicamente ativos. A variedade química e estrutural dos metabólitos reflete em atividades biológicas distintas, tais como atividades citotóxica, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antimalárica, antifúngica, anti-inflamatória e imunossupressoras, o que as tornam alvos em potencial para aplicações farmacêutica e biotecnológica ((Raja et al. 2016); (Swain et al. 2017); (Janssen 2019)).

Uma grande parte desses metabólitos são peptídeos ou possuem sub-estruturas peptídicas, conhecidos como cianopeptídeos, e em sua maioria, são produtos da biossíntese não-ribossomal ou de vias mistas de síntese não-ribossomal e síntese policetídis, mediadas por complexos enzimáticos como NRPS (*Nonribossomal Peptide Synthetase*) e NRPS/PKS (*Polyketide Synthase*) ((Schmidt et al. 2005); (Agha et al. 2013)). Por outro lado, na biossíntese de peptídeos cíclicos, tais como as microviridinas e ciclamidas, os peptídeos são sintetizados via síntese ribossomal e sofrem modificações pós-traducionais ((Philmus et al. 2008); (Ziemert et al. 2008)).

Os peptídeos, contendo aminoácidos proteinogênicos e não-proteinogênicos, apresentam um nível surpreendentemente elevado de variabilidade estrutural, com mais de 240 microcistinas e pelo menos 500 cianopeptídeos variando de 400 a 1900 Da identificados até o momento ((Welker et al. 2006); (Welker e Von Döhren 2006); (Svircev et al. 2017); (Janssen 2019)). Muitos deles compartilham subestruturas conservadas, tais como as microcistinas, cianopeptolinas, aeruginosas e microgininas, enquanto que em outros as modificações são altamente variáveis (Welker e Von Döhren 2006). Essas semelhanças estruturais permitiram agrupar os cianopeptídeos em classes e levaram à classificação atual, mais amplamente aceita de oligopeptídeos, proposta por Welker e von Döhren (2006), que estabelece as principais classes de cianopeptídeos: aeruginosinas, cianopeptolinas, anabaenopeptinas, microgininas, microviridinas, ciclamidas e microcistinas (Figura 4). Análises por espectrometria de massas frequentemente detectam novas variantes estruturais de classes de peptídeos conhecidos, apresentando troca de aminoácidos, ou modificações incluindo metilação, cloração ou glicosilação ((Welker e Von Döhren 2006)).

Figura 4: Estruturas químicas de algumas variantes das principais classes de cianopeptídeos.

Os cianopeptídeos são em sua maioria inibidores de enzimas, particularmente de proteases, e as suas variações estruturais peptídicas podem influenciar significativamente a atividade biológica do composto. As cianopeptolinas, também conhecidas como micropeptinas, apresentam atividade inibitória contra serino proteases do tipo tripsina e quimotripsina e ainda apresentam atividade citotóxica. As aeruginosinas e spumiginas exibem atividade inibitória contra as serino proteases do tipo tripsina e contra a papaína, uma protease de cisteína. As anabaenopeptinas são inibidoras de proteínas fosfatase e também atuam sobre as enzimas proteolíticas, como tripsina, quimotripsina, elastase e carboxipeptidase A. As microgininas

inibem as zinco metaloproteases, como a enzima conversora de angiotensina e as aminoproteínases, além de inibir a proteína tirosina fosfatase do *Mycobacterium tuberculosis*. A maioria das variantes de microviridina mostra atividades inibitórias contra proteases do tipo serina, principalmente contra a elastase. As ciclamidas (aeruciclamidas e microciclamidas) apresentam atividade contra células tumorais (células leucêmicas) e contra parasitas humanos. Por fim, as microcistinas e nodularinas são conhecidas por inibir fosfatases tipo 1 e tipo 2A ((Welker et al. 2006); (Janssen 2019)).

Dentre as classes de cianopeptídeos, a microcistina é a mais conhecida e mais estudada do ponto de vista ecológico e toxicológico, pelo fato de ser a cianotoxina mais prevalente em florações tóxicas de cianobactérias e estar relacionada com diversos casos de intoxicação humana e animal (Harke et al. 2016). No entanto, outros cianopeptídeos, incluindo microgininas e (aeru)ciclamidas podem ser detectadas com frequência em águas superficiais e em concentrações iguais ou superiores as microcistinas e pouco se sabe sobre as suas funções fisiológicas, ecológicas ou toxicológicas (Janssen 2019).

1.1.1.2. Microgininas

As microgininas pertencem a uma classe de peptídeos lineares contendo de 4 a 6 aminoácidos, com cerca de 40 variantes já descritas (Figura 5). São caracterizadas pela presença do ácido 3-amino-2-hidroxi-decanoico (Ahda) na porção *N*-terminal da molécula e a predominância de duas unidades de tirosina na porção *C*-terminal (Welker et al. 2006). A posição 2 é a mais variável, com sete aminoácidos diferentes já relatados, enquanto que nas duas posições seguintes, já foram observados de três a quatro aminoácidos diferentes (Stenico et al. 2013). A ocorrência de *N*- metilação nas posições 1, 3 e 4 e cloração (mono e dicloração) alifática no Adha foram relatadas em algumas variantes de microgininas ((Ishida et al. 1998); (Kodani et al. 1999)).

Figura 5: Estrutura geral das microgininas (Okino et al. 1993a) e esquema das possíveis combinações de aminoácidos.

Fonte: (Zervou et al. 2020).

As microgininas foram inicialmente caracterizadas como inibidores de metaloproteinases dependentes de zinco tais como a enzima conversora de angiotensina (ECA) e aminoproteinases, através da ligação do resíduo α -hidróxi- β -amino ao zinco no sítio ativo da enzima. A ECA, por exemplo, catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II dentro do sistema renina-angiotensina de mamíferos, levando a estenose arterial, que, por sua vez, provoca o aumento da pressão arterial. Os inibidores da ECA neutralizam esse processo e, portanto, desempenham um papel na medicina humana como agentes de redução da pressão arterial (Stenico et al. 2013). Neste contexto, as microgininas são consideradas potenciais candidatas para o desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento da hipertensão e doenças associadas, bem como para tratamentos de insuficiência cardíaca crônica e nefropatia diabética.

A estrutura química das microgininas é muito semelhante à de peptídeos como probestina e amastatina, que são peptídeos lineares de 4 ou mais aminoácidos contendo α -hidróxi- β -aminoácido, e como a bestatinasão inibidores de aminopeptidases.

A primeira microginina foi descrita em 1993 por Okino e colaboradores, e foi isolada a partir de uma cianobactéria do gênero *Microcystis* (Okino et al. 1993a). As microgininas foram relatadas em florações de cianobactérias com dominância de *Microcystis* sp. ((Neumann et al. 1997); (Kodani et al. 1999)) e em linhagens de *Microcystis* sp. cultivadas em laboratório ((Ishida et al. 1997); (Ishida et al. 1998); (Ishida et al. 2000a); (Reshef e Carmeli 2001); (Fastner et al. 2001); (Welker e Von Döhren 2006); (Czarnecki et al. 2006); (Gesner-Apter e Carmeli 2008); (Carneiro et al. 2012)).

1.1.1.3. Aeruciclamidas (Microciclamidas)

As ciclamidas compõem um grupo de peptídeos cíclicos com modificações heterocíclicas. São compostas de 6 a 8 aminoácidos polares (serina, treonina e cisteína) e apolares alternando entre si. As cadeias dos aminoácidos polares podem ser heterociclizadas formando anéis oxazol ou tiazol ou seus derivados reduzidos, resultando em estruturas planares (Portmann et al. 2008a, Portmann et al. 2008b).

Esses compostos foram isolados de cianobactérias de água doce e terrestres das ordens *Chroococcales*, *Nostocales* e *Stigonematales*. No entanto, foram inicialmente isolados de organismos marinhos que vivem em simbiose com cianobactérias ou cuja dieta alimentar é a base de cianobactérias, consideradas a verdadeira fonte desses metabólitos (Elersek et al. 2017). Como é o caso da Bistramide A, que foi originalmente isolada de *Lissoclinum bistratum*, um ascídeo marinho (Degnan et al. 1989a, Degnan et al. 1989b). Nostociclamidas, tenueciclamidas, venturamidas, dendroamidas e microciclamidas são algumas das ciclamidas isoladas de cianobactérias simbióticas e de vida livre ((Jüttner et al. 2001); (Banker e Carmeli 1998); (Linnington et al. 2007); (Ogino et al. 1996); (Ishida et al. 2000b)).

As microciclamidas e aeruciclamidas são hexapeptídeos cíclicos caracterizados por três anéis azol ou azolina, provavelmente derivados da modificação de cisteína e treonina (Figura 6). A microciclamida foi relatada pela primeira vez na linhagem de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* NIES-298 (Ishida et al. 2000b). Esses peptídeos cíclicos são sintetizados pela via de biossíntese ribossomal, através de um conjunto de enzimas relacionadas à biossíntese de patelamidas (Ziemert et al. 2008).

Muitas das ciclamidas apresentaram citotoxicidade em uma variedade de linhagens celulares de câncer. A microciclamida isolada de *M. aeruginosa* NIES 298 exibiu atividade citotóxica moderada contra células de leucemia murina P388 (Ishida et al. 2000b). Já as microciclamidas 7806A e 7806B isoladas de uma outra linhagem de *Microcystis* não mostraram

qualquer atividade inibitória contra células HeLa (Ziemert et al. 2008). Os testes antiproliferativos, antibacterianos e antifúngicos também deram resultados negativos (Ziemert et al. 2008). Raveh et al. (2010) isolaram e caracterizaram 9 variantes de microciclamidas, das quais apenas uma já era conhecida, a microciclamida A, a mesma isolada por Ishida et al. (2000b). Dentre elas, apenas uma (Microciclamida GL582) exibiu moderada citotoxicidade (20% de inibição de crescimento) contra a linhagem de células de leucemia Molt 4 em concentração de 10 µg/mL. As aeruciclamidas A e B, se mostraram tóxicas para o crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus*, exibindo valores de CL₅₀ de 30,5 e 33,8 µM, respectivamente (Portmann et al. 2008a). A aeruciclamida B apresentou também atividade antiplasmodial bastante potente e seletiva contra *Plasmodium falciparum* K1 e uma grande seletividade sobre a linhagem celular L6 de mamífero (Portmann et al. 2008b).

As ciclamidas foram inicialmente propostas como metabólitos com atividade antibacteriana, no entanto, diferentes atividades observadas para estruturas individuais de ciclamidas indicam que a ação antibacteriana pode não refletir a verdadeira função biológica desses peptídeos cíclicos. Segundo Ziemert et al. (2008), a enorme diversidade de variantes de hexapeptídeos cíclicos sugere que as ciclamidas podem estar envolvidas na comunicação e no auto reconhecimento de ecotipos de *Microcystis*.

Apesar de sua ampla ocorrência, a função ecológica desses compostos permanece incompreendida, assim como a de muitos outros metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias.

Figura 6: Estrutura química de uma A. microciclamida (Ishida et al. 2000b) e B. aeruciclamida (Ishida et al. 2000b).

Fonte: Ishida et al. (2000b)

1.1.1.4. Toxicidade de Cianopeptídeos

Os efeitos nocivos das cianobactérias podem não ser atribuídos apenas às cianotoxinas conhecidas, uma vez que muitas outras substâncias bioativas também estão envolvidas na inibição de enzimas que participam das principais vias metabólicas (Janssen 2019).

Evidências da toxicidade de extratos de cianobactérias não produtoras de cianotoxinas e a perspectiva de efeitos sinérgicos entre os diversos metabólitos produzidos por elas, tais como lipopolissacarídeos, peptídeos e depsipeptídeos, alcaloides polares e outros metabólitos ainda desconhecidos, indicam que a toxicidade não está exclusivamente relacionada às cianotoxinas já descritas e que outros compostos também podem apresentar algum grau de toxicidade (Palíková et al. 2007); (Kohler 2014); (Smutná et al. 2014); (Mazur-Marzec et al. 2015); (Fernandes et al. 2019)). Considerando que alguns cianopeptídeos ocorrem em concentrações semelhantes às microcistinas e que essas toxinas não ocorrem sozinhas durante eventos de floração de cianobactérias, é necessário avaliar o potencial risco (eco) toxicológico desses outros compostos (Janssen 2019).

Embora os trabalhos que avaliam os efeitos tóxicos de cianopeptídeos além das MCs ainda sejam bastante escassos, algumas classes de cianopeptídeos já estão sendo amplamente investigadas quanto à sua toxicidade e podem inclusive ser consideradas uma nova classe de cianotoxinas, como discutido a seguir.

A cianopeptolina CP1020 isolada de *Microcystis*, por exemplo, foi considerada tóxica ao crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus* ($LC_{50} = 8,8 \mu M$) em concentrações semelhantes à de algumas microcistinas bem conhecidas (Gademann et al. 2010). Adicionalmente, Faltermann et al. (2014) verificaram que a exposição de embriões de *zebrafish* (72 h pós fertilização) por 96 h a 100 e 1000 $\mu g/L$ de CP1020 resultava em alterações transcricionais de genes relacionados a várias vias biológicas e fisiológicas importantes. Os genes mais claramente afetados foram das vias relacionadas ao reconhecimento e reparo do dano do DNA, ao ritmo circadiano e à resposta à luz. Esta análise transcriptômica levou à identificação de efeitos moleculares novos e desconhecidos desta cianotoxina, incluindo neurotoxicidade, o que pode ter consequências importantes para humanos que consomem água potável contaminada. Esses dados sustentam a hipótese de que as cianopeptolinas podem ser consideradas uma nova classe de toxinas produzidas por cianobactérias.

A aeruginosina 828A, isolada de uma linhagem de *Planktothrix* não produtora de microcistinamostrou-se tóxica para o crustáceo *T. platyurus*, com um valor de LC_{50} de 22,4 μM , que é apenas um pouco maior do que a toxicidade encontrada para as microcistinas. Além

disso, foram determinados valores de inibição muito potentes para trombina ($IC_{50} = 21,8 \text{ nM}$) e para tripsina ($IC_{50} = 112 \text{ nM}$) (Kohler 2014).

Todorova e Jüttner (1995) caracterizaram uma nostociclamida isolada de uma linhagem de cianobactéria de água doce do gênero *Nostoc*, cuja ação tóxica e alelopática foram observadas. A nostociclamida inibiu o crescimento das cianobactérias *Anabaena* P-9, *Anabaena* PCC 7120, *Synechococcus* PCC 6911 e *Synechocystis* PCC 6308, da diatomácea *Navicula minima* e da clorofícea *Nannochloris coccooides* SAG 251-1. A nostociclamida inibiu o crescimento de *Anabaena* P-9 em uma concentração de $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ e também apresentou toxicidade considerável ($LC_{50} 12 \text{ } \mu\text{M}$) ao rotífero de água doce *Brachionus calyciflorus*. Posteriormente, Jüttner et al. (2001) isolaram um outro composto da classe das ciclâmidas, semelhante a nostociclamida, a nostociclamida M, cuja atividade alelopática foi verificada na cianobactéria *Anabaena* 7120, no entanto, o composto se mostrou inativo contra predadores.

Experimentos realizados por Rohrlack et al. (2004) identificaram a microviridina J como responsável pela interrupção do processo de muda do exoesqueleto de espécies de *Daphnia* (pulga d'água), levando-as à morte. A interrupção da ecdise foi presumivelmente ligada ao efeito inibitório da microviridina J nas proteases do tipo tripsina desses organismos.

Bober e Bialczyk (2017) avaliaram a toxicidade de *Woronichinia naegeliana* em crustáceos (*T. platyurus* e *Daphnia pulex*) e verificaram a atividade biológica da fração contendo microginina pura (MG-FR3) em *T. platyurus*, em que se determinou a LC_{50} de $7,78 \text{ } \mu\text{g/mL}$. No entanto, os ensaios de inibição enzimática de proteases incluindo tripsina, quimotripsina, elastase e trombina deram resultados negativos, indicando um mecanismo de ação diferente da inibição de serino-proteases para a toxicidade desses compostos em crustáceos. Embora as microgininas sejam conhecidas como inibidores de zinco metaloproteases, tais como a leucina aminopeptidase (LAP) e ECA, o mecanismo de ação sobre sua toxicidade em crustáceos não foi estabelecido.

Fernandes e colaboradores (2019) avaliaram a toxicidade de dois extratos aquosos de *Microcystis* (*M. panniformis* MIRS-04 e *M. aeruginosa* NPCD-01), a primeira produtora de MCs e a segunda não produtora de cianotoxinas, em embriões de *Astyanax altipaeanae* (lambari), um peixe tropical de água doce nativo do Brasil. Ambos os extratos se mostraram tóxicos aos embriões, com resultados semelhantes de mortalidade e alterações morfológicas nas larvas após 96h de exposição. Apesar da ausência de cianotoxinas, a linhagem NPCD-01 se mostrou igualmente tóxica, tendo como um dos compostos majoritários a microginina (MG FR2/FR4). A linhagem tóxica MIRS-04, inclusive, biossintetiza outros compostos além das

MCs, demonstrando que a toxicidade não foi causada apenas pelas MCs, mas que outras classes de metabólitos secundários de cianobactérias contribuíram para a toxicidade observada (Fernandes et al. 2019).

Embora grandes esforços estejam sendo destinados à busca por novos compostos bioativos para aplicações farmacêutica e biotecnológica, pouco se sabe sobre o seu papel fisiológico e ecológico ((Kodani et al. 1999); (Welker e Von Döhren 2006)). Existem várias hipóteses quanto à função desses cianopeptídeos, incluindo mecanismo de inibição de enzimas vitais, atividade alelopática sobre outros organismos fitoplanctônicos, proteção química contra a herbivoria e envolvimento no metabolismo celular. Entretanto, os modos de ação ainda exigem mais investigações. Dados toxicológicos de moléculas consideradas não-tóxicas também são bastante escassos, o que torna indispensável a caracterização desses compostos quanto à sua citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (Silva-Stenico et al. 2015).

1.4. Métodos de detecção e identificação de cianopeptídeos

A triagem (*screening*) por produtos naturais de cianobactérias pode ter como principais objetivos a descoberta de novos compostos e a busca por compostos já conhecidos em uma amostra ((Welker et al. 2006); (Welker et al. 2012); (Bogialli et al. 2017)).

Para detectar compostos inéditos em misturas complexas, a prospecção química deve ser realizada através de métodos que permitam a detecção de moléculas de forma rápida e eficaz, já que as etapas posteriores de isolamento e purificação podem ser laboriosas e onerosas em tempo e recursos. O tempo de análise por amostra deve ser curto, mas a informação obtida deve ser precisa e completa o suficiente para permitir a identificação de amostras positivas (com novos compostos ou compostos conhecidos de interesse), bem como as amostras negativas (sem compostos de interesse) (Welker et al. 2012).

Neste sentido, as técnicas de derreplicação constituem poderosas ferramentas para a análise preliminar de extratos brutos e tem sido amplamente utilizado em estudos de bioprospecção de produtos naturais de microrganismos (Ghisalberti 2007). A derreplicação é uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos, pois permite estabelecer o grau de ineditismo de substâncias presentes nestes extratos, de maneira a se evitar o re-isolamento e determinação estrutural de substâncias já conhecidas. O processo de derreplicação também ajuda a priorizar extratos para isolamento químico e agrupar amostras que contêm perfis de derreplicação similares. Existem inúmeras abordagens para derreplicação baseadas em técnicas espectroscópicas, como espectroscopia de absorção ultravioleta (UV)/visível (Vis) e

infravermelha (IR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS), sobretudo utilizando a combinação de métodos cromatográficos e espectroscópicos, que incluem técnicas hifenadas, como LC-UV, LC-MS, LC-NMR e técnicas multi hifenadas, como LC-MS/MS, LC-PDA-MS, LC-SPE-RMN, MALDI-TOF/MS. Cada uma com suas próprias vantagens em sensibilidade e resolução ((Van Middlesworth e Cannell 1998); (Ghisalberti 2007); (de Felício et al. 2012)).

Os métodos para a detecção de oligopeptídeos são frequentemente baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), considerada uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa (identificação da composição elementar de compostos e elucidação estrutural) e quantitativa (determinação de analitos em níveis traços em matrizes complexas) de compostos pouco voláteis e/ou termicamente instáveis (Lanças 2009).

Desenvolvimentos recentes em tecnologia e instrumentação analítica fizeram da espectrometria de massas (MS) uma ferramenta fundamental para a caracterização de proteínas e peptídeos. O desenvolvimento da ionização por *electrospray* (ESI) e da ionização/dessorção por laser auxiliada por matriz (MALDI), consideradas técnicas brandas de ionização e capazes de ionizar proteínas e peptídeos, revolucionaram a análise desses compostos utilizando MS (Han et al. 2008). Essa característica pode ser interessante quando se busca avaliar a presença de diferentes compostos no espectro (por facilitar a visualização/atribuição das espécies) e determinar a massa exata do composto. Entretanto, quando se deseja obter informações estruturais ou aumentar a seletividade de métodos quantitativos, a fragmentação passa a ser desejada.

Dentre os principais componentes de um espectrômetro de massas, o analisador de massas possui relevância particular pelo fato de ser o responsável pela seleção e/ou separação dos íons, de acordo com a m/z . A escolha do analisador de massas apropriado deve levar em consideração a aplicação (p. ex., faixa de massas desejada), desempenho (p. ex., resolução de massas) e custo. Um dos parâmetros mais importantes a ser considerado é a exatidão de massas, dada pela diferença entre as massas teórica e obtidas experimentalmente. Outro parâmetro de grande importância em análises por MS é a resolução, que consiste na capacidade de um espectrômetro de massas separar dois íons distintos. Em geral, independentemente do tipo de equipamento, resolução e sensibilidade são parâmetros inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a resolução, menor a sensibilidade. Desse modo, esses parâmetros devem ser ajustados levando-se em conta o objetivo analítico. Além disso, a resolução também afeta a

exatidão de massas. Outro parâmetro de extrema importância, comum a todas as técnicas analíticas é a sensibilidade, dada pela inclinação da curva de resposta de um determinado analito com o aumento da concentração. Entre os principais analisadores de massas utilizados em LC-MS estão os analisadores do tipo quadrupolo, *ion trap* e tempo de voo (TOF - *Time-of-Flight*) (Lancas 2013, Lanças 2009). Os instrumentos híbridos foram projetados para combinar as capacidades de diferentes analisadores de massa em realizar espectrometria de massas sequencial (MS^n), como por exemplo, o triplo quadrupolo (QqQ) e quadrupolo tempo-de-voo (QTOF).

O desenvolvimento e posterior aprimoramento das técnicas de espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MS^2 - *tandem mass spectrometry*) representam um grande avanço no acoplamento com a cromatografia. Em LC- MS/MS (QqQ) são permitidos os seguintes modos de varredura: varredura de íons produtos (*product ion scan*), varredura de íons precursores (*precursor ion scan*), varredura de perda neutra constante (*constant-neutral-loss scan*), monitoramento seletivo de reações (*multiple reaction monitoring* - MRM) e monitoramento de íon selecionado (*selected ion monitoring* - SIM). No modo varredura de íons produtos, o íon precursor de m/z particular é selecionado, fragmentado e o espectro de massas dos íons produtos (fragmentos formados) é registrado. Esse tipo de experimento é amplamente utilizado para elucidação estrutural, onde se deseja, por meio de um espectro de fragmentação, caracterizar os grupos funcionais do analito de interesse. No modo varredura de íons precursores, um íon produto é selecionado e o espectro de massas dos íons precursores que o originam é registrado. Este tipo de análise pode ser utilizado para compostos que apresentam perdas características de um mesmo grupamento químico, como observado em algumas classes de cianopeptídeos. No modo varredura de perda neutra constante, os íons produtos são gerados pela perda de massa neutra específica após dissociação induzida por colisão (CID) do íon precursor. Os espectros de todos os íons precursores que se fragmentam perdendo uma massa de estrutura química específica e neutra são registrados. No monitoramento seletivo de reações, os dados são adquiridos somente para um ou mais íons produto específicos produzidos por íons precursores de m/z selecionados em um estágio prévio de espectrometria de massas, em vez da aquisição de todo o espectro de massas de íons produto. O monitoramento de reação selecionada pode ser realizado por espectrometria de massas sequencial no tempo ou por espectrometria de massas sequencial no espaço. No caso de experimentos com fins quantitativos, é frequentemente utilizado o modo de aquisição conhecido como Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), em que se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente (íon precursor

-> íon produto) possibilitando a quantificação de múltiplos analitos ao mesmo tempo. Esse tipo de análise é amplamente utilizado em equipamentos do tipo triplo quadrupolo, em razão da sua alta sensibilidade e seletividade.

O analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (TOF) pode fornecer espectros de alta resolução, e quando combinado como o analisador do tipo quadrupolo, formando o analisador híbrido QTOF, fornece informações com alta sensibilidade, resolução e acurácia, e são aplicados na identificação de muitos cianopeptídeos novos e conhecidos (Han et al. 2008). A espectrometria de massas tempo-de-vôo com ionização/dessorção por laser auxiliada por matriz (MALDI-TOF-MS) também é amplamente empregada em estudos de produtos naturais e tem a vantagem de detectar cianopeptídeos em amostras muito pequenas com elucidação estrutural planar de novos congêneres sem procedimentos laboriosos de cultivo e isolamento ((Erhard et al. 1997); (Welker et al. 2006)).

1.4.1. Elucidação estrutural de peptídeos por espectrometria de massas

A elucidação estrutural por técnicas de espectrometria de massas são baseadas em comparações com perfis de fragmentação de compostos similares já identificados e pelo estabelecimento da fórmula molecular, por meio da precisão de massas (m/z) e do padrão isotópico obtido por técnicas espectrométricas de alta resolução ((Czarnecki et al. 2006); (Welker et al. 2006)).

A informação sequencial do peptídeo pode ser obtida por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) por meio da dissociação induzida por colisão (*Collision induced dissociation* - CID). Técnicas de ionização branda, como a ionização por *eletrospray* (ESI), permitem que as moléculas sejam transferidas da fase líquida para a fase gasosa sem sofrer fragmentações e sejam ionizadas. No espectrômetro de massas, os peptídeos ionizados são acelerados e colididos com um gás inerte, cuja energia é convertida em energia interna. A energia interna induz a transferência intramolecular dos prótons em um peptídeo, desestabilizando as ligações do esqueleto polipeptídico e resultando na clivagem dessas ligações (Steen e Mann 2004). Os íons fragmentos gerados são então registrados na forma de espectros conforme sua m/z . Dependendo da ligação que é fragmentada, os íons gerados podem reter a carga residual (próton) no lado N-terminal, gerando fragmentos do tipo *-a*, *-b* e *-c*, e íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal, gerando os fragmentos *-x*, *-y* e *-z*, conforme nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann (Figura 7) ((Steen e Mann 2004); (Paizs e Suhai 2005); (Cantú et al. 2008)). Considerando-se que as ligações peptídicas

são aquelas menos energéticas, na fragmentação de peptídeos induzida por colisão de baixa energia, espera-se que a formação do par de íons **-b** e **-y** seja mais freqüente que os demais pares de fragmentos. Enquanto os íons fragmentos **-b** e **-y** resultam diretamente da clivagem das ligações peptídicas, os íons **-a** são formados pela perda adicional de monóxido de carbono, com diferença de massa de 27.9949 Da em relação ao íon **-b** correspondente. Os íons **-c**, **-x** e **-z** normalmente não observados, pois a energia comumente usada para induzir a fragmentação dos peptídeos em CID é insuficiente para romper as ligações entre o carbono- α e o carbono da carbonila, bem como entre o nitrogênio e o carbono- α adjacente (Cantú et al. 2008). Além desses fragmentos, íons adicionais, chamados íons “satélite”, podem ser gerados pela perda neutra de pequenas moléculas como água (com diferença de massa de 18 Da) e amônia (diferença de massa de 17 Da). Perdas neutras de H₂O são frequentemente observadas em peptídeos contendo resíduos de serina, treonina e ácido glutâmico. Enquanto que os aminoácidos Arginina, Lisina, Glutamina e Asparagina perdem prontamente uma molécula de NH₃. Quando a fragmentação ocorre simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio são produzidos. Esses íons servem como íons diagnóstico, podendo indicar a presença ou ausência de determinados aminoácidos na sequência em estudo e são detectados na região de m/z mais baixa do espectro (Steen e Mann 2004).

Figura 7: Padrão de fragmentação de peptídeos, com formação de íons -a, -b, -c e -x, -y e -z (nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann).

Fonte: do autor

1.4.2. Elucidação estrutural de peptídeos por RMN

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das ferramentas analíticas mais poderosas utilizada na elucidação estrutural de moléculas orgânicas em solução, desde pequenas e médias moléculas até macromoléculas, como peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Além de ser muito útil na elucidação da estrutura molecular, a RMN também pode ser usada para estudar processos dinâmicos de moléculas e para estudar interações/reações entre as moléculas. Estruturas parciais ou fragmentos com massas quase idênticas às vezes não podem ser distinguidos e, para uma completa elucidação estrutural, técnicas como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) são necessárias. Isso exige, no

entanto, o isolamento dos compostos de interesse na ordem de miligramas, quantidades nas quais muitas variáveis estruturais provavelmente nunca estarão disponíveis (Welker e Von Döhren 2006).

Os espectrômetros de RMN atuais operam em frequências entre 60 e 900 MHz. Quanto maior a frequência operacional de um instrumento, melhor é a resolução (separação dos sinais) do espectro de RMN. Os espectrômetros de RMN são equipados com fontes de radiação que podem ser ajustados em diferentes frequências, de modo que elas possam ser utilizadas para obter espectros de RMN de diferentes tipos de núcleos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , etc). Os experimentos mais comuns de espectroscopia de RMN baseiam-se na observação direta de núcleos de ^1H e ^{13}C em solução. A elevada abundância natural e elevada razão giromagnética do núcleo de ^1H possibilitam medições de alta sensibilidade e baixo tempo de aquisição para este núcleo e são responsáveis pelo vasto número de aplicações desta técnica.

As técnicas unidimensionais (1D) revelam informações sobre o tipo e a proporção dos núcleos analisados, mas nem sempre dão informações sobre a forma como os núcleos estão ligados uns aos outros dentro da molécula. Já as técnicas bidimensionais (2D), homo (^1H - ^1H) e heteronucleares (^1H - ^{13}C ; ^1H - ^{15}N), utilizam a dispersão de sinais em duas dimensões ortogonais, permitindo a identificação de correlações (escalar ou espacial), entre os núcleos. Desta forma, é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas 1D e dados de compostos similares da literatura, principalmente na análise de estruturas mais complexas. Apesar das vantagens em termos de informações estruturais que as técnicas 2D tradicionais oferecem, o tempo necessário para executar certos experimentos, principalmente os heteronucleares, ainda é uma grande limitação.

A seguir estão descritos os principais experimentos de RMN bidimensionais (Kaiser 2000):

- **COSY (*homonuclear COrrrelation SpectroscopY*)**

Este experimento permite estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão separados por duas ou três ligações ($^{2-3}J_{H,H}$ - acoplamentos escalares (geminais e vicinais), mensuráveis no espectro 1D) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN 1H . Eventualmente, sinais devidos a acoplamentos a longa distância ($^{4-6}J_{H,H}$), raramente mensuráveis no espectro 1D, são também visíveis

- **TOCSY (*Total Correlation SpectroscopY*)**

Este experimento permite estabelecer correlações entre hidrogênios não necessariamente acoplados, mas que possuem um hidrogênio vizinho comum ao qual ambos estão acoplados. É uma técnica muito útil na análise de compostos que possuem um carbono quaternário sem hidrogênios ou um heteroátomo, separando dois subsistemas na mesma molécula.

Sua análise é feita de forma análoga ao COSY. No COSY, apenas correlações a três ligações aparecem, ao passo que, no TOCSY, todas as correlações para um mesmo sistema de *spins* estão presentes, independentemente no número de ligações.

- **NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY*)**

Neste experimento, as correlações envolvem interações devidas ao efeito nuclear Overhauser (NOE - *Nuclear Overhauser Effect*) entre os hidrogênios que estão espacialmente próximos (em geral, menor do que 4 Å). Através desta técnica é possível estabelecer a configuração relativa de cada hidrogênio na molécula e geralmente a geometria molecular como um todo.

- **HSQC (*Heteronuclear MultipleQuantum Coherence*)**

O experimento permite estabelecer um mapa de correlação de deslocamento heteronuclear por acoplamento de uma ligação. Com este experimento é possível assinalar os hidrogênios ligados diretamente ao heteronúcleo (geralmente ^{13}C e ^{15}N).

- **HMBC (*Heteronuclear MultipleBond Coherence*)**

Este experimento permite estabelecer correlações de deslocamentos heteronucleares por acoplamento de duas, três e, às vezes, em sistemas conjugados, de quatro ligações. As informações obtidas das correlações $^nJ_{H,H}$ são muito importantes em uma determinação estrutural, principalmente para estabelecer a posição de carbonos quaternários não hidrogenados.

Os procedimentos básicos para a determinação estrutural por RMN de peptídeos e pequenas proteínas são baseados na metodologia de atribuição sequencial proposto por Wüthrich (1986), através das análises de acoplamento *spin-spin* e efeitos nucleares Overhauser (NOEs). De forma resumida, o método consiste em identificar os sistemas de *spin* individuais dos aminoácidos, assinalar os NOEs e, por fim, assinalar a sequência dos aminoácidos através de correlações heteronucleares. O primeiro passo consiste em identificar os sistemas de *spin* característicos de cada aminoácido nos espectros 2D TOCSY. A porção que compreende a região dos sinais de hidrogênios amídicos HN-H α (deslocamento químico δ_H 6,5-12 ppm) é chamada de região de impressão digital e é geralmente o ponto de partida para a identificação dos sistemas de *spin*. Os sistemas de *spin* se alinham verticalmente nessa região e critérios como número e valores de deslocamento químico de sinais que compõem o sistema de *spin* e a ocorrência ou ausência de grupos metil, fornecem informações valiosas sobre o respectivo aminoácido. Já os sinais de NOE são a fonte de informação mais relevante para a obtenção das estruturas tridimensionais. As intensidades dos sinais estão diretamente correlacionadas à distância entre dois hidrogênios, que podem pertencer ao mesmo ou a resíduos de aminoácidos distantes na estrutura primária, mas que estão próximos no espaço. A partir dos espectros de NOESY é possível, então, a obtenção de correlações inter-residuais de hidrogênios, espacialmente próximos, que se correlacionam por interações de acoplamento dipolar. As distâncias entre os núcleos vizinhos são classificadas em faixas semi-quantitativas, de acordo com as intensidades ou volumes dos sinais de NOE obtidos (Wüthrich, 1986). Por fim, a conexão dos aminoácidos adjacentes é realizada por meio de experimentos 2D heteronucleares (HMBC) identificando as correlações entre o Ha e o carbono da carbonila.

1.5. Ensaios Ecotoxicológicos

O termo ecotoxicologia foi criado por René Truhaut no ano de 1969 e foi definida como “o ramo da toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas, animais (incluindo seres humanos), vegetais ou microorganismos, em um contexto integral” (Truhaut 1977). O termo “ecotoxicologia” recebeu muitas definições desde então, como mostra a Tabela 2, e todos eles abordam a multidisciplinariedade dessa ciência e a importância do envolvimento de profissionais de diversas áreas, tais como ecologia, toxicologia, química, estatística, entre outras áreas.

Tabela 2: Definições para o termo “Ecotoxicologia” encontradas da literatura.

Definições	Referência
<i>“O ramo da toxicologia relacionado ao estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais e sintéticos, sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas, animais (inclusive humanos), vegetais e microbianos, em um contexto integrado”.</i>	Truhaut (1997)
<i>“Uma extensão natural da toxicologia, a ciência dos venenos em organismos individuais, aos efeitos ecológicos de poluentes”.</i>	Moriarty (1983)
<i>“A ciência que busca prever os impactos dos produtos químicos nos ecossistemas”.</i>	Levin et al. (1989)
<i>“O estudo do destino e efeito de agentes tóxicos em ecossistemas”.</i>	Cairns e Mount (1990)
<i>“A ciência das substâncias tóxicas no meio ambiente e seu impacto sobre os organismos vivos”.</i>	Jørgensen (1990)
<i>“Estudo de efeitos tóxicos em organismos, populações e comunidades não-humanas”.</i>	Suter (1993)
<i>“O estudo do destino e do efeito de um composto tóxico em um ecossistema”.</i>	Shane (1994)
<i>“O campo de estudo, que integra os efeitos ecológicos e toxicológicos dos poluentes químicos nas populações, comunidades e ecossistemas com o destino (transporte, transformação e decomposição) desses poluentes no meio ambiente”.</i>	Forbes e Forbes (1994)
<i>“A ciência de prever efeitos de agentes potencialmente tóxicos sobre ecossistemas e espécies não-alvo”.</i>	Hoffman et al. (1995)
<i>“O estudo das vias de exposição, absorção e efeitos de agentes químicos em organismos, populações, comunidades e ecossistemas”.</i>	Connell (1990)
<i>“O estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos nos ecossistemas; os efeitos nocivos dos produtos químicos (toxicologia) no contexto da ecologia”.</i>	Walker et al. (2001)
<i>“O estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos nos ecossistemas incluindo os efeitos nos indivíduos e efeitos decorrentes nos níveis populacionais e acima deles”.</i>	Walker et al. (2002)
<i>“A ciência dos contaminantes na biosfera e seus efeitos sobre os constituintes da biosfera, incluindo os seres humanos”.</i>	Newman (2014)
<i>“A ciência que investiga os efeitos dos poluentes “nos constituintes dos ecossistemas”, incluindo (mas não restrito a) as interações ecológicas entre eles”.</i>	Hauser-Davis e Parente (2018) Cap 2

Fonte adaptado de NEWMAN, 2014.

O ecossistema aquático é um dos mais susceptíveis à contaminação, principalmente por substâncias de origem antropogênica, e por estarem em contato direto e constante com a água, os organismos aquáticos são mais sensíveis às substâncias químicas presentes na água do que animais terrestres e aves que são expostos apenas por meio da alimentação e da ingestão de água contaminada. Diante disso, os organismos aquáticos são considerados excelentes bioindicadores de contaminação ambiental, e suas respostas fisiológicas, bioquímicas e

comportamentais são de grande relevância em estudos ecotoxicológicos. Os organismos-testes mais utilizados em testes ecotoxicológicos incluem algas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*), microcrustáceos (*Daphnia magna*, *D. similis*, *Artemia salina*), copépodes, anfípodes, peixes (*Danio rerio*, *Pimephales promelas*), bactérias (*Vibrio fischeri*), anelídeos, entre outros (Costa et al. 2008).

Na ecotoxicologia aquática, os efeitos adversos são avaliados em organismos representativos do ecossistema aquático, por meio de testes de toxicidade. Esses testes determinam o nível de resposta biológica indicado pelos efeitos adversos exibidos pelos organismos em teste após a exposição a uma determinada substância química, e dependem da natureza química do composto, da concentração e do tempo de exposição. Os testes de toxicidade são classificados em agudos e crônicos e devem ser avaliados, se possível, em mais de uma espécie representativa da biota aquática, de preferência de níveis tróficos diferentes, considerando as diferenças de sensibilidade apresentadas pelos organismos-teste (Costa et al. 2008). O teste de toxicidade aguda avalia os efeitos decorrentes da exposição do organismo-teste a um agente tóxico por um curto período de tempo em relação ao seu período de vida, geralmente de 24 a 96 h. Esse tipo de teste avalia a letalidade ou alguma outra manifestação do efeito agudo, como a imobilidade, por exemplo, dos organismos-teste. Os efeitos são medidos e calculados por métodos estatísticos computacionais e os valores da relação dose-resposta são expressos como concentrações letais (CL) e efetivas (CE). Geralmente esses valores são expressos em relação à 50% dos organismos (CL₅₀ e CE₅₀). Já os testes de toxicidade crônica avaliam os efeitos da exposição prolongada (período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo teste) de substâncias químicas em concentrações sub-letais. Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como CENO (Concentração de Efeito não Observado) ou CEO (Concentração de Efeito Observado), mas também podem ser expressos como CE₅₀ (Costa et al. 2008).

Os testes de toxicidade podem ainda ser classificados em estáticos, semi-estáticos e dinâmicos, de acordo com o método de adição das soluções-teste. Nos ensaios estáticos, a mesma solução teste é utilizada do início ao fim do teste, sem renovação. Nos demais ensaios, a solução teste é renovada de tempos em tempos (a cada 24 h ou 48 h dependendo do organismo-teste) para os testes semi-estáticos, ou renovada de forma contínua para os testes dinâmicos (Costa et al. 2008). As características físico-químicas da substância química testada e as quantidades disponíveis para o teste podem influenciar na escolha do tipo de teste a ser adotado (estático, semi-estático ou dinâmico).

Em relação à toxicidade de misturas, os efeitos observados podem ser do tipo aditivo, sinérgico ou antagônico, em que a resposta é dependente das interações de seus constituintes. Dentro de uma mistura, como por exemplo, o extrato bruto de cianobactérias, pode ser encontrado compostos tóxicos e não-tóxicos. Para compreender melhor as causas da toxicidade dessas amostras complexas, é fundamental a identificação e a avaliação da toxicidade individual das substâncias presentes na mistura, assim como a avaliação da toxicidade da mistura como um todo (Costa et al. 2008).

1.5.1. Organismo teste: *Danio rerio* (Zebrafish)

Um modelo animal que tem se mostrado bastante atraente e relevante para a avaliação ecotoxicológica e para estudos de desenvolvimento de vertebrados, é o peixe ornamental *Danio rerio*, também conhecido como *zebrafish*, peixe-zebra ou paulistinha.

O *Danio rerio* (Figura 8) é um pequeno teleosteo de água doce, da família Cyprinidae, nativo da Índia e do sul da Ásia. Medindo aproximadamente entre 3 a 4 cm, estes animais são facilmente mantidos e distribuídos em aquários, necessitando de pouco espaço, o que minimiza os custos de sua manutenção e criação em laboratórios. Além de seu reduzido tamanho, essa espécie apresenta rápido desenvolvimento e maturação sexual (entre 3 e 6 meses de idade), com alta taxa de fecundidade, podendo liberar centenas de ovos por dia. Apresentam fertilização e desenvolvimento embrionário externos, e seus ovos são transparentes. O córion transparente permite a fácil observação dos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário por microscopia óptica, permitindo a identificação de características fenotípicas e os *endpoints* de toxicidade ((Kimmel et al. 1995); (Hill et al. 2005); (Scholz et al. 2008); (Vargas et al. 2015)).

Figura 8: Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento do *D. rerio*.

Fonte adaptada: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f09.jpg

O *D. rerio* é considerado um excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e vem sendo utilizado também para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos ((Howe et al. 2013); (Vargas et al. 2015)). A facilidade de manipulação genética com a possibilidade de silenciar ou expressar determinados genes, e o fato do genoma ter sido totalmente seqüenciado, apresentando alto grau de similaridade com os genes humanos (70%), os estudos com *D. rerio* permitem a análise de mutações e melhor entendimento do funcionamento dos genes envolvidos em diversas doenças humanas (Howe et al. 2013).

No empenho para aplicar os princípios dos 3Rs, do inglês “*Replacement, Reduction and Refinement*”, de reduzir o número e minimizar o desconforto de animais utilizados em

experimentação e a substituir, sempre que possível, os testes *in vivo* por metodologias alternativas, surgiu o ensaio com embriões de peixes. O FET - *Fish Embryo Test* (OECD, 2013) surgiu como uma metodologia alternativa ao teste de toxicidade aguda em peixes (OECD TG 203 - *Fish, Acute Toxicity Test*) (OECD 2019), com a finalidade de substituir os ensaios com animais adultos e juvenis. O teste visa a determinação da toxicidade aguda de substâncias químicas em peixes na fase de desenvolvimento embrional. Nessa fase inicial de vida embrionarlarval, o sistema nervoso do animal ainda está em formação e considera-se que sintomas de dor e desconforto não são percebidos. Segundo a Diretiva da União Européia (2010/63 / UE) sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos, os animais estão sujeitos à regulamentação, apenas a partir do estágio de larvas livres capazes de realizar alimentação independente. Por estes motivos, os animais em fase inicial de vida não se enquadram nos âmbitos regulatórios relacionados à experimentação animal. (Strähle et al. 2012). Entretanto, no Brasil, a utilização dos animais em qualquer estágio de vida deve ser aprovada pelo conselho de ética animal. O teste com embriões de *D. rerio* têm sido proposto como uma metodologia alternativa para substituir os experimentos com adultos não só pelas implicações éticas, mas principalmente pelas inúmeras vantagens experimentais descritas acima. Os estágios embrionários de *D. rerio* estão sendo cada vez mais utilizados como modelo na pesquisa biomédica e na (eco)toxicologia, com protocolos estabelecidos internacionalmente (OECD, 2013).

O *D. rerio* possui grande sensibilidade quando exposto a substâncias químicas tóxicas por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos (Vargas et al. 2015). Testes de toxicidade aguda com peixes adultos e embriões apresentam boa correlação e ambas as metodologias podem ser aplicadas para acessar os efeitos tóxicos de substâncias químicas. A análise da toxicidade aguda em embriões pode ainda incluir a triagem de distúrbios do desenvolvimento como indicador de efeitos teratogênicos (Scholz et al. 2008).

O uso de embriões de *D. rerio* e outras espécies de peixes vem sendo aplicado cada vez mais na investigação da toxicidade aguda e teratogenicidade de toxinas e extratos de cianobactérias de florações ou cultivos de laboratório ((Wang et al. 2005); (Berry et al. 2007); (Jonas et al. 2015); (Qian et al. 2018); (Fernandes et al. 2019)).

2. JUSTIFICATIVA

Os recursos hídricos são utilizados para diversos fins, incluindo o abastecimento público, irrigação, geração de energia, controle de enchentes, navegação, aquicultura, recreação, entre outros (Tundisi 2003). O lançamento indiscriminado de poluentes antropogênicos é uma das principais fontes de poluição que leva à perda de integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos e ao comprometimento da qualidade da água (Bicudo 2009). Muitos corpos d'água encontram-se eutrofizados devido a esse enriquecimento de nutrientes, o que acaba favorecendo no aparecimento de florações de cianobactérias. Além de formarem densas camadas de células, dificultando a passagem de luz pela coluna d'água, muitas florações são formadas por espécies tóxicas, representando um sério risco à saúde humana e animal (Glibert 2017). Florações de cianobactérias, principalmente espécies do gênero *Microcystis*, são bastante recorrentes em ambientes eutrofizados e podem ser encontradas inclusive em tanques de piscicultura ((Falconer e Humpage 2005); (Harke et al. 2016); (Svircev et al. 2019)).

A vulnerabilidade dos organismos aquáticos a essas toxinas e outros metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias, reforça a necessidade de maior investigação sobre os efeitos ecotoxicológicos desses compostos em espécies representativas deste ecossistema. Sabe-se que peixes em estágios iniciais de vida são geralmente mais sensíveis às substâncias tóxicas quando comparados com peixes juvenis e adultos ((Malbrouck e Kestemont 2006); (Zanchett e Oliveira-Filho 2013)). Existem muitos trabalhos na literatura que investigaram o efeito de microcistinas puras e/ou extratos brutos de cianobactérias tóxicas no desenvolvimento embrio-larval de espécies de peixes como *Danio rerio* (zebrafish) ((Oberemm et al. 1997); (Wang et al. 2005); (Li et al. 2011); (Jonas et al. 2015)), *Oryzias latipes* (medaka) ((Jacquet et al. 2004); (Lecoz et al. 2008)) e *Silurus meridionalis* (bagre) (Zhang et al. 2008). No entanto, são escassas as informações ecotoxicológicas acerca de outros peptídeos produzidos por cianobactérias, sendo o trabalho de Faltermann et al. (2016), Faltermann et al. (2014) um dos poucos a avaliar o efeito de cianopeptolinas e aeruginosinas em embriões de *Danio rerio*. Muitos estudos verificaram a toxicidade de extratos de cianobactérias não-toxigênicas, reforçando mais ainda a importância de se caracterizar outros metabólitos produzidos pelas cianobactérias ((Jungmann 1992); (Vasconcelos et al. 2001); (Kohler 2014); (Mazur-Marzec et al. 2015)).

Em vista da carência de informações toxicológicas de muitos cianopeptídeos, principalmente em modelos biológicos de espécies aquáticas, o presente trabalho se mostra

extremamente relevante e pode ajudar a mensurar os riscos causados por esses compostos no ambiente aquático. Além disso, esses estudos podem auxiliar na compreensão da função ecológica e fisiológica desses metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias. Por isso, foi escolhido um dos modelos animais mais representativos do ambiente aquático, o *Danio rerio*, amplamente utilizado em estudos de biologia de vertebrados, principalmente em estudos genéticos, patológicos e toxicológicos ((Hill et al. 2005); (Berry et al. 2007); (Kari et al. 2007); (Kabashi et al. 2011); (Liu e Stainier 2012)). Seu uso como modelo experimental é muito vantajoso dado seu pequeno porte, fácil manutenção, por ser econômico para criação, e por possuir rápido metabolismo, alta taxa reprodutiva e genoma completamente sequenciado ((Kimmel et al. 1995); (Strähle et al. 2012)). Os genes deste teleósteo são evolutivamente conservados e apresentam um alto grau de similaridade com os genes humanos e de camundongos, o que o torna um excelente modelo para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos (Howe et al. 2013).

Uma vez que as florações de cianobactérias estão cada vez mais intensas e recorrentes, o risco da presença desses metabólitos na água tanto para os organismos aquáticos ali presentes em contato direto, como para outros animais, incluindo o homem, que faz uso dessa água, deve ser melhor investigado.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar cianopeptídeos produzidos por *Microcystis aeruginosa* e avaliar a toxicidade aguda em embriões e larvas de *Danio rerio*.

Objetivos específicos:

- Cultivo de linhagens de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08 e NIES-299) para investigação do perfil peptídico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS/MS)
- Isolamento e purificação dos cianopeptídeos por cromatografia líquida semi-preparativa.
- Elucidação estrutural dos compostos isolados por RMN.
- Avaliação da toxicidade aguda dos compostos isolados de *M. aeruginosa* em embriões de *Danio rerio* e possíveis alterações morfológicas e comportamentais dos embriões e larvas.
- Desenvolvimento de um método de varredura de íon precursor (*Precursor ion scan*) para a identificação de microgininas por LC-ESI-MS/MS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Solventes, Reagentes e Padrões

Todos os solventes (etanol, metanol, acetonitrila e isopropanol) e demais reagentes (formiato de amônio, formiato de sódio, ácido fórmico, hidróxido de amônio, cloreto de sódio e ácido trifluoroacético) utilizados para as análises cromatográficas e de espectrometria de massas apresentavam pureza mínima de grau HPLC. Os solventes utilizados para a extração (acetato de etila e diclorometano) são de grau analítico, assim como os reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura ASM-1 e do meio utilizado nos testes de toxicidade com *D. rerio* (água reconstituída). A água ultrapura, foi obtida em sistema Milli-Q® Direct 8 (Millipore Corporation, EUA). DMSO-*d*₆, solução de ácido clorídrico (6 M em H₂O) e padrões de aminoácidos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck, Alemanha).

Os padrões gravimétricos de microgininas utilizados para o desenvolvimento e otimização do método analítico de varredura de íon precursor foram isolados e purificados a partir das linhagens de *M. aeruginosa* LPTNA 08 e NIES-299.

4.2. Seleção das linhagens de cianobactérias

O Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA) mantém um banco de culturas de cianobactérias, com linhagens isoladas por pesquisadores do grupo e linhagens cedidas por pesquisadores parceiros do LTPNA ou ainda adquiridas comercialmente (ANEXO 1).

Para o isolamento e purificação de microgininas utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda em embriões de *D. rerio* e para o desenvolvimento do método de *precursor ion*, foram selecionadas duas linhagens de *Microcystis aeruginosa*, produtoras de microgininas. A linhagem de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08, isolada do reservatório de Salto Grande, em Americana – SP, é sabidamente produtora de microcistinas LR e RR, e microgininas 756 e 770 (Carneiro et al. 2012). A outra linhagem de *M. aeruginosa* NIES-299, também produtora de MG, foi adquirida da Coleção de Cultura Microbiana do Instituto Nacional de Estudos Ambientais do Japão (Microbial Culture Collection – National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, Japão). A linhagem NIES-299 é produtora das MG 299-A, 299-B, 299-C e 299-D (Ishida et al. 1998).

As microgininas isoladas para os ensaios ecotoxicológicos e para obtenção de padrões analíticos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Informações gerais sobre as microgininas isoladas neste trabalho.

Cepa produtora	Nome	Fórmula Molecular	[M-H] ⁺	Estrutura Molecular / Sequência de aminoácidos	Íon característico	Referência
<i>M. aeruginosa</i> NIES-299	MG-299 A	C ₄₆ H ₆₆ N ₆ O ₁₀ Cl	m/z 887	<p>Chloro Ahda – Val – N-Me Val – N-Me Tyr – Pro – Tyr</p>	m/z 162	Ishida <i>et al.</i> , 1997
<i>M. aeruginosa</i> NIES-299	MG-299 B	C ₄₅ H ₆₅ N ₆ O ₁₀ Cl ₂	m/z 921	<p>Dichloro Adha – Val – N-Me Val – N-Me Tyr – Pro – Tyr</p>	m/z 196	Ishida <i>et al.</i> , 1997
<i>M. aeruginosa</i> NIES-299	MG-299 C	C ₄₅ H ₆₈ N ₆ O ₁₀	m/z 853	<p>Ahda – Val – N-Me Val – N-Me Tyr – Pro – Tyr</p>	m/z 128	Ishida <i>et al.</i> , 1998

<p><i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08</p>	<p>MG 770</p>	<p>$C_{41}H_{63}N_5O_9$</p>	<p>m/z 770.5</p>	<p>MeAhda – Val – Leu – HTy – Tyr</p>	<p>m/z 148</p>	<p>Carneiro <i>et al.</i>, 2012</p>
<p><i>M. aeruginosa</i>L TPNA 08</p>	<p>MG 756</p>	<p>$C_{36}H_{56}N_5O_8$</p>	<p>m/z 756.5</p>	<p>Ahda – Val – Leu – HTy – Tyr</p>	<p>m/z 128</p>	<p>Carneiro <i>et al.</i>, 2012</p>

Fonte: Ishida et al. (1997), Ishida et al. (1998) e Carneiro et al. (2012).

4.3. Manutenção e cultivo de cianobactérias

As culturas foram mantidas em tubos de ensaio com meio ASM-1 líquido (Gorham et al. 1964), sob intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8,0 e fotoperíodo de 12:12 horas (claro/escuro). A intensidade luminosa foi avaliada através de um sensor quântico (QSL-100 Box, Biospherical Instruments Inc.). A composição do meio ASM-1 utilizado no cultivo e manutenção das cianobactérias está descrita na Tabela 4. Para cada litro de meio ASM-1, foram adicionados 20, 2, 0,1 e 0,4 mL das soluções A, B, C e D, respectivamente, completando-se o volume com água ultrapura. O pH do meio foi ajustado para 8,0 com soluções de NaOH 1M e HCl 1M.

Para a produção de biomassa, as linhagens foram cultivadas durante 30 a 40 dias em frascos Erlenmeyers de 2 e 6 L, contendo meio ASM-1, sob constante aeração. A intensidade luminosa da incubadora foi mantida em $70 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12:12 horas (claro/escuro).

Ao final de cada cultivo, o material celular das culturas foi concentrado por centrifugação ($10.000 \times g$, 10 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Eppendorf 5804R) e o *pellet* obtido congelado a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizado (SNL216V, Thermo Electron Corporation).

Tabela 4: Composição do meio ASM-1 (Gorham et al. 1964)

Solução	Composição	Concentração (g/100mL)
Solução A	NaNO ₃	0,850
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,245
	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,205
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,145
Solução B	KH ₂ PO ₄	0,68
	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1,79
	Na ₂ HPO ₄	0,71
Solução C	H ₃ BO ₃	2,48
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,39
	FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,08
	ZnCl ₂	0,335
	CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,0019
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019
	CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0013
	CuCl ₂	0,0014
Solução D	Na ₂ EDTA	1,86

Fonte: (Gorham et al. 1964)

4.4. Crescimento celular

O cultivo experimental foi realizado em triplicata, em Erlenmeyers de 2 L, com aeração, contendo 1,5 L de meio e inóculo de $3,3 \times 10^5$ células.mL⁻¹. A cada três dias amostragens para contagem celular e análise dos cianopeptídeos de interesse foram realizadas.

O crescimento celular das linhagens foi acompanhado, por meio de contagem celular por microscopia óptica em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, e, paralelamente, por densidade óptica medida por espectrofotometria a 750 nm, estimando-se o número de células.mL⁻¹. A partir destes dados, foram estabelecidas as curvas de crescimento e calculadas as taxas de crescimento total e exponencial, pela aplicação da regressão exponencial aos dados da variação do número de células no tempo, de acordo com a fórmula (Reynolds 2006):

$$N_t/N_0 = N_0 \cdot e^{rn \cdot t}$$
$$rn = \ln(N_t/N_0) / t$$

Onde:

N_t = número de células no tempo t

N_0 = número inicial de células (t=0)

rn = taxa de crescimento

Os cálculos das taxas de crescimento foram realizados pela aplicação da regressão exponencial aos dados da variação do número de células no tempo. Considerou-se taxa de crescimento total a taxa obtida pela equação da regressão aplicada a todos os dados. A fase exponencial foi considerada toda vez que os dados mostram boa aderência à regressão ($R^2 \geq 0,96$). As curvas de crescimento são apresentadas como o logaritmo do número de células pelo tempo.

4.5. Extração dos cianopeptídeos para isolamento e purificação

A extração dos cianopeptídeos (Figura 9) foi realizada seguindo as metodologias de Sanz et al. (2017) e Paiva et al. (2017).

Para o processo de isolamento dos cianopeptídeos, o material liofilizado (1g) foi extraído 3 vezes com MeOH 70% (1g/40 mL) e submetidos à probe de ultrassom por 10 minutos, pulso de 10, a uma intensidade de 30 % (Soni Omni Disruptor - Omni International, EUA). O material foi centrifugado (8500 x g, 4 °C, 10 minutos, Eppendorf 5804R) e o sobrenadante coletado e submetido ao sistema rotaevaporador (Modelo B-491 - Büchi, Flawil, Suíça), com pressão de 83 mBar, rotação de 100 rpm e temperatura da água de 30 °C, para a

remoção do solvente da amostra. O extrato foi reconstituído em 100 mL de MeOH 5% e aplicado em cartucho de extração em fase sólida Sep Pak C18 Vac 6 cc, 500 mg (Waters, EUA), previamente condicionados com MeOH (60mL), seguido de água ultrapura Milli-Q (60 mL), para o fracionamento da amostra. Após a eluição da amostra, os cartuchos foram lavados com água (60 mL) e eluídos com um gradiente de 20 a 80% de MeOH acidificado com 0,1% de ácido fórmico (60 mL) para a obtenção de frações enriquecidas com os cianopeptídeos de interesse. Os eluatos obtidos no processo de pré-fracionamento foram concentrados sob fluxo de nitrogênio e reconstituídos em ACN:H₂O (30/70, v/v). As amostras foram filtradas em filtros de seringa de PVDF de 0,22 µm (Analítica, Brasil) e submetidas à análise cromatográfica por LC-HR-QTOF-MS/MS e para o isolamento em HPLC-DAD semi-preparativo.

Figura 9: Fluxograma ilustrativo do processo de extração e fracionamento do extrato bruto de LTPNA 08 e NIES-299.

Fonte: Do autor

4.6. Isolamento e Purificação dos cianopeptídeos

As frações de 60 e 80% contendo os cianopeptídeos de interesse foram submetidas a processos cromatográficos visando o isolamento e obtenção de compostos puros. Para tanto, foi empregado um sistema de cromatografia em fase líquida semi-preparativo (Prominence, Shimadzu, Japão) constituído por uma controladora (CBM-20A), uma bomba quaternária (LC-20AT), um degaseificador (DGU-20AS), um amostrador automático (SIL-20AC), um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e um coletor de frações (FRC-6A).

Diferentes colunas cromatográficas, composições de fase móvel e gradientes foram testados para o isolamento das microgininas (MG 770 e MG 756) e do composto de m/z 583, identificado posteriormente como Microciclâmica 583. As melhores separações foram alcançadas pelas colunas Luna C18(2) (250 x 4,6 mm, 5 μ m) e Synergi MAX-RP (250 x 4,6 mm, 4 μ m), utilizando como fase móvel A) H₂O + 0,1% de HCOOH e B) ACN + 0,1% de HCOOH a uma vazão de 1,0 mL/min.

O método cromatográfico otimizado foi então transferido para escala semi-preparativa para o isolamento e purificação dos compostos de interesse. A separação foi realizada em coluna semi-preparativa de fase reversa Luna C18(2), 250 x 10 mm, 5 μ m (Phenomenex, EUA), utilizando como fase móvel (A) H₂O + 0,1% de HCOOH e (B) ACN + 0,1% de HCOOH, com fluxo de trabalho de 3,0 mL/min. Os gradientes de eluição utilizados no isolamento e purificação dos cianopeptídeos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Gradientes de eluição utilizados no método de isolamento das microgininas e do composto de m/z 583 por HPLC-DAD semi-preparativo. A) Gradiente de eluição utilizado no primeiro isolamento e B) Gradiente de eluição otimizado utilizado no processo de re-isolamento e purificação.

A)

Tempo (min)	Eluente %A	Eluente %B
0	70	30
20	40	60
21	10	90
25	10	90
26	70	30
30	70	30

B)

Tempo (min)	Eluente %A	Eluente %B
0	70	40
7	40	40
7,5	10	90
10,5	10	90
11	70	40
17	70	40

As microgininas 756 e 770 e a microciclâmida 583 foram monitoradas em comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) de 276 nm e 225 nm, respectivamente. Devido à presença de microcistinas nas frações, elas também foram monitoradas ($\lambda_{\text{máx}}$ 238 nm). Os picos cromatográficos com espectro de absorção UV característico das microgininas ($\lambda_{\text{máx}}$ 225 e 276 nm) e do pico desconhecido ($\lambda_{\text{máx}}$ 205 nm) foram coletados e as subfrações foram secas sob fluxo de nitrogênio e analisadas por LC-HR-QTOF-MS/MS para verificar o êxito do isolamento e a pureza dos picos. As subfrações foram submetidas a sucessivos isolamentos até a obtenção de frações puras dos compostos.

Os compostos purificados foram submetidos à análise de espectrometria de massas (LC-HR-QTOF-MS/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). O processo de isolamento e purificação foi realizado diversas vezes até que obtivesse material suficiente para os testes ecotoxicológicos com *D. rerio*. Ao todo, cerca de 15 g de biomassa seca foram utilizados para obtenção de 20,94 mg e 13,86 mg de MG 770 e Microciclâmida 583, respectivamente.

4.7. Detecção e Caracterização Estrutural de cianopeptídeos

4.7.1. Espectrometria de massas

A detecção, identificação e caracterização estrutural de cianopeptídeos produzidos por cianobactérias, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HR-QTOF-MS/MS), conforme metodologia descrita por Sanz et al. (2015).

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema cromatográfico Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjos de diodos (SPD-M20A) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF) (MicroTOF-QII, Bruker Daltonics, MA, EUA), equipado com fonte *electrospray* (ESI). O equipamento foi operado no modo positivo de ionização, com potencial capilar de 3500 V, pressão do gás nebulizador (nitrogênio) de 35 psi e temperatura e fluxo do gás secante (nitrogênio) de 5mL/min a 300 °C. Uma solução de formiato de sódio 10 mM em isopropanol-água (1:1, v/v) foi utilizada como calibrante externo. O instrumento foi operado em modo de varredura (*full scan*) e em modo Auto MS/MS, na faixa de 50 a 2000, realizando experimentos de MS/MS sobre os 3 íons mais intensos obtidos no modo MS *scan*.

As separações cromatográficas foram realizadas em coluna Luna C18 (2) (5 µm, 150 x 2,0 mm), protegida com pré-coluna de mesma composição (Phenomenex, EUA), a uma temperatura de 35 °C. Os eluentes utilizados como fase móvel foram: (A) H₂O contendo 5 mmol/L de formiato de amônio e 0,1% de HCOOH e (B) ACN, a uma vazão de 0,2 mL/min. As condições cromatográficas utilizadas estão resumidas nas Tabela 6.

Tabela 6: Condições cromatográficas utilizadas para detecção e identificação análise por LC-MS/MS (Q-TOF).

Fase estacionária:		
Luna C18 (2) 5u 100A (150 mm x 2,0 mm)		
Fase Móvel:		
A) H ₂ O contendo 5 mmol/L de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico		
B) Acetonitrila		
Fluxo: 0,2 mL/min		
Temperatura do forno: 35 °C		
Gradientes:		
Método 1) Gradiente utilizado para a análise de cianopeptídeos		
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	95	5
50	10	90
55	10	90
56	95	5
65	95	5
Método 2) Gradiente otimizado utilizado para a análise dos compostos semi-purificados		
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	75	25
10	50	60
11	10	90
15	10	90
16	65	25
30	65	25

O processamento dos dados foi realizado no software Data Analyses 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A composição elementar, o desvio entre a massa medida e a massa teórica em [ppm] (err) e a comparação do valor do padrão isotópico teórico e medido do pico de interesse, por meio de *score* (mSigma), foram calculados usando *Smart Formula Editor*. A confirmação da fórmula molecular foi baseada nos limites amplamente aceitos de 5 ppm e 20 mSigma.

A caracterização dos cianopeptídeos foi estabelecida com base nos dados de massa exata, composição elementar, formação de adutos, estados de carga, padrão isotópico e

principalmente pelo perfil de fragmentação (MS2). A interpretação e confirmação da sequência de aminoácidos obtidos pela fragmentação dos cianopeptídeos por espectrometria de massas foi realizada seguindo as metodologias propostas por Paizs e Suhai (2004) e CANTU et al. (2008). Os resíduos de aminoácidos foram determinados através do cálculo da diferença de massa entre uma série de íons fragmentos sucessivos, identificando íons das séries -a, -b e -y. Além da busca por perdas neutras de CO (-28 u) por parte de um íon -b (íon -a) e perdas neutras de moléculas de H₂O (-18 u) e NH₃ (-17 u) a partir de íons -b e -y, a busca por íons imônio na região de baixas massas do espectro também pôde fornecer informações inerentes à composição dos aminoácidos de um peptídeos.

4.7.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizados no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo - Central Analítica, em espectrômetro de RMN Bruker Avance III (Bruker Corporation, MA, EUA), acoplado a uma sonda resfriada (TCI), operando em 800 MHz (¹H), 200 MHz (¹³C) e 90 MHz (¹⁵N).

As soluções de análise foram obtidas a partir da solubilização de cerca 1 mg dos composto purificados (MG 770 e *m/z* 583) em 1 mL de dimetilsulfóxido deuterado (*Dimethyl sulfoxide-d₆*(DMSO-*d₆*), Sigma Aldrich, EUA), os quais foram transferidos para tubos capilares de 3 mm próprios para experimentos de RMN. A temperatura de trabalho foi estabelecida em 25 °C e foram obtidos os espectros em uma dimensão (1D) de ¹H e espectros em duas dimensões (2D), homo (¹H, ¹H) e heteronucleares (¹H, ¹³C, ¹⁵N). Foram adquiridos experimentos bidimensionais de espectroscopia de Correlação Total (TOCSY), espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (NOESY), Coerência Heteronuclear de Simples Quantum (¹³C-¹H e ¹⁵N-¹H HSQC) e Coerência Heteronuclear de Múltiplos Quanta (¹³C-¹H HMBC).

Os espectros de RMN foram processados utilizando o software NMRPipe (Delaglio et al. 1995) e analisados utilizando o programa CcpNmr Analysis (Vranken et al. 2005). O processamento dos dados e manuseio do equipamento de RMN foi realizado pelo Prof. Roberto Ropke Salinas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.

Os procedimentos para a determinação estrutural por RMN dos peptídeos foram baseados na metodologia de atribuição sequencial proposto por Wüthrich (1986). Os sistemas de *spins* foram identificados individualmente através dos acoplamentos escalares, por meio do experimento de TOCSY (¹H, ¹H), e os experimentos de NOESY (¹H, ¹H) foram utilizados para observar os acoplamentos dipolares entre os *spins* através do espaço. Os experimentos de HSQC

editado foram utilizados distinguir os hidrogênios de CH e CH₃ (rosa) de hidrogênios de CH₂ (verde) e os experimentos de HMBC para ligar um resíduo de aminoácido a outro (Ha - C da carbonila) e consequentemente estabelecer a sequência de aminoácidos do peptídeo.

4.8. Triagem de microgininas por LC-MS/MS em modo de varredura de íon precursor (*Precursor ion scan*)

66 linhagens de cianobactérias mantidas no banco de culturas do LTPNA (ANEXO 1) e 7 amostras ambientais provenientes de reservatórios e lagos brasileiros foram utilizadas para a busca de variantes conhecidas e inéditas de microgininas. O material liofilizado das linhagens e das amostras ambientais foi pesado e extraído com MEOH/H₂O (50:50, v/v) e submetido à probe de ultrassom (intensidade de 30%, pulso de 10, 2 minutos, Omni Sonic Disruptor - Omni International, EUA). Em seguida, o material foi centrifugado (8500 x g, 4 °C, 15 minutos, Eppendorf 5415R) e o sobrenadante coletado e filtrado em filtros de seringa de PVDF de 0,22 µm (Analítica, Brasil) para a análise cromatográfica.

A busca por espécies produtoras de microgininas e a triagem rápida desses compostos em amostras ambientais, foi realizada por LC-ESI-MS/MS através do método de *precursor ion scan*. O método foi desenvolvido em sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ - 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies, EUA), com ionização por *electrospray* (ESI), em modo positivo.

Os padrões gravimétricos analíticos das microgininas MG 299-A, MG 299-B, MG 770, MG 756 e MG 299-C formam obtidos por meio de isolamento e purificação, pesados utilizando uma balança analítica de legibilidade 0,01 mg (Cubis®, Modelo MSU, Sartorius, EUA) e reconstituídos em metanol (1 mg.mL⁻¹). Os padrões analíticos foram utilizados para definir e otimizar os parâmetros de ionização, colisão e separação.

Uma varredura (*full scan*) foi realizada para cada variante de microginina, separadamente, na faixa de *m/z* 100-2000 antes da escolha do íon precursor para experimentos de dissociação induzida por colisão (CID). Parâmetros como voltagem do acelerador de células (*cell accelerator voltage* - CAV) e energias de fragmentação (*fragmentor voltage* - FV) e colisão (CE - *Collision Energy*) foram otimizados injetando soluções individuais dos padrões de microgininas, em que foram selecionadas as condições mais favoráveis para a formação dos íons produtos de interesse.

O espectrômetro de massas foi operado no modo varredura de íon precursor (*precursor ion scan*) para o monitoramento dos íons precursores que originam os íons produtos de *m/z* 128,

142, 162 e 196, referentes aos fragmentos não-metilado, metilado, clorado e diclorado, respectivamente, resultantes da clivagem da cadeia lateral do resíduo Ahda. Esses fragmentos são considerados íons diagnóstico da classe das microgininas.

Os parâmetros otimizados da fonte de ionização e de aquisição para o método de *precursor ion scan* estão resumidos nas Tabela 7 e Tabela 8.

Tabela 7: Parâmetros otimizados da fonte de ionização *electrospray* do espectrômetro de massas triplo-quadrupolo.

Parâmetros da fonte	Valores otimizados
Temperatura do gás secante (N ₂)	300 °C
Fluxo do gás secante (N ₂)	9 L/min
Nebulizador	35 psi
Temperatura do gás de bainha (N ₂)	325 °C
Fluxo do gás de bainha (N ₂)	11 L/min
Voltagem do capilar	3500 V
Voltagem do cone	500 V

Tabela 8: Parâmetros de aquisição em modo *precursor ion scan* otimizados para as análises de microgininas.

Segment Name	Product ion	MS1 from	MS1 to	Scan Time	Fragmentor (V)	CE(V)	CAV	Polarity
Cl ₂ Ahda	196	400	1000	200	140	65	2	Positive
ClAhda	162	400	1000	200	140	65	2	Positive
MeAhda	142	400	1000	200	140	65	5	Positive
Ahda	128	400	1000	200	140	65	2	Positive

A separação cromatográfica foi obtida em uma coluna Luna C18 (2) (150 x 2,0 mm, 4 μ - Phenomenex, EUA), protegida com uma pré-coluna de mesma fase estacionária, e mantida à 40°C. O gradiente linear de eluição foi de 25 a 55% de B em 10 minutos, a uma vazão de 0,25 mL/min (Tabela 9). Antes de cada injeção de amostra, a agulha do injetor foi lavada com Isopropanol/MeOH/H₂O (80:10:10, v/v).

Tabela 9: Condições cromatográficas utilizadas para a triagem de microgininas por LC-QqQ-MS/MS em modo *Precursor ion scan*.

Fase estacionária:

Luna C18 (2) 5 u 100A (150 mm x 2,0 mm)

Fase Móvel:

A) H₂O contendo 5 mmol/L de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico

B) Acetonitrila

Fluxo: 0,25 mL/min

Temperatura do forno: 40 °C

Gradiente:

Tempo (min)	Eluente %A	Eluente %B
0	75	25
10	45	55
10,5	5	95
13,5	5	95
14	75	25
20	75	25

As amostras consideradas positivas, foram analisadas posteriormente por LC-QTOF-MS/MS para confirmação da identidade das microgininas suspeitas, conforme descrito no item 4.7.1. As condições cromatográficas utilizada estão resumidas na Tabela 10. As informações obtidas foram comparadas com dados disponíveis na literatura e banco de dados (Tabela 22).

Tabela 10: Condições cromatográficas utilizadas para a confirmação das microgininas detectadas no método de *precursor ion*

Fase estacionária:

Luna C18 (2) 5 u 100A (150 mm x 2,0 mm)

Fase Móvel:

A) H₂O contendo 5 mmol/L de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico

B) Acetonitrila

Fluxo: 0,25 mL/min

Temperatura do forno: 35 °C

Gradiente:

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	75	25
10	45	55
10,5	10	90
13,5	10	90
14	75	25
20	75	25

4.9. Ensaios de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio*

Os ensaios embrio-larvais com ovos fertilizados de *D. rerio* foram realizados seguindo as diretrizes da OECD- Guidelines for the Testing of Chemicals - Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD, 2013). Os experimentos foram realizados nas dependências do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob os cuidados da coordenadora do Núcleo de Zebrafish Luciani Carvalho e da técnica Bianca Helena Ventura Fernandes. A utilização dos animais para a experimentação foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina e protocolada com número de registro 019/17. (ANEXO 2)

4.9.1. Preparo das soluções-teste

Todas as soluções-teste foram preparadas no dia anterior à experimentação. Os valores de oxigênio dissolvido e pH foram registrados no início e no final de cada experimentação (entre 6,5 e 8,5). A água reconstituída utilizada no preparo e diluição das soluções-teste foi preparada conforme descrito na Tabela 11 (ABNT, 2016). Para cada litro de água reconstituída

(meio embriônico), foram adicionados 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução B, e o volume restante completado com água ultrapura.

Tabela 11: Composição da água reconstituída (ABNT, 2016).

Solução	Reagente	Concentração (g/L)
1	CaSO ₄ .2H ₂ O	1,5
	KCl	0,2
2	NaHCO ₃	4,8
	MgSO ₄ .7H ₂ O	6,1

Fonte: ABNT, 2016

Os extratos brutos metanólico (EBM) e aquoso (EBA) foram preparados a partir da extração de biomassa seca de *M. aeruginosa* LTPNA 08 (300 mg) com metanol 70% ou água reconstituída (30 mL), conforme o fluxograma ilustrativo da Figura 10. A extração foi realizada uma única vez e com tempo de lise na probe de ultrassom de 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em pré-filtros de fibra de vidro de 47 mm (Sartorius, Alemanha). O EBM foi seco em fluxo de N₂ e ressuspendido em 30 mL de água reconstituída antes de ser filtrado. Ao final da extração, soluções estoque de 10 mg de peso seco.mL⁻¹ foram obtidas para ambos os extratos. As soluções-teste foram preparadas a partir da diluição seriada dos extratos brutos (soluções estoque), obtendo-se concentrações de 0,0016, 0,008, 0,04, 0,2 e 1 mg de peso seco.mL⁻¹ de extrato bruto. Os extratos foram previamente caracterizados quanto à produção de metabólitos secundários por LC-HR-QTOF-MS/MS.

As soluções testes de microciclâmida (composto desconhecido de 582 Da e MG 770) foram preparadas com os compostos isolados e purificados de *M. aeruginosa* LTPNA 08. As soluções estoque foram preparadas pela ressuspensão do material seco em metanol (0,1%) e água ultrapura, obtendo-se soluções de 1 mg.mL⁻¹ e 2 mg.mL⁻¹, respectivamente. A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções testes com água reconstituída nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 µg.mL⁻¹.

Figura 10: Fluxograma ilustrativo do preparo dos extratos brutos EBA e EBM utilizados nos ensaios de FET.

4.9.2. Obtenção dos embriões de *D. rerio*

Os peixes da linhagem selvagem AB (Zebrafish International Resource Center, Eugene, Oregon) foram mantidos em condições laboratoriais padrão, com ciclo de luz 14:10 horas (claro/escuro), a 26 ± 1 °C. No dia anterior à experimentação, machos e fêmeas adultos (2 machos para cada fêmea) foram colocados em um mesmo tanque de criação, separados por uma divisória. Os peixes foram mantidos separadamente durante toda a noite, permitindo o processo de cortejo dos machos às fêmeas. Na manhã seguinte, no dia do início do ensaio, uma iluminação artificial foi colocada sobre o tanque de criação e a divisória removida para permitir o acasalamento dos peixes. O processo de acasalamento, desova e fertilização durou cerca de 30 a 40 minutos após o início da luz. Após esse período, os ovos produzidos foram coletados e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Prisma, Nikon Inc, Japão), foram selecionados apenas os ovos viáveis (embriões em fase de clivagem - 4 a 32 células). Foram excluídos os ovos não fertilizados (coagulados) e os embriões recém fertilizados (fase de zigoto ou 1-2 células). Os ovos selecionados foram então dispostos nas placas de 24 poços contendo as soluções teste.

4.9.3. FET - Ensaio de embriotoxicidade

Os ovos fertilizados foram expostos por 96 horas, em grupos de 20 indivíduos, à 5 diferentes concentrações (de 0,0016 a 1 mg de peso seco.mL⁻¹) de extrato bruto aquoso e metanólico de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08) e 5 concentrações (1, 5, 10, 25 e 50 µg.mL⁻¹) de 2 compostos isolados desta mesma linhagem (*m/z* 583 e MG 770). O ensaio foi realizado em sistema estático, sem renovação da solução teste, em placas de poliestireno de 24 poços contendo 2 mL de solução e 5 embriões por poço. Cada tratamento foi realizado em triplicada, incluindo os controles positivos (2% de etanol 96%) e negativos (água reconstituída) e o controle contendo solvente (metanol 0,1%). Os embriões foram mantidos em uma estufa a 26 ± 1 °C por 96 horas pós fertilização (hpf) e monitorados a cada 24 horas, com o auxílio de microscópio (Nikon, Tokyo, Japão), quanto à mortalidade. A cada observação, os embriões mortos eram contados e removidos dos poços para manter a qualidade da água e evitar contaminação. Foram avaliados os seguintes parâmetros indicadores de letalidade: (1) coagulação dos ovos fertilizados, (2) ausência de formação de somito, (3) ausência de desprendimento da cauda do saco vitelino e (4) ausência de batimento cardíaco (OECD, 2013). A eclosão dos embriões ocorre no período de 48 e 72 hpf, a partir desse momento também foram avaliados as malformações dos embriões/larvas, indicativo de teratogenicidade, como

edema do saco vitelínico, edema do pericárdio, edema do sistema digestivo, curvatura caudal e lordose, ausência de pigmentação do olho, alterações no tamanho corporal e alterações comportamentais como eclosão precoce ou tardia. No final do período de exposição (96 hpf), a toxicidade aguda foi determinada com base na observação de pelo menos um dos parâmetros de letalidade e, quando possível, a concentração necessária para produzir a morte de 50% dos indivíduos expostos (CL_{50}) foi calculada, assim como os valores de NOAEL (do inglês *No Observed Adverse Effect Level*) e LOAEL (do inglês *Lowest Observed Adverse Effect Level*), que representam, respectivamente, a dose em que não é observado efeito adverso e a menor dose em que é observado efeito adverso. A cardiotoxicidade, mais especificamente, foi avaliada por meio dos efeitos adversos das substâncias testadas no desenvolvimento do coração, através da observação de edemas cardíacos e alterações na frequência cardíaca, nos embriões com 96 hpf. O coração do embrião de *D. rerio* começa a bater com aproximadamente 24 hpf e é visível durante a primeira semana de desenvolvimento, o que possibilita a análise visual dos efeitos de substâncias químicas na formação cardíaca. As larvas sobreviventes foram imobilizadas para registro fotográfico e posterior identificação das alterações morfológicas causadas pelas substâncias em estudo. Finalizado o experimento, as larvas foram eutanasiadas por overdose de sulfonato metano de tricafina (MS-222) e destinados ao descarte adequado.

Na Figura 11 estão esquematizadas as etapas do preparo do teste de toxicidade com embriões de *D. rerio*, desde a obtenção dos embriões até o cálculo da CL_{50} .

Figura 11: Fluxograma ilustrativo do teste de toxicidade com embriões de *D. rerio*

Fonte adaptada: OECD, 2013

4.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram analisados através da análise de variância (One-way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas e pelo teste de Dunnett para a comparação do tratamento com o controle, considerando significância de 95% ($p < 0,05$). Valores de CL50 foram calculados através da análise de regressão não-linear. Os gráficos e todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism Versão 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção das linhagens de cianobactérias

As linhagens de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e NIES-299 foram selecionadas como objetos de estudo por produzirem cianopeptídeos da classe das microgininas. Em trabalhos anteriores com a linhagem LTPNA 08, verificou-se a produção majoritária das variantes MG 756 e MG 770, e a detecção de um pico cromatográfico intenso de m/z 583 $[M+H]^+$, co-eluído junto com as MC e MG (Carneiro et al. 2012). Devido à identidade desconhecida do composto, foi proposto o seu isolamento, junto com as MG, para posterior caracterização estrutural e avaliação ecotoxicológica. A linhagem NIES-299 foi selecionada devido ao conhecimento prévio da produção de variantes cloradas da MG.

5.2. Crescimento Celular

O crescimento celular da cepa LTPNA 08 (*M. aeruginosa*) foi avaliado a cada três dias durante 33 dias. A Figura 12 ilustra a curva de crescimento obtida. A partir da análise das equações, observou-se uma taxa de crescimento exponencial de 0,1715 e 0,1834, com crescimento exponencial até o 21º dia ($R^2 = 0,9811$ e $0,9638$), e taxa de crescimento total de 0,1304 e 0,1360, depois de 33 dias de cultivo, acompanhadas por densidade óptica e por microscopia óptica, respectivamente.

Figura 12: Curvas de crescimento da *M.aeruginosa* (LTPNA 08) em meio ASM-1. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

As fases de crescimento exponencial e estacionária são as fases onde se observa a maior produção de metabólitos secundários, desta forma, a curva de crescimento permitiu estabelecer essas fases de crescimento e o tempo ideal para a concentração das células e obtenção dos compostos de interesse de forma otimizada. Para a obtenção de biomassa optou-se por concentrar as células após 30 dias de cultivo, referente a fase exponencial tardia.

5.3. Avaliação da diversidade de oligopeptídeos produzidos pelas cianobactérias LTPNA 08 e NIES-299

O perfil metabólico das duas linhagens de *Microcystis* (LTPNA 08 e NIES-299) foi avaliado por LC-HR-QTOF-MS/MS. O perfil peptídico do extrato hidroalcoólico (MeOH 70%) de LTPNA 08 revelou a presença de 13 compostos majoritários nos tempos de retenção entre 25 e 30 minutos (Figura 13). Estes compostos (Tabela 12) foram caracterizados utilizando as informações referentes à exatidão de massa e padrão isotópico obtidas dos espectros *full scan* (MS) e MS^2 , agregado às informações obtidas sobre a linhagem em publicações e estudos anteriores ((Carneiro et al. 2012); (Bortoli et al. 2014); (Paiva et al. 2017); (Ferreira et al. 2019)).

Uma busca por íons moleculares protonados $[M+H]^+$ de peptídeos conhecidos e seus respectivos adutos de sódio $[M+Na]^+$ e espécies diméricas $[2M+H]$ foi feita, assim como a busca por perdas características de moléculas neutras ($-H_2O$, $-CO$, $-NH_3$). Além disso, a intensidade relativa e as diferenças de massa dos picos isotópicos foram analisadas para obter informações sobre a presença de possíveis átomos de halogênio, como cloro e bromo. A fórmula molecular, assim como o cálculo do erro experimental em ppm e o valor de mSigma foram obtidos com o uso do recurso *Smart Formula* do aplicativo de apoio *Compass Data Analysis*, levando em consideração informações precisas de massas e dados isotópicos. O mSigma é um fator de classificação desenvolvido pela Bruker Daltonics, que avalia, por meio de um score, se o desvio padrão das massas isotópicas medidas estão em concordância com as massas isotópicas teóricas, em perfil e intensidade. De forma geral, os valores de mSigma inferiores a 20 e os erros inferiores a 5 ppm são aceitáveis e indicam maior concordância à fórmula molecular proposta pelo programa *DataAnalysis-SmartFormula*.

Figura 13: Cromatograma representativo do extrato bruto hidroalcoólico de *M.aeruginosa* LTPNA 08 obtido por LC-HR-QTOF-MS/MS (ESI+). Os picos enumerados correspondem a (1) MC-RR; (2) desconhecido; (3) desconhecido; (4) desconhecido; (5) MG 756; (6) Micropeptina B; (7) Cianopeptolina 972C (8) Micropeptina A (9) MG770; (10) desconhecido; (11) MC-YR; (12) MC-LR e (13) MC-HilR.

Tabela 12: Tempos de retenção (TR), m/z experimentais, fórmulas moleculares, erros e valores de mSigma para os peptídeos detectados nos extratos de *Microcystis* sp. LTPNA 08.

Com posto	TR (min)	m/z experimental	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	mSigma	Identificação	Referência
1	24.7	1038.5773	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	-4.0	24.7	Microcistina-RR	Carneiro et al., 2012
2	26.2	569.1762	$C_{25}H_{29}N_8O_4 S_2$	-2.5	5.4	desconhecido	Ishida et al, 2000 Neste estudo Carneiro et al., 2012 e Riba et al., 2019
3	26.4	583.1890	$C_{26}H_{30}N_8O_4 S_2$	2.4	11.3	desconhecido	
4	26.9	742.4423	$C_{39}H_{60}N_5O_9$	-5.0	7.6	desconhecido	
5	27.3	756.4570	$C_{47}H_{75}N_8O_{13}$	-3.7	14.0	Microginina 756	
6	27.4	959.5491	$C_{47}H_{74}N_8O_{13}$	-0.3	9.8	Micropeptina B	Okino et al., 1993
7	27.5	973.5634	$C_{50}H_{77}N_{10}O_{12}$	-	-	Cianopeptolina 972C	Welker et al., 2006
8	27.6	987.5763	$C_{49}H_{79}N_8O_{13}$	-0.2	14.3	Micropeptina A	Okino et al., 1993
9	27.7	770.4713	$C_{41}H_{64}N_5O_9$	-1.9	4.4	Microginina 478	Ishida et al., 2000
10	28.7	784.4875	$C_{42}H_{66}N_5O_9$	-2.5	3.6	desconhecido	Carneiro et al., 2012 Krishnamurthy et al., 1989
11	29.3	1045.5391	$C_{52}H_{73}N_{10}O_{13}$	-3.6	11.1	Microcistina-YR	
12	29.6	995.5625	$C_{49}H_{75}N_{10}O_{12}$	-5.2	13.4	Microcistina-LR	
13	30.5	1009.5740	$C_{50}H_{77}N_{10}O_{12}$	-2.3	5.9	Microcistina	

Os espectros MS e MS² dos principais peptídeos identificados estão representados na Figura 14 (a-m). Uma busca por fragmentos ou séries de fragmentos indicativos foi realizada com base em espectros de fragmentos de peptídeos conhecidos (Welker et al. 2006).

Figura 14: Espectros de massas (MS e MS²) dos cianopeptídeos identificados na linhagem de *Microcystis* sp. LTPNA 08, analisados por LC-ESI-MS/MS (QTOF) em modo positivo. a) MC-RR (m/z 519.7899); b) desconhecido (m/z 569.1758); c) desconhecido (m/z 583.1936); d) desconhecido (m/z 742.4420); e) MG 756 (m/z 756.4563); f) micropeptina B (m/z 959.5488); g) cianopeptolina 972C (m/z 973.5634); h) micropeptina A (m/z 987.5780); i) MG 770 (m/z 770.4746); j) desconhecido (m/z 784.4880); k) MC-YR (m/z 1045.5383); l) MC-LR (m/z 995.5626) e m) microcistina (m/z 1009.5737). Em vermelho estão identificados os fragmentos considerados diagnósticos de determinadas classes de cianopeptídeos.

c)

d)

g)

h)

i)

j)

k)

l)

m)

Espectros de massas (MS²) típico das microcistinas foram obtidos para os compostos **1** (Fig. 13-a), **11** (Fig. 13-k), **12** (Fig. 10-l) e **13** (Fig. 13-m). Os compostos foram identificados como MC-RR ([M+2H]²⁺ m/z 519.7899), MC-YR ([M+H]⁺ m/z 1045.5383), MC-LR ([M+H]⁺ m/z 995.5626) e MC-HiLR ([M+H]⁺ m/z 1009.5737), respectivamente. Todos eles apresentaram nos espectros MS² perfil de fragmentação com íons de m/z 135 e m/z 213, considerados íons diagnóstico da estrutura geral das microcistinas. As microcistinas são peptídeos cíclicos que contém sete resíduos de aminoácidos em sua estrutura, incluindo o aminoácido incomum Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico). O íon m/z 135 é originário da clivagem alfa da cadeia lateral do resíduo Adda e o m/z 213 corresponde ao fragmento Glu-Mdha + H (Bateman et al. 1995). A produção desses compostos pela linhagem LTPNA 08 já foi relatada pelo grupo de pesquisa em trabalhos anteriores ((Carneiro et al. 2012); (Bortoli et al. 2014)).

Espectros MS² dos compostos **4** (Fig 13-d), **5** (Fig 13-e), **8** (Fig 13-h) e **9** (Fig 13-i) revelaram a presença dos íons m/z 128 e 142, característicos da estrutura geral das microgininas. Esses íons são originados da fragmentação entre C2 e C3 do resíduo *N*-terminal Ahda. Metilação *N*-terminal é uma ocorrência comum e explica o incremento de 14 Da ao íon m/z 128, gerando o íon produto de m/z 142 (Welker et al. 2006). Duas variantes metiladas [M+H]⁺ m/z 770.4746 (**8**) e [M+H]⁺ m/z 784.4880 (**9**) e duas variantes não metiladas [M+H]⁺ m/z 742.4420 (**4**) e [M+H]⁺ m/z 756.4563 (**5**) foram identificadas. É interessante notar que, todos os compostos apresentaram perfil de fragmentação semelhante, com uma diferença de massa de 14 Da entre eles. Os compostos **5** e **7** foram identificados como MG 756 (Ahda-Val-Leu-

HTyr-Tyr) e MG 770 (*MeAdha-Val-Leu-HTyr-Tyr*), conforme reportados na linhagem LTPNA 08 em trabalhos anteriores (Carneiro et al. 2012). No entanto, essas variantes apresentam a mesma massa e fórmula molecular que as microgininas 755 (*Ahda-Val-MeVal-MeTyr-Tyr*) e 478 (*MeAhda-Val-MeVal-MeTyr-Tyr*), descritas, respectivamente, por Welker et al. (2012) e por Ishida et al. (2000a). Carneiro et al. (2012) sugeriram novas estruturas para essas microgininas, com a substituição dos aminoácidos *MeVal* e *MeTyr* por *Leu* e *HTyr*, respectivamente, com base nos espectros de massas MS². Na ocasião, não foram realizados experimentos de RMN para a elucidação estrutural e o assinalamento sequencial dos aminoácidos, sendo a caracterização feita apenas com dados de MS e MS². A confirmação estrutural por RMN foi então proposta neste trabalho e os resultados discutidos a seguir.

Além dessas duas variantes já reportadas, dois novos compostos correlacionados foram identificados. O composto **4** (*m/z* 742.4420) apresentou diferença de massa de 14 Da em relação ao composto **5** (*m/z* 756.4563), sugerindo uma desmetilação na molécula. Ao comparar os espectros MS² de ambos os compostos, verificou-se apenas a ausência do sinal de *m/z* 86 no composto **4**, referente ao íon imônio de leucina (*Leu*), isoleucina (*Ile*) ou metilvalina (*MeVal*), indicando uma possível perda do grupamento metila em um desses aminoácidos, mais provável da *MeVal*. O composto **9** (*m/z* 784.4880), por sua vez, apresenta um incremento de 14 Da em relação ao composto **7**, sugerindo uma metilação na molécula. A ausência do íon de *m/z* 72, referente ao íon imônio da valina, indica uma possível metilação nesse aminoácido, levando à formação do aminoácido *MeVal*. Essa modificação na molécula é corroborada pela detecção de um íon intenso de *m/z* 86 na região de baixas massas, condizente com o íon imônio de *MeVal*. As microgininas **4** e **9** quando comparadas com bancos de dados e literatura disponíveis, não apresentaram equivalência com nenhuma outra molécula, indicando serem novos congêneres de microgininas. A sequência peptídica proposta para as microgininas **4** e **9** foram, respectivamente, *Ahda-Val-Val-N-MeTyr-Tyr* e *N-MeAhda-MeVal-MeVal-N-MeTyr-Tyr*.

Um terceiro grupo de peptídeos pertencentes à classe das cianopeptolinas foi identificado com base no perfil de fragmentação. Esta classe de peptídeos é caracterizada por uma parte acíclica constituída por seis aminoácidos, um dos quais é o aminoácido não-proteinogênico 3-amino-6-hidroxi-piperidona (*Ahp*). O fechamento do anel é estabelecido por uma ligação éster entre o grupo β-hidroxi de uma treonina conservada e o grupo carboxi do aminoácido C-terminal (valina ou isoleucina). Ao grupo amino da treonina está ligada uma cadeia lateral variável (Czarnecki et al. 2006). As cianopeptolinas são identificadas a partir de uma série de fragmentos que estão associados ao *Ahp*, comum a todas as cianopeptolinas. Em

Microcystis, a maioria dos congêneres de cianopeptolinas conhecidos apresenta uma das seguintes sequências parciais de aminoácidos: Ahp-Leu-MeTyr, Ahp-Phe-MeTyr, Ahp-Leu-MePhe ou Ahp-Phe-MePhe (Tabela 13). Durante a triagem do extrato bruto de LTPNA 08 foram identificadas três cianopeptolinas $[M+H]^+$ m/z 959.5488 (**6**), $[M+H]^+$ m/z 973.5634 (**7**) e $[M+H]^+$ m/z m/z 987.5780 (**8**). Os três compostos apresentaram a sequência parcial de aminoácidos Ahp-Leu-MeTyr e fragmentam com a perda inicial de uma molécula de água $[M+H - H_2O]$. Os compostos **6** e **8** apresentaram uma série de fragmentos em comum e os fragmentos com diferença de massa de 28 Da. Compostos com massas moleculares e perfis de fragmentação semelhantes foram encontrados na literatura: Micropeptina B ([Lys-Ahp-Leu-MeTyr-Val-O-Thr]-Glu-HA) e Micropeptin A [Lys-Ahp-Leu-MeTyr-Val-O-Thr]-Glu-OA (Okino et al. 1993b). Assim como nas cianopeptolinas **6** e **8**, as micropeptinas A e B apresentam diferença de massa de 28 Da, cuja variação corresponde à troca do ácido hexanóico (HA) pelo ácido octanóico (OA) na cadeia lateral (Czarnecki et al. 2006). Já o composto **7**, apresentou equivalência com a cianopeptolina 972C (Welker et al. 2012).

Tabela 13: Massas de fragmentos indicativos de quatro estruturas parciais de peptídeos da classe das cianopeptolinas

Fragmento	Sequência parcial de aminoácidos			
	Ahp-Leu-MePhe	Ahp-Leu-MeTyr	Ahp-Phe-MePhe	Ahp-Phe-MeTyr
Ahp-Phe-MeTyr - H ₂ O				420
Ahp-Phe-MePhe - H ₂ O			404	
Ahp-Leu-MeTyr - H ₂ O		386		
Ahp-Leu-MePhe - H ₂ O	370			
Phe-MeTyr - H ₂ O				308
Phe-MePhe - H ₂ O			292	
Leu-MeTyr - H ₂ O		274		
Leu-MePhe - H ₂ O	258			
Ahp-Phe - H ₂ O			243	243
Ahp-Phe - H ₂ O - CO			215	215
Ahp-Leu - H ₂ O	209	209		
Ahp-Leu - H ₂ O - CO	181	181		
MeTyr		150		150
MePhe	134		134	

Por fim, dois compostos, sendo um deles considerado o pico majoritário no perfil cromatográfico foram identificados, no entanto, não puderam ser classificados com base nos espectros de fragmentos de peptídeos conhecidos. Os picos foram denominados como compostos desconhecidos de m/z 569 (**2**) e m/z 583 (**3**).

Devido à produção majoritária do composto **3**, e do possível ineditismo da molécula, optou-se por realizar o seu isolamento e caracterização estrutural por RMN e posterior avaliação toxicológica.

O perfil metabólico da linhagem NIES-299 foi avaliado em busca das já descritas microgininas MG 299-A, MG 299-B, MG 299-C e MG 299-D ((Ishida et al. 1997); (Ishida et al. 1998)). As microgininas MG 299-D e MG 299-B são variantes dicloradas e a MG 299-A monoclorada. A busca por essas variantes foi realizada por meio do cromatograma de íon extraído, cujo os íons selecionados foram m/z 887.5, 921.4, 853.5 e 758.4 (Figura 15). A intensidade relativa e as diferenças de massa dos picos isotópicos foram analisadas e foi verificada a presença de 2 átomos de cloro nas MG 299-B e MG 299-D e de um átomo de cloro na MG 299-A. A MG 299-C, por outro lado, não mostrou o padrão isotópico característico do cloro, indicando a ausência desse elemento na molécula.

Figura 15: Cromatogramas de pico base (Base peak chromatogram) do extrato bruto metanólico de NIES-299 (A) e dos íons extraídos (m/z 887.5, 921.4, 853.5 e 758.4) (B).

5.4. Extração dos cianopeptídeos para isolamento e purificação

O material liofilizado de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e NIES-299 foi submetido à extração hidroalcóolica com MeOH:H₂O (70:30, v/v) e submetido ao pré-fracionamento em colunas de extração em fase sólida. O extrato bruto foi eluído com diferentes concentrações de metanol acidificado com 0,1% de HCOOH para a obtenção de frações com diferentes polaridades (40, 60, 80 e 100 %).

As frações obtidas no processo de SPE foram analisadas por LC-HR-QTOF-MS/MS antes de serem submetidas ao processo de isolamento em escala semi-preparativa. A análise

permitiu identificar as frações contendo os compostos de interesse, direcionando o processo de isolamento.

Como pode ser observado na Figura 16, para o extrato de LTPNA 08, as microgininas e o composto desconhecido de $[M+H]^+$ m/z 583 foram detectados tanto na fração de 60% como na de 80% de MeOH acidificado. No extrato de NIES-299 (Figura 17), as microgininas também foram detectadas em ambas as frações, no entanto, elas se concentraram mais na fração de 80% de MeOH acidificado.

Figura 16: Cromatograma de pico base (*Base peak chromatogram*) das frações obtidas por extração em fase sólida (eluição com 40, 60, 80 e 100% de metanol acidificado com 0,1% HCOOH) a partir de 1g de extrato bruto de *M. aeruginosa* LTPNA 08. Os picos enumerados correspondem a (1) MC-RR, (2) desconhecido (m/z 583), (3) cianopeptolinas, (4) MG 756, (5) MG 770 e (6) MC-LR.

Figura 17: **a)** Cromatograma de pico base (*Base peak chromatogram*) das frações obtidas por extração em fase sólida (elução com 20, 40, 60 e 80% de metanol acidificado com 0,1% de HCOOH), a partir de 1g de extrato bruto de *M. aeruginosa* NIES-299. **b)** Cromatograma de íon extraído (m/z 887.5, 921.4, 853.5 e 758.4). Os picos enumerados correspondem a (1) MG 299-A (m/z 887.5), (2) MG 299-C (m/z 853.5), (3) MG 299-D (m/z 758.4) e (4) MG 299-B (m/z 921.4)

a).

b).

5.5. Isolamento e purificação dos cianopeptídeos de interesse

A etapa de isolamento e purificação do composto desconhecido de íon molecular protonado m/z 583 (**3**) e das microgininas MG 756 (**5**) e MG 770 (**9**) em escala semipreparativa se procedeu a partir das frações metanólica acidificada de 60% e 80%, obtidas no processo de pré-fracionamento por SPE. Os picos da fração metanólica acidificada de 60% foram monitorados e coletados no comprimento de onda de 225 nm, obtendo-se ao final 6 subfrações enriquecidas com MC-RR (Fração 1), composto **3** de m/z 583 (Fração 2), cianopeptolina (Fração 3), MG 756 (Fração 4), MG 770 (Fração 5) e MC-LR (Fração 6), conforme mostrado na Figura 18 e Figura 19.

Figura 18: Cromatograma representativo da fração metanólica acidificada de 60% (SPE), obtidas a partir do extrato de 1 g de biomassa de *M. aeruginosa* LTPNA 08, e os espectros de absorção UV dos respectivos picos coletados, monitorados em comprimento de onda 225 nm. As listras diagonais enumeradas indicam as subfrações coletadas que correspondem aos compostos (1) MC-RR; (2) pico desconhecido; (3) mistura de cianopeptídeos; (4) MG765; (5) MG770 e (12) MC-LR.

Figura 19: Cromatograma representativo da fração metanólica acidificada de 80% (SPE) obtido a partir do extrato de 1 g de biomassa de *M. aeruginosa* LTPNA 08, e espectros de absorção UV dos respectivos picos coletados em gradiente isocrático de 40% de B e monitorados em 278 nm. As listras diagonais enumeradas indicam as subfrações coletadas que correspondem aos compostos (1) MG765; (2) MG770 e (3) MC-LR.

Espectros de absorção característicos das microcistinas ($\lambda_{\text{máx}}$ 238 nm) foram verificados nas subfrações 1 e 6 na fração de 60% (SPE) e na subfração 3 da fração de 80% (SPE) e das microgininas ($\lambda_{\text{máx}}$ 225 e 278 nm) nas subfrações 3, 4 e 5 na fração de 60% e nas subfrações 1 e 2 da fração de 80% (SPE).

As microcistinas são identificadas pelo seu espectro de absorção UV máximo em 238 nm, graças à presença de duas duplas conjugadas e de um anel aromático no aminoácido Adda, tornando-o um excelente cromóforo. Como esse aminoácido é comum à todas as microcistinas,

os dados de espectrometria de massas e de absorção UV podem ser utilizados como ferramentas confirmatórias da presença desses compostos em uma amostra (Meriluoto 1997). As microgininas, por outro lado, apresentam absorção máxima de UV em 225 e 278 nm, que indicam a presença de um aminoácido aromático (tirosina, triptofano ou fenilalanina) na molécula. De fato, as microgininas apresentam em sua estrutura a predominância de duas unidades de tirosina na porção C-terminal (Welker e Von Döhren 2006), responsáveis pela absorção máxima em 278 nm. No entanto, outros compostos que apresentam aminoácidos aromáticos em sua estrutura apresentam espectros de absorção semelhantes, como é o caso das cianopeptolinas. Portanto, para as microgininas, o espectro de absorção máximo em 278 nm é somente um indicativo da presença desses compostos, mas não necessariamente confirmatório.

As subfrações coletadas foram analisadas novamente por LC-HR-QTOF-MS/MS para avaliar o êxito do processo de isolamento e identificação dos compostos isolados e submetidas a etapas de re-isolamento até a obtenção de frações com compostos com alto teor de pureza. Ao final do processo de isolamento e purificação, foram obtidas 3 frações com compostos puros de MG 756, MG 770 e do composto $[M+H]^+$ m/z 583. A partir da extração de 15 g de biomassa seca, obteve-se um rendimento de x mg do composto $[M+H]^+$ m/z 583, x mg de MG 756 e x mg de MG 770.

As Figura 20, Figura 21 e Figura 22 contêm os cromatogramas de pico base (*Base peak chromatogram*) e os espectros *full scan* (MS) e *tandem* (MS2) das substâncias purificadas da fração de 60%. A massa exata experimental e teórica e fórmula molecular foram geradas pelo aplicativo *SmartFormula* do software Data Analysis, que mostraram baixos valores de erro e mSigma, indicando a alta concordância à fórmula molecular proposta (Tabela 14).

Tabela 14: Cianopeptídeos isolados a partir de extrato bruto de *M.aeruginosa* LTPNA 08 (Fração SPE MeOH acidificado 60%)

Composto	m/z experimental	m/z teórico	Fórmula Molecular	erro (ppm)	mSigma
$[M+H]^+$ m/z 583	583.1909	583.1904	C ₂₆ H ₃₀ N ₈ O ₄ S ₂	-0.8	3.6
MG 756	756.4559	756.4542	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	-2.2	5.3
MG 770	770.4735	770.4699	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₉	-4.7	7.7

Figura 20: Cromatograma representativo da subfração contendo o composto desconhecido (3) e os respectivos espectros MS e MS₂, adquiridos por LC-HR-QTOF-MS/MS

Figura 21: Cromatograma representativo da subfração contendo MG 756 (5) e os respectivos espectros MS e MS₂, adquiridos por LC-HR-QTOF-MS/MS

Figura 22: Cromatograma representativo da subfração contendo MG 770 (9) e os respectivos espectros MS e MS₂.

O isolamento das microgininas MG 299-A, MG 299-B e MG 299-C, produzidas pela linhagem NIES-299 seguiu o mesmo procedimento de extração e fracionamento utilizado para o extrato de LTPNA 08. Ele foi conduzido a partir da fração metanólica de 80% acidificada, obtida a partir de 2 g de biomassa seca. As microgininas foram monitoradas no comprimento de onda de 278 nm e, ao final, 3 frações enriquecidas com os cianopeptídeos foram coletadas, com espectros de absorção máxima em 225 e 278 nm (Figura 23).

Figura 23: Cromatograma representativo da fração metanólica acidificada de 80% obtida a partir do pré-fracionamento por SPE de 2 g de biomassa de NIES-299. As listras diagonais enumeradas indicam as subfrações coletadas, monitoradas nos comprimentos de onda de 278 nm, que correspondem aos compostos (1) MG 299-A (m/z 887); (2) MG 299-C (m/z 853); (3) MG 299-D (m/z 758) e MG 299-B (m/z 921).

Essas subfrações foram analisadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS para a identificação dos compostos presentes e submetidas à sucessivos re-isolamentos até a obtenção de compostos puros. As Figuras 23, Figura 24 e a Figura 25 contêm os cromatogramas (*Base peak chromatogram*) das subfrações isoladas e os respectivos espectros de absorção UV e massas. Ao final do processo de isolamento e purificação, foram obtidos, respectivamente, 0,62, 1,86 e

0,81 mg de microgininas MG 299-A, MG 299-B e MG 299-C, a partir da fração metanólica de 80% (SPE) obtidos de 2 g de extrato bruto de *M. aeruginosa* NIES-299.

Figura 24: Cromatograma representativo da subfração purificada contendo MG-299A e os respectivos espectros de absorção UV e massas *full scan* (MS).

Figura 25: Cromatograma representativo da subfração purificada contendo MG-299C e os respectivos espectros de absorção UV e massas *full scan* (MS).

Figura 26: Cromatograma representativo da subfração purificada contendo MG-299B e os respectivos espectros de absorção UV e massas *full scan* (MS).

5.6. Elucidação estrutural do composto **3** de 582 Da

O composto **3**, de massa molecular 582 Da, foi isolado a partir de extrato hidroalcoólico de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) por sucessivas separações por HPLC-DAD semipreparativo de fase reversa. A análise do composto purificado por LC-HR-ESI-QTOF-MS/MS identificou o íon molecular $[M+H]^+$ m/z 583,1896 correspondente à fórmula molecular $C_{26}H_{30}N_8O_4S_2$ (m/z teórico 583,1904, erro 1,4 ppm e mSigma 9,8).

Os dados de RMN, com valores de deslocamento químico de hidrogênio (δH) e de carbono (δC) do composto **3** (582 Da) encontram-se resumidos na Tabela 15. Dados de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas, foram comparados com dados disponíveis na literatura, permitindo a elucidação da estrutura planar do composto **3** (Figura 27), conforme discutido a seguir.

Tabela 15: Dados de RMN do composto desconhecido de m/z 583, isolado da *Microcystis* sp. LTPNA08, em DMSO-d6 e dados comparativos obtidos da literatura (Ishida et al. 2000b).

Unidade	Posição	Microcyclamide (Ishida <i>et al.</i> , 2000b)			Composto 3 (m/z 583)				
		δ_H (mult., J)	δ_C (mult.)	δ_N	δ_H (mult., J) ^a	δ_C ^b	δ_N ^c	NOESY	HMBC
MeOxazol	1		159.6 (s)			159.45			
	2		153.5 (s)			153.37			
	3		127.8 (s)			127.37			
	4	2.60 (s)	11.2 (q)		2.60 (s)	11.03			H4/C2 e C3
	N(1)			242.3					
Ala	5		161.2 (s)			161.14			
	6	5.19 (qd, 6.8, 6.0)	44.1 (d)		5.17 (m)	43.82			H6/C5
	7	1.53 (d, 6.8)	19.1 (q)		1.53 (d)	18.88			
	NH(2)	8.58 (d, 6.0)		116.5	8.53 (d)		117.91	N(2)-H/H7	N(2)-H/C5 e C8
Tiazol	8		159.3 (s)			159.31			
	9		147.7 (s)			147.32			
	10	8.48 (s)	125.9 (d)		8.41 (s)	125.63			H10/C11
	N(3)			305.0					
	11		169.0 (s)			169.55			
N-MeHis	12	6.01 (ddd, 9.4, 9.0, 5.1)	49.6 (d)		5.89 (m)	50.36		H12/H17	H12/C11
	13a	3.36 (dd, 15.4, 9.0)	30.8 (t)		3.27 (dd)	30.54			
	13b	3.50 (dd, 15.4, 5.1)			3.33 (dd)				
	14		130.2 (s)			126.57			
	N(4)			174.0					
Tiazol	15	8.98 (s)	135.7 (d)		7.48 (s)	138.14			
	16	7.40 (s)	119.0 (d)		6.59 (s)	127.68			
	17	3.84 (s)	33.2 (q)		3.47 (s)	30.70		H17/H15	
	NH(6)	8.94 (d, 9.4)		115.0	8.76 (d)		117.37	N(6)-H/H13b	N(6)-H/C18
	18		159.3 (s)			159.27			
Tiazol	19		147.7 (s)			148.07			
	20	8.28 (s)	125.2 (s)		8.37 (s)	125.09			H20/C21
	N(7)			305.4					
	21		167.8 (s)			167.82			
	22	5.31 (dd, 7.7, 6.0)	54.4 (d)		5.34 (dd)	54.13		H22/H24b	H22/C21
Ile	23	2.01 (m)	40.2 (d)		2.02 (m)	39.97			
	24a	1.18 (m)	25.3 (t)		1.17 (m)	25.01			
	24b	1.59 (m)			1.57 (m)			H24/H22	
	25	0.94 (t, 7.3)	11.5 (q)		0.94 (t)	11.28			
	26	0.81 (d, 6.4)	14.5 (q)		0.79 (d)	14.35			
	N-H (8)	8.42 (d, 7.7)		117.4	8.43 (d)		118.62	N(8)-H/H23 e H26	N(8)-H/C1

^a ¹H (800 MHz), ¹³C (200 MHz) e ¹⁵N (90 MHz)

^b Multiplicidade e assinalamento por experimentos HSQC

Figura 27: Estrutura química proposta para o composto 3, mostrando as correlações assinaladas nos experimentos de RMN.

A natureza peptídica do composto foi sugerida pela presença de 3 sinais dubletos de prótons amídicos (H-N) no espectro 1D ^1H (Figura 28), com deslocamentos químicos de δ 8.76 (N6), 8.53 (N2) e 8.43 (N8), e pela presença de 6 sinais de carbono sp^2 na região das amidas (δ_{C} 159.2 - 169.55) no espectro de RMN ^{13}C . Experimentos bidimensionais de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N HSQC (Figura 29) confirmaram a presença dos três prótons amídicos (δ 117.37 (N6), 117.91 (N2) e 118.62 (N8), os quais não apresentaram correlações diretas com núcleos de carbono no experimento de ^1H , ^{13}C HSQC (Figura 30).

Figura 28: Espectro de RMN ^1H (geral e ampliado) do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO- d_6 .

Figura 29: Espectros de ^1H - ^{15}N HSQC do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO- d_6 .

Figura 30: Espectros de ^1H - ^{13}C HSQC do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO- d_6 .

Os espectros de ^1H , ^{13}C HSQC editado (Figura 31) conferem a multiplicidade e o assinalamento dos carbonos (CH_3 , CH_2 ou CH). Quatro hidrogênios diasterotópicos H-13a (δ_{H} 3.27) e H-13b (δ_{H} 3.33) e, H-24a (δ_{H} 1.17) e H-13b (δ_{H} 1.57) puderam ser identificados. Verificou-se também 2 singletos com δ_{H} 8.41 e 8.38, em concordância com uma unidade tiazol, os quais foram atribuídos através das correlações no experimento de ^1H , ^{13}C HSQC.

Figura 31: Espectros de ^1H - ^{13}C HSQC editado do composto 3 (desconhecido m/z 583) em $\text{DMSO-}d_6$. Em rosa estão assinalados os carbonos CH_3 e CH e em verde os carbonos CH_2 .

As correlações dos experimentos ^1H , ^1H TOCSY (Figura 32) permitiram as atribuições do sistema de *spin* dos aminoácidos isoleucina e alanina. O resíduo de *N*-metil-histidina foi estabelecido com base nas correlações de ^1H , ^1H TOCSY, ^1H , ^{13}C HSQC, ^1H , ^{13}C HMBC e NOESY.

Figura 32: Espectros de ^1H - ^1H TOCSY do composto 3 (desconhecido m/z 583) em $\text{DMSO-}d_6$, indicando os sistemas de spin dos aminoácidos alanina (Ala), isoleucina (Ile) e *N*-Metilhistidina (*N*-MeHis).

As unidades tiazol-*N*-metil-histidina e tiazol-isoleucina foram estabelecidas no experimento de ^1H , ^{13}C HMBC (Figura 33) através das correlações entre os hidrogênios 10 e 12 com o carbono 11 e os hidrogênios 20 e 22 com o carbono 21, respectivamente. A unidade metil-oxazol-alanil foi sugerida com base nas correlações estabelecidas no experimento de ^1H , ^{13}C HMBC entre os hidrogênios metílicos (CH_3 -4) ligados ao anel aromático com os carbonos 2 e 3 e entre os hidrogênios 6 e N(2)-H (próton amídico da alanina) com o carbono 5. Os valores de δ_{H} e δ_{C} encontrados estão de acordo com os valores relatados na literatura para a mesma unidade.

Figura 33: Espectros de ^1H - ^{13}C HMBC do composto 3 (desconhecido m/z 583) em DMSO-d_6 . A) Espectro ampliado da região dos aromáticos; B) Espectro ampliado da região dos alifáticos

A)

B)

Por fim, a estrutura planar do composto m/z 583, foi estabelecida através da conexão dos três fragmentos identificados (tiazol-*N*-metil-histidina, tiazol-isoleucina e metil-oxazol-alanil) com base nas correlações ^1H , ^{13}C HMBC entre o próton amídico da alanina (N(2)-H) com o carbono 8, o próton amídico da isoleucina (N(8)-H) com o carbono 1 e o próton amídico da *N*-metilhistidina (N(6)-H) com o carbono 18. As correlações verificadas no experimento NOESY (Figura 34) auxiliaram nas atribuições corretas da conectividade dos resíduos de aminoácidos, fornecendo detalhes estruturais da molécula. A Figura 27 ilustra a estrutura química proposta para o composto **3** e as correlações assinaladas.

Figura 34: Espectros ^1H - ^1H NOESY do composto **3** (desconhecido m/z 583) em $\text{DMSO-}d_6$.

A partir da comparação dos espectros de RMN (1D e 2D) obtidos para a substância de massa molecular 582 Da, isolada da linhagem de *Microcystis* sp. LTPNA 08, com dados obtidos da literatura, foi possível verificar grandes similaridades com os compostos microciclamida (Ishida et al. 2000b), Microciclamida A (Raveh et al. 2010) e Microciclamida GL582 (Raveh et al. 2010). Assim como o composto isolado neste trabalho, os três compostos apresentam fórmula molecular e massas moleculares aproximadas (Microciclamida: HRFABMS (positivo) $C_{26}H_{31}N_8O_4S_2$ m/z 583.1931 $[M+H]^+$, Microciclamida A: HREIMS $C_{26}H_{30}N_8O_4S_2$ m/z 582.1831(MH⁺) e Microciclamida GL582: HREIMS $C_{26}H_{30}N_8O_4S_2$ m/z 582.1830 (MH⁺), verificadas nas análises realizadas por espectrometria de massas de alta resolução.

Segundo Raveh et al. (2010), as pequenas diferenças verificadas nos valores de deslocamento químico entre os compostos Microciclamida A e Microciclamida GL582 sugerem que os compostos diferem em pelo menos um dos quatro centros estereogênicos presentes em sua estrutura, confirmado posteriormente por análises utilizando reagente de Marfey's. Já a Microciclamida A isolada por Raveh et al. (2010) se mostrou idêntica à microciclamida isolada e caracterizada por Ishida et al. (2000b) (Figura 35).

Figura 35: (A) Estrutura química da Microciclamida, isolada da *Microcystis aeruginosa* NIES-299 (Ishida et al. 2000b) e da Microciclamida A isolada de uma floração de *Microcystis* sp. (Raveh et al. 2010). (B) Estrutura química da Microciclamida GL582 (Raveh et al. 2010)

A espectrometria de massas é frequentemente usada para validar os resultados obtidos por RMN. Assim, o espectro MS² obtido para o composto **3** (Figura 36) foi confrontado com a estrutura química proposta e as atribuições dos íons produtos formados foram feitas (Tabela 16).

Figura 36: Espectros MS e MS₂ obtidos por LC-HR-ESI-QTOF-MS/MS para o composto **3**, de m/z 583.

Tabela 16: Atribuição dos íons fragmento do composto **3**, de m/z 583, gerados por LC-HR-QTOF-MS/MS.

Atribuição dos íons fragmentos	3 (m/z 583)
Ciclo[<i>MeOxz-Ala-Thz-N-MeHis-Thz-Ile</i>]	583.1947
<i>MeOxz-Ala-Thz-N-MeHis-Thz-Ile</i> – NH ₃	566.1648
<i>MeOxz-Ala-Thz-Thz-Ile</i>	487.1236
<i>Thz-N-MeHis-Thz-Ile</i>	431.1320
<i>Thz-His-Thz-Ile</i>	
<i>Thz-His-Thz-Ile</i> – NH ₃	
<i>MeOxz-Ala-Thz-N-MeHis</i>	387.1225
<i>MeOxz-Ala-Thz-N-MeHis</i> – NH ₃	370.0955
<i>Thz-Ile- MeOxz-Ala</i>	350.1189
<i>Thz-N-MeHis</i>	235.0668
<i>Thz-Ile</i>	198.0596
<i>Thz-Ile</i> – H ₂ O	180.0482
<i>MeOxz-Ala</i>	153.0660
Fragmento de <i>N-MeHis</i>	96. 0689

A atribuição da sequência correta dos aminoácidos de um peptídeo cíclico por espectrometria de massas é muitas vezes dificultada devido à inúmeras possibilidades de abertura do anel, que pode ocorrer de forma randômica a partir das ligações peptídicas da molécula, levando à formação de íons lineares isobáricos nos espectros de fragmentação (Ngoka e Gross 1999); (Eckart 1994)). Nesse sentido, a RMN é uma ferramenta muito mais interessante, já que as técnicas bidimensionais e de NOE permitem o assinalamento dos aminoácidos e a atribuição das conectividades e orientações entre resíduos de aminoácidos, oferecendo informações estruturais de peptídeos de forma muito mais simples. No entanto, miligramas de material puro são necessários para as análises, o que muitas vezes é impossível de se obter se tratando de um produto natural.

5.7. Elucidação estrutural da MG 770

A MG 770 foi previamente descrita por Carneiro et al. (2012) com base em dados de espectrometria de massas. Embora a análise por HRMS/MS, baseada em informações de massa exata, padrão isotópico e perfil de fragmentação (MS e MS²), seja uma ferramenta poderosa para a identificação e elucidação estrutural parcial de oligopeptídeos, ela por si só não é suficiente para a completa elucidação estrutural de moléculas, principalmente por não conseguir distinguir fragmentos com massas quase idênticas (isóbaros). Neste contexto, a espectroscopia de RMN torna-se uma forte aliada para uma completa elucidação estrutural. Como a elucidação

estrutural da MG 770 por RMN não havia sido realizada em trabalhos anteriores, ela foi proposta no presente trabalho.

A MG 770 foi isolada a partir de extrato hidroalcoólico de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) por sucessivas separações por HPLC-DAD semi-preparativo de fase reversa. A análise do composto purificado por espectrometria de massas de alta resolução (LC-HR-QTOF-MS/MS) identificou o íon molecular $[M+H]^+$ de m/z 770, 4723 correspondente à fórmula molecular $C_{41}H_{63}N_5O_9$ (m/z teórico 770, 4699, erro -3, 2 ppm e mSigma 5.0). Os dados de RMN, com valores de deslocamento químico de hidrogênio (δH) e de carbono (δC) do composto **3** (582 Da) encontram-se resumidos na Tabela 17.

Tabela 17: Dados comparativos de ^1H e ^{13}C RMN da microginina 478 (Ishida *et al.*, 2000) e da MG770, isolado da *Microcystis* sp. LTPNA08, em DMSO- d_6 .

Unidade	Posição	Microginina 478 (Ishida <i>et al.</i> , 2000)		MG 770				
		δ_{H} , (mult., J)	δ_{C} , (mult.)	δ_{H} , (mult., J) ^a	δ_{C} ^b	δ_{N} ^c	HMBC	NOESY
MeAhda	1		171.0 (s)		172.6			
	2	4.18 (br)	68.3 (d)	3.87	70.2			
	3	3.20 (brdd)	60.0 (d)	2.60	61.3			
	4	1.51 (m)	27.3 (t)	1.23	25.7			
	5	1.23 (m)	24.9 (t)	1.34				
		1.30 (m)		1.26	29.4			
	6	1.22 (m)	28.8 (t)	1.34				
	7	1.22 (m)	28.3 (t)	1.23	28.9			
	8	1.22 (m)	31.1 (t)	1.23	31.1			
	9	1.24 (m)	22.0 (t)	1.26	21.8			
	10	0.85 (t, 7.0)	13.9 (q)	0.85	13.7			
	2-OH	6.73 (d, 5.5)						
	3-NH	8.30 (br)						
Val	N9(1)	2.52 (s)	30.8 (q)	2.27	33.5			
	1		170.7 (s)		172.2			
	2	4.42 (dd, 8.7, 5.3)	53.4 (d)	4.44 (dd, 8.9, 4.9)	52.4			
	3	1.63 (qqd)	29.4 (d)	1.55 (m)	29.5			
	4	0.72 (d, 7.0)	16.7(q)	0.69 (d, 6.8)	16.3			
	4'	0.78 (d, 6.6)	19.8 (q)	0.78 (d, 6.6)	19.7			
N-MeVal	NH	7.95 (d, 8.7)		7.78 (d, 7.8)		114.0		
	1		169.4 (s)		169.2			
	2	4.84 (d, 10.6)	57.9 (d)	4.77	57.5			
	3	2.12 (dqg)	26.4 (d)	2.09	26.0			
	4	0.59 (d, 6.6)	17.8 (q)	0.56	17.5			
	4'	0.77 (d, 6.6)	19.8 (q)	0.73	19.7			
N-MeTyr	N-Me	2.39 (s)	29.2 (q)	2.31	29.0			
	1		169.9 (s)		-			
	2	5.44 (dd, 11.6, 5.0)	55.7 (d)	5.41	55.8			
	3	2.73 (dd, 15.2, 11.6)	33.1 (t)	2.71	32.5			
		3.03 (dd, 15.2, 5.0)		3.05				
	4		127.1 (s)		127.01			
	5,9	6.94 (d, 7.3)	129.3 (d)	6.94	129.2			
	6,8	6.62 (d, 7.3)	114.8(d)	6.62	114.7			
	7		155.9 (s)		155.6			
	N-Me	2.65 (s)	30.1 (q)	-	-			
	OH	9.20 (br)		9.20				

Tyr	1		172.7 (s)			
	2	4.36 (ddd)	53.6 (d)	3.71		
	3	2.80 (dd, 14.1, 9.0)	35.6 (t)	2.84		
		2.96(dd, 14.1, 5.0)		2.98		
	4		127.4 (s)		127.17	
	5,9	6.94 (d, 7.3)	129.9 (d)	6.97	129.9	
	6,8	6.62 (d, 7.3)	114.9(d)	6.63	114.6	
	7		155.9 (s)		155.9	
	NH	7.92 (d, 7.7)		7.07		121.7
	OH	9.20 (br)		9.20		

A análise dos dados dos experimentos de RMN (^1H , COSY, TOCSY, NOESY, HSQC e HMBC) e espectrometria de massas, juntamente com dados disponíveis na literatura, permitiram a elucidação da estrutura química da MG 770 (Figura 37), conforme discutido a seguir.

Figura 37: Estrutura química proposta para a MG 770, mostrando as correlações assinaladas nos experimentos de RMN.

Seguindo os procedimentos da metodologia de atribuição sequencial proposto por Wuthrich (1986), foram identificados primeiramente os sistemas de *spin* referente aos aminoácidos presentes na molécula em estudo. Experimentos bidimensionais de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N HSQC (Figura 38) indicaram a presença de três sinais de hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio (H-N), com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios amídicos δ_{H} 7.78, 7.73 e 7.07, e δ_{N} 114.0, 114.5 e 121.7, respectivamente.

Figura 38: Espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC do composto MG 770 em DMSO- d_6 .

O espectro ^1H RMN mostrou também a presença de dois picos largos de sinais singletto de prótons fenólicos com deslocamentos químicos de δ_{H} 9.20 (Figura 39).

Figura 39: Espectro 1D ^1H do composto MG 770 em $\text{DMSO}-d_6$.

O espectro de ^1H , ^{13}C HSQC de carbono indicou a presença de 5 sinais de CH na região dos aromáticos e 9 sinais de prótons próximos de heteroátomos, além de assinalar 8 hidrogênios diasterotópicos (Figura 40).

Figura 40: Espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC editado do composto MG 770 em $\text{DMSO}-d_6$.

Os experimentos 2D de RMN, incluindo COSY, TOCSY e HSQC editado, estabeleceram a presença de 4 sistemas de *spins* (Figura 41), dos quais dois pertencem aos aminoácidos comuns Val e Tyr e dois aos respectivos aminoácidos metilados *N*-MeVal e *N*-MeTyr. O sistema de *spin* da *N*-MeAhdA foi parcialmente identificado nos espectros de COSY e TOCSY.

Figura 41: Espectro 2D de ^1H - ^1H TOCSY do composto MG 770 em $\text{DMSO-}d_6$, destacando os (a) hidrogênios fenólicos e os sistemas de *spins* dos aminoácidos: (b) valina, (c) tirosina, (d) *N*-metilvalina, (e) *N*-metiltirosina.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

A identificação dos sistemas de *spins* dos aminoácidos *N*-metilados foi feita com base na atribuição das correlações a partir do $H\alpha$, já que o hidrogênio amídico (NH) está ausente nesses aminoácidos modificados. A identificação do grupo metila foi feita com base nas correlações heteronucleares 1H , ^{13}C de HMBC detectadas entre os grupos *N*-metil e os $H\alpha$ do aminoácido correspondente. Assim, o aminoácido *N*-MeVal foi deduzido pela correlação entre os hidrogênios metílicos (*N*-Me) com δH 2.31 e o carbono C-2 com δC 57.5 ppm. A correlação entre o *N*-Me e o C-2 da *N*-MeTyr não foi observada no espectro de HMBC, no entanto, no espectro de NOESY foi possível identificar a correlação entre o grupo *N*-Me (δH 2.48) e o $H\alpha$ (δH 5.41). A combinação de dados de HMBC e NOESY permitiu determinar a sequência peptídica do composto MG 770. Assim, correlações de longo alcance (HMBC) entre $H\alpha$ ou grupos *N*-Me com carbonos carbonílicos de aminoácidos adjacentes, mais correlações NOESY entre os $H\alpha$ e os prótons *N*-Me permitiram estabelecer a seguinte sequência de aminoácidos *N*-MeAhda-Val-*N*-MeVal-*N*-MeTyr-Tyr. A baixa resolução dos espectros HMBC podem estar ligados ao tempo de aquisição necessário para este tipo de experimento.

A microginina 478, descrita anteriormente por Ishida et al. (2000a), foi isolada de uma linhagem de *M.aeruginosa* (NIES-478) e apresenta a mesma fórmula molecular ($C_{41}H_{63}N_5O_9$) do composto em estudo. Através de dados espectrais de RMN e HRFABMS, foi caracterizada como sendo um pentapeptídeo linear contendo três resíduos *N*-metilados com a sequência de aminoácidos *Me*Ahda-Val-*Me*Val-*Me*Tyr-Tyr. Os valores de deslocamento químico dos dois compostos foi comparado, assim como os dados de fragmentação obtidos por espectrometria de massas para a correta caracterização da molécula MG 770.

O novo congêner de microginina proposto por Carneiro et al. (2012), com a substituição dos resíduos *N*-metilados MeVal e MeTyr pelos aminoácidos Leu e HTy, foi proposto com base no perfil de fragmentação do composto em condições de baixa energia de dissociação (CID), que favorece a formação de fragmentos tipo **-b**. No espectro MS² da MG 770 (Figura 42) foi observada a abundância dos seguintes íons: *m/z* 142.1596, 182.1541, 271.1657, 281.2229, 299.2336, 359.1587, 412.3170 e 589.3967.

Figura 42: Espectros MS e MS² da MG 770, isolada da linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08, obtidos por LC-ESI-QTOF-MS/MS

A detecção de microgininas por LC-MS/MS foi baseada na busca dos íons diagnósticos do Ahda e de suas variantes, que são os fragmentos de íon *m/z* 128 para o fragmento Ahda, *m/z* 142 para o fragmento MeAhda (Welker et al. 2006), *m/z* 162 para o fragmento Cl-Ahda e *m/z* 196 para o fragmento Cl₂-Ahda (Ishida et al. 1997). Um sinal proeminente do íon *m/z* 142 foi observado no espectro MS² da MG770, consistente com o fragmento oriundo da dissociação da ligação entre C2 e C3 no resíduo *N*-terminal do ácido *N*-metil-3-amino-2-hidroxidecanóico (MeAhda), assim como a perda de um resíduo de Tyr [*M*+*H* – 181]⁺ na porção C-terminal da molécula, originando o íon de *m/z* 589.3967 (**-b₄**). A presença de resíduos de Tyr, MeTyr, HTy e Pro na porção C-terminal é bastante comum nessa classe de cianopeptídeos, o que auxilia na interpretação dos dados de fragmentação. Já o fragmento de *m/z* 412.3170 (**-b₃**) é condizente com a perda sequencial dos aminoácidos Tyr e *N*-MeTyr/HTyr da porção C-terminal, onde se observa uma diferença de 177 Da em relação ao íon **-b₄** ou de 358 Da em relação ao [*M*+*H*]⁺. Observou-se também um íon pouco intenso de *m/z* 299 (**-b₂**), cuja diferença de 113 Da em relação ao **-b₃** indica a perda do resíduo de *N*-MeVal, Leu ou Ile. Fragmentos sequenciais de

m/z 281.2229 e m/z 271.1657 (**-a2**) foram atribuídos à perda neutra de água (-18 Da) ou monóxido de carbono (-28 Da) a partir do íon de m/z 299. Buscou-se também a presença de íons imônio na região de baixas massas do espectro, uma vez que tais íons podem fornecer informações inerentes à composição de aminoácidos de um peptídeo. Foram observados os seguintes íons imônio: m/z 72.1 (Val), m/z 86.1 (*N*-MeVal, Leu ou Ile), m/z 136.1 (Tyr) e m/z 150.1 (*N*-MeTyr ou HTyr).

Segundo a regra clássica de fragmentação por CID, em peptídeos lineares, a *N*-metilação resulta no favorecimento da fragmentação da ligação amida no lado C-terminal deste resíduo, com formação preferencial de íon **-b** (Paizs e Suhai 2005). Dessa forma, a formação de íons **-y** não é favorecida. No entanto, fragmentos proeminentes de m/z 182 e m/z 359, condizentes com os íons **-y1** e **-y2** foram detectados. Razão pela qual foi proposta à estrutura da MG 770 a substituição dos aminoácidos *N*-MeVal e *N*-MeTyr pelos aminoácidos Leu e HTyr, respectivamente (Carneiro et al. 2012). No entanto, ao analisar o composto por experimentos de RMN, não foram detectados sinais de correlação dos aminoácidos Leu/Ile e HTyr, e sim dos aminoácidos *N*-MeVal e *N*-MeTyr, conforme proposto inicialmente por Ishida et al. (2000a). Sistemas de *spin* característicos dos aminoácidos Val e Tyr também foram identificados, indicando a presença desses dois aminoácidos na composição do peptídeo. Esses resultados condizem com os fragmentos encontrados nos espectros MS² do composto de $[M+H]^+$ m/z 770, o qual exibiu um fragmento de $[M+H - 181]^+$, indicando a perda do resíduo de tirosina da porção *N*-terminal, e a presença de um sinal intenso na região de baixas massas referente ao íon imônio de Val (m/z 72). A presença de dois resíduos aromáticos também foi confirmada, pela presença de um fragmento intenso de $[M+H - 358]^+$, condizente com a perda dos aminoácidos tirosina e *N*-MeTyr ou HTyr.

Outro congênere de microginina (MG 756) produzido pela linhagem *M. aeruginosa* (LTPNA 08), apresentou um perfil de fragmentação semelhante ao da MG 770, no entanto, também não havia dados de RMN para essa molécula. Foi observado uma diferença de massa de 14 Da entre uma série de íons fragmento dos dois compostos, indicando uma desmetilação na molécula. A MG 756 foi isolada e purificada seguindo a mesma metodologia utilizada para MG 770. A análise por LC-HR-QTOF-MS/MS, da MG 756 identificou o íon molecular $[M+H]^+$ m/z 756.4558 corresponde à fórmula molecular C₄₁H₆₃N₅O₉ (m/z teórico 756.4542, erro -2.0 ppm e mSigma 5.3). No espectro MS² da MG 756 (Figura 43) foi observada a abundância dos seguintes íons: m/z 128.1434, 168.1386, 267.2061, 335.2319, 359.1607, 398.3003, 434.2980, 462.2964 e 575.3763.

Figura 43: Espectros MS e MS² da MG 756 obtidos por LC-ESI-QTOF-MS/MS em modo positivo de ionização.

Assim como na fragmentação da MG 770, foram observados os mesmos íons proeminentes, mas com a diferença de massa de 14 Da, que corresponde a perda de um grupo metil (CH₂). O íon de m/z 128 foi atribuído ao fragmento oriundo da dissociação da ligação entre C2 e C3 no resíduo do ácido 3-amino-2-hidroxidecanóico (Ahda), na porção *N*-terminal do peptídeo. Conforme discutido para o composto MG 770, a fragmentação de peptídeos com metilação no nitrogênio amídico resulta no favorecimento da formação de íons tipo **-b**. Com exceção do íon de m/z 359.1607, que poderia corresponder ao íon **-y4**, os demais fragmentos detectados são do tipo **-b** ou **-a** (perda neutra de CO a partir do íon **-b**). O íon **-y4**, referente à Tyr não foi observado no espectro MS² da MG 756. Pode-se inferir então que íon de m/z 182 observado no espectro MS² da MG 770 não corresponde à Tyr, pois se esse fragmento fosse oriundo da fragmentação C-terminal, com formação de íon [Tyr+H]⁺, esperar ia-se um sinal de m/z 182 também nos espectros MS² da molécula desmetilada, já que ambas possuem um resíduo de Tyr na porção C-terminal. Em vez disso, foi observado um íon de m/z 168, fragmento com 14 Da de diferença em relação ao íon de m/z 182 observado para MG 770. Tanto o fragmento m/z 168, como o m/z 182 podem ser atribuídos à quebra da ligação amídica do resíduo de Adha ou *N*-MeAdha (**-b1**) com perda neutra de água.

As atribuições dos íons fragmentos obtidos no espectro MS² para os compostos MG 756 e MG 770 estão resumidas na Tabela 18.

Tabela 18: Atribuição dos fragmentos obtidos nos espectros MS² para os compostos MG 756 e MG 770.

Atribuição dos íons fragmentos	(<i>m/z</i> 756)	(<i>m/z</i> 770)
<i>N</i> -MeAhda-Val- <i>N</i> -MeVal- <i>N</i> -MeTyr-Tyr + H		770.4723
Ahda-Val- <i>N</i> -MeVal- <i>N</i> -MeTyr-Tyr + H	756.4558	
<i>N</i> -MeAhda-Val- <i>N</i> -MeVal- <i>N</i> -MeTyr + H		589.3967
MeAhda-Val- <i>N</i> -MeVal- <i>N</i> -MeTyr + H	575.3763	
<i>N</i> -MeAhda-Val- <i>N</i> -MeVal + H		412.3170
<i>N</i> -MeAhda-Val- <i>N</i> -MeVal - H ₂ O + H		394.3071
Ahda-Val- <i>N</i> -MeVal + H	398.3003	
Ahda-Val- <i>N</i> -MeVal - H ₂ O + H	380.2897	
<i>N</i> -MeTyr-Tyr + H	359.1587	359.1601
<i>N</i> -MeAhda-Val + H		299.2336
<i>N</i> -MeAhda-Val - H ₂ O + H		281.2229
<i>N</i> -MeAhda-Val - CO + H		271.1657
<i>N</i> -MeAhda-Val - H ₂ O - CO + H		253.2265
Ahda-Val + H	285.2162	
Ahda-Val - H ₂ O + H	267.2061	
Ahda-Val - CO + H	257.2213	
Ahda-Val - H ₂ O - CO + H	239.2111	
<i>N</i> -MeAhda - H ₂ O + H		182.1541
Ahda - H ₂ O + H	168.1386	
Fragmento de Adha	128.1434	
Fragmento de <i>N</i> -MeAdha		142.1596
Íon imônio de <i>N</i> -MeTyr/Hty	150.0922	150.0923
Íon imônio de <i>N</i> -MeVal-Leu/Ile		86.0962

5.8. Triagem de microgininas pelo método de varredura do íon precursor (*Precursor ion scan*)

O método de *precursor ion scan* por LC-MS/MS (QqQ) foi testado em 66 linhagens de cianobactérias mantidas no LTPNA e 7 amostras ambientais coletadas de lagos e reservatórios brasileiros. Os resultados da triagem suspeita de microgininas estão compilados na Tabela 19. As amostras positivas estão identificadas com as massas dos íons precursores que deram origem aos respectivos íons produto selecionados (íons diagnósticos).

Tabela 19: Detecção e possível identificação de variantes de microgininas após triagem suspeita por LC-QqQ-MS/MS em modo *precursor ion scan*.

Identificação (Código)	Espécie	Íons Precursores [M+H] ⁺			
		128	142	162	196
LTPNA DBG 02		-	-	-	-
LTPNA DBG 05		-	-	-	-
LTPNA DBG 06		-	-	-	-
LTPNA DBG 07	Leptolyngbya sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 08	Leptolyngbya sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 12	Tolypothrix sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 16		-	-	-	-
LTPNA DBG 21		-	-	-	-
LTPNA DBG 27	Aliinostoc sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 28	Aliinostoc sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 29		-	-	-	-
LTPNA DBG 32		-	-	-	-
LTPNA DBG 34		-	-	-	-
LTPNA DBG 44	Tolypothrix sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 46	Leptolyngbya sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 50		-	-	-	-
LTPNA DBG 51		-	-	-	-
LTPNA DBG 52	Aliinostoc sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 54	Calothrix sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 55	Aliinostoc sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 57		-	-	-	-
LTPNA DBG 58		-	-	-	-
LTPNA DBG 62	Aliinostoc sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 72	Nostoc sp.	-	-	-	-
LTPNA DBG 83	Nostoc sp.	-	-	-	-
CENA 21	Nostoc piscinale	-	-	-	-
CENA543	Nostoc sp.	-	-	-	-

CENA596	Nodularia spumigena	-	-	-	-
CENA777	Microcystis aeruginosa	902,6	-	804,4	885,4
CCIBt 3106	Microcystis aeruginosa	754,2	-	788,2	822,4
CCIBt 3168	Rhabdoderma sp.	-	-	-	-
CCIBt 3180	Microcystis panniformis	-	-	-	-
CCIBt 3194	Microcystis aeruginosa	-	-	-	-
CCIBt 3214	Geitlerinema unigranulatum	-	-	-	-
CCIBt 3247	Nostoc sp.	-	-	-	-
CCIBt 3265	Desertifilum tharense	-	-	-	-
CCIBt 3275	Desertifilum tharense	-	-	-	-
CCIBt 3289	Calothrix sp.	-	-	-	-
CCIBt 3292	Nostoc sp.	-	-	-	-
CCIBt 3307	Komarekiella atlantica	-	-	-	-
CCIBt 3313	Chlorogloopsis sp.	-	-	-	-
CCIBt 3320	Calothrix sp.	-	-	-	-
CCIBt 3321	Tolypothrix sp.	-	-	-	-
CCIBt 3324	Leptolyngbya sp.	-	-	-	-
CCIBt 3329	Nostoc sp.	-	-	-	-
CCIBt 3330	Cyanosarcina sp.	-	-	-	-
CCIBt 3338	Leptolyngbya sp.	-	-	-	-
CCIBt 3343	Dolichospermum sp.	-	-	-	-
CCIBt 3454	Microcystis aeruginosa	-	-	-	-
CCIBt 3464	Scytonema sp.	-	-	-	-
CCIBt 3496	Myxosarcina sp.	-	-	-	-
CCIBt 3551	Brasilonema octagenarum	-	-	-	-

CCIBt 3626	Gloecapsa sp.	-	-	-	-
LTPNA06	Limnothrix redekei	-	-	-	-
LTPNA07	Limnothrix redekei	-	-	-	-
LTPNA08	Microcystis aeruginosa	742,2/756,2	607,4/756,4/ 770,4/784,4	-	-
LTPNA09	Microcystis aeruginosa	742,2/756,2	607,4/756,4/ 770,4/784,0	-	-
LTPNA10	Oscillatoria sp.	-	-	-	-
LTPNA10A	Planktothrix mougeotti	-	-	-	-
ITEP24	Sphaerospermopsis torques-reginae	576,0	-	-	-
ITEP26	Sphaerospermopsis torques-reginae	-	-	-	-
NPCD-1	Microcystis aruginosa	742,4	-	-	-
MIRS-04	Microcystis panniformis	-	-	-	-
NIES-99	Microcystis aruginosa	738,2	770,4	594.4/772.2/ 804.4	806,4
NIES-299	Microcystis aruginosa	690,0/853,2	-	724,4/804,4/ 887,4	724.4/804.4/ 887.4
NIES-478	Microcystis aruginosa	593,2/756,0	770,4/607,2	-	-
AMERICANA	Amostra ambiental	754,2/738,2	-	788,2	822,2
JUIZ DE FORA	Amostra ambiental	-	-	-	-
FUNIL	Amostra ambiental	754,4	605,4/768,4	788,2	-
NAZARÉ	Amostra ambiental	-	-	-	-
P15	Amostra ambiental	-	-	-	-
Sto Antonio	Amostra ambiental	-	-	-	-
Nazaré	Amostra ambiental	-	-	-	-
AL-9.4		728,2/851,0	605,2/742,2/ 768,4/837,4	-	-
IL-349		-	-	-	-
IL-428		-	-	-	682,2

Foram detectadas possíveis variantes de MG em 9 amostras de linhagens de cianobactérias e em 2 amostras ambientais. Algumas massas detectadas foram compatíveis com massas de MG já identificadas na literatura (ANEXO 1), outras não. O método de *precursor ion* por LC-ESI-QqQ-MS/MS é rápido e sensível, no entanto não é capaz de gerar informações de massa exata e padrão isotópico com tamanha acurácia e exatidão quanto um espectrômetro de massas de alta resolução. Dessa forma, para a identificação e confirmação das massas suspeitas, as amostras consideradas positivas foram também analisadas via LC-HR-ESI-QTOF-MS/MS.

A busca pelas massas detectadas no método de *precursor ion scan* permitiu a identificação e confirmação de MG em 7 das 9 amostras de extrato de cianobactérias e em 2 amostras ambientais. Os valores de massa exata (m/z) e fórmula molecular, calculadas pelo recurso *Smart Formula*, e os espectros de fragmentação (MS^2) das MG detectadas foram comparados com a literatura, a fim de identificar as variantes já descritas, bem como propor novos congêneres. Das 19 variantes de MG identificadas, 9 apresentaram massa molecular e perfil de fragmentação diferentes daquelas já reportadas na literatura, indicando a possibilidade de ser um novo congênere de MG. Algumas apresentaram perfil de fragmentação semelhante àquelas já descritas, mas com diferença de unidade de massas de 14 Da ($-CH_2$), 34 Da ($-Cl$) ou 16 Da ($-O$), referente à metilação, cloração ou desidroxilação na molécula. Uma das variantes produzida pela linhagem NIES-478 de m/z 740, 4607 apresentou na porção *N*-terminal da molécula o anidroAhda (Ada), assim como nas MG 99-A e MG 99-B (Ishida et al., 1998), resultante da desidroxilação do aminoácido Ahda.

Na Tabela 20 estão listados os congêneres de MG identificados nas amostras após confirmação por espectrometria de massas de alta resolução.

Tabela 20: Tempos de retenção (TR), m/z experimental e teórica, fórmulas moleculares, erros e valores de mSigma para as microgenias detectadas em extratos de cianobactérias e amostras ambientais, por LC-ESI-QTOF-MS/MS.

CEPA	TR (min)	m/z experimental	m/z teórica	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	mSigma	Identificação	Referência
CCIBt 3106	6.9	754.4406	754.4386	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₉	-2.7	21.1	Cyanostatin B	Sano et al., 2005
	6.8	788.3983	788.3996	C ₄₀ H ₅₉ ClN ₅ O ₉	-1.6	25.4	Microginin KR787	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
LTPNA 08	6.0	742.4396	742.4399	C ₃₉ H ₅₉ N ₅ O ₉	-1.4	15.7	MG 742	Este estudo
	6.2	756.4552	756.4542	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	-1.4	5.1	MG 755	Riba et al., 2019
	6.5	770.4722	770.4699	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₉	-3.0	5.0	MG 770 (MG 478)	Ishida et al., 2000
	6.8	784.4847	784.4855	C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₉	1.0	3.6	MG 784B	Riba et al., 2019
	7.0	784.4846	784.4855	C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₉	1.2	13.6	MG 784	Este estudo
LTPNA 09	6.0	742.4386	742.4386	C ₃₉ H ₅₉ N ₅ O ₉	-0.1	18.1	MG 742	Este estudo
	6.3	756.4539	756.4542	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	0.5	2.8	MG 755	Riba et al., 2019
	6.5	770.4724	770.4699	C ₄₁ H ₆₄ N ₅ O ₉	-3.3	4.5	MG 770 (MG 478)	Ishida et al., 2000
	6.8	784.4854	784.4855	C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₉	0.1	6.7	MG 784B	Riba et al., 2019
	7.0	784.4854	784.4855	C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₉	0.1	24.6	MG 784	Este estudo
NPCD-1	7.9	742.4401	742.4386	C ₃₉ H ₅₉ N ₅ O ₉	-2.1	8.7	?	
NIES-99	6.3	738.4448	738.4436	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₈	-1.5	3.8	?	
	6.7	806.3660	806.3657	C ₄₀ H ₅₇ Cl ₂ N ₅ O ₈	-0.3	9.4	MG-99B	Ishida et al., 1998
NIES-299	6.0	853.5077	853.5070	C ₄₀ H ₆₈ N ₆ O ₁₀	-0.8	9.8	MG-299A	Ishida et al., 1997
	5.9	887.4698	887.4680	C ₄₅ H ₆₇ ClN ₆ O ₁₀	-2.0	17.9	MG-299C	Ishida et al., 1998
	6.5	921.4318	921.4290	C ₄₅ H ₆₆ Cl ₂ N ₆ O ₁₁	-3.0	6.1	MG-299B	Ishida et al., 1997
NIES-478	6.0	607.3899	607.3854	C ₃₅ H ₅₁ N ₄ O ₅	-7.4	18.1	?	Este estudo
	6.2	756.4550	756.4542	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	-1.0	2.2	MG 756	Riba et al., 2019
	6.4	740.4607	740.4593	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₈	-1.9	7.6	?	Este estudo
	6.5	770.4503	770.4487	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₉	-6.9	3.4	MG 478	Ishida et al., 2000
Microcystis sp. Americana	5.5	788.4020	788.3996	C ₄₀ H ₅₉ ClN ₅ O ₉	-3.0	7.1	Cyanostatin B	Sano et al., 2005

	5.7	754.4416	754.4386	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₉	-4.0	3.4	Microginin KR787	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
	5.8	822.3641	822.3606	C ₄₀ H ₅₈ N ₅ O ₉ Cl ₂	-4.2	15.1	?	Este estudo
	6.0	738.4460	738.4436	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₈	-3.2	10.0	?	
Microcystis sp. Funil	5.5	788.4025	788.3996	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₉ Cl	-3.7	17.0	Microginin KR787	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
	5.8	754.4405	754.4386	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₉	-2.6	10.7	Cyanostatin B	Sano et al., 2005
	5.8	605.3923	605.3909	C ₃₂ H ₅₂ N ₄ O ₇	-2.3	14.5	Microginin KR604	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
	6.1	768.4546	768.4542	C ₄₁ H ₆₁ N ₅ O ₉	-2.4	0.7	Microginin KR767	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018

É interessante notar que todas as amostras positivas para a triagem de microgininas pertencem à espécie de cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e mesmo dentro de uma mesma espécie, os congêneres produzidos são variados. Essa capacidade de produzir diferentes cianopeptídeos está relacionada com os genes envolvidos na via biossintética desses compostos. Dentro de uma espécie existem cepas não produtoras, que carecem do gene envolvido na biossíntese de um determinado cianopeptídeo, assim como cepas que carregam o gene, mas que nem sempre são expressos (Janssen 2019). Devido à essa regulação genética, a produção de cianopeptídeos é altamente variável entre as cianobactérias e podem ser influenciados por fatores bióticos e abióticos (Benayache et al. 2019).

Os espectros MS obtidos por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* e os espectros obtidos via LC-HR-ESI-QTOF-MS/MS das microgininas identificadas nas amostras estão representadas nas Figura 44, Figura 45, Figura 46, Figura 47, Figura 48, Figura 49, Figura 50 e Figura 51.

Figura 44: Espectros MS da amostra CCIBt 3106 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas na amostra por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

A)

B)

Figura 45: Espectros MS das amostras LTPNA 08 e 09 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

A)

B)

Figura 46: Espectros MS da amostra NPCD-01 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

A)

Figura 47: Espectros MS da amostra NIES-99 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

A)

B)

Figura 48: Espectros MS da amostra NIES-299 obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

B)

B)

Figura 50: Espectros MS da amostra ambiental AMERICANA obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

A)

B)

Figura 51: Espectros MS da amostra ambiental FUNIL obtida por LC-ESI-QqQ-MS/MS no modo *Precursor ion scan* (A) e os espectros MS e MS₂ das microgininas detectadas por LC-ESI-QTOF-MS/MS (B).

A)

B)

O método de *Precursor ion scan* foi desenvolvido para a triagem rápida de compostos da classe das microgininas. Esses peptídeos, quando submetidos à dissociação induzida por colisão (CID), são fragmentados gerando os íons de m/z 128, 142, 162 ou 196 nos espectros de fragmentação MS₂, referentes à fragmentação do aminoácido Adha. Os fragmentos m/z 142, 162 e 196 são gerados, respectivamente, quando se tem uma metilação *N*-terminal no aminoácido Adha ou uma cloração (mono ou di) no carbono da cadeia lateral do aminoácido, respectivamente. Esses íons são considerados diagnósticos dessa classe de peptídeos e, portanto, podem ser utilizados na triagem e na identificação de possíveis variantes estruturais. Os analitos, caracterizados por possuírem porções comuns da molécula, são rastreadas usando o modo de varredura do íon precursor, fornecendo também dados semi-quantitativos.

Esse tipo de análise tem ganhado destaque principalmente em estudos de lipidômica, na busca de biomarcadores de doenças metabólicas (Lydic et al. 2009) e na descoberta de novas drogas sintéticas (Montesano et al. 2013). Métodos de triagem *precursor ion scan* vêm sendo usados também na área de produtos naturais, com diversos trabalhos publicados nos últimos anos ((Zhou et al. 2009); (Quadri et al. 2013); (Yan et al. 2014); (Shen et al. 2015); (Crevelin et al. 2017)). Um método de triagem de microcistinas por LC-MS/MS foi desenvolvido por Miles et al. (2013), em que se buscou os íons precursores que geravam o íon produto de m/z 135, fragmento indicativo da presença do Adda. Recentemente, foi relatado na literatura um método de *precursor ion scan* para compostos da classe das microgininas (Zervou et al. 2020).

5.9. Ensaios de Toxicidade aguda com embriões de *D. rerio*

5.9.1. Avaliação da toxicidade de extratos brutos de *M. aeruginosa* (LTPNA 08)

Os extratos brutos de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) obtidos da extração aquosa e extração hidroalcoólica foram avaliados quanto à sua toxicidade (teratogenicidade e cardiotoxicidade) em embriões de *D. rerio* por um período de 96 h. Os laudos técnicos foram emitidos seguindo a Norma 236 da OECD (OECD, 2013) e estão anexados no final do trabalho (ANEXOS 2 ao 5).

Os extratos foram previamente caracterizados quanto à produção de metabólitos secundários por LC-HR-QTOF-MS/MS e as microcistinas presentes quantificadas (em análise). A Figura 52 mostra a concentração dos principais compostos detectados nos extratos em termos de área relativa. Ambos os extratos apresentaram perfis semelhantes de produção de cianopeptídeos.

Figura 52: Gráfico representativo da produção de cianopeptídeos no EBA e EBM

Ao final do processo de extração, os extratos brutos obtidos apresentaram colorações visualmente distintas (Figura 53). A água sendo um extrator mais polar que o metanol pode ter contribuído para a extração mais eficiente de pigmentos como a clorofila, responsável pela coloração verde.

Figura 53: Coloração dos EBA (A) e EBM (B) obtidos após extração de 200 mg de *M.aeruginosa* LTPNA 08 com (A) água reconstituída e (B) metanol 70%.

Apesar da faixa de concentração testada ser grande, ao final do período experimental de 96 hpf, observou-se um efeito de dose dependência do extrato bruto aquoso (EBA) em relação à sobrevivência dos animais, resultando em taxa progressiva de letalidade dos embriões/larvas. Nas concentrações de 0,2 e 1 mg.mL⁻¹ houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em comparação com o controle e os demais tratamentos (Figura 54). As taxas de mortalidade dos controles negativo (água reconstituída) e positivo (etanol 2%) foram de 0 e 76%, respectivamente.

Figura 54: Taxa de mortalidade (%) dos embriões expostos por 96 hpf às concentrações de 0,0016, 0,008, 0,04, 0,2 e 1 mg.mL⁻¹ de extrato bruto aquoso (EBA), em comparação ao controle negativo.

(*) valores de $p < 0.05$ após análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett e Tukey.

Para o extrato bruto metanólico (EBM), a relação dose-resposta não foi tão evidenciada, observando-se um efeito com letalidade dos embriões/larvas superior a 50% apenas na dose de

1 mg.mL⁻¹ com diferença estatística significativa (p<0.05) em comparação com o controle e as demais concentrações testadas (Figura 55).

Figura 55: Taxa de mortalidade (%) dos embriões expostos por 96 hpf às concentrações de 0,0016, 0,008, 0,04, 0,2 e 1 mg.mL⁻¹ de extrato bruto metanólico (EBM), em comparação ao controle negativo.

(*) valores de p<0.05 após análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett e Tukey

Como observado nos gráficos de taxas de mortalidade, o EBA se mostrou mais tóxico em relação ao EBM, com 100% de mortalidade dos embriões na maior concentração testada (1 mg.mL⁻¹) para o EBA e 88% de mortalidade para o EBM.

Os valores de CL₅₀ (Tabela 21) obtidos após 96 h de exposição para o EBA e EBM foram de 0,25 mg.mL⁻¹ e 0,46 mg.mL⁻¹, respectivamente. Os valores de LOAEL foram calculados com base na menor dose que causou efeito adverso (% de mortalidade) aos embriões/larvas após 96 h de exposição.

Tabela 21: Valores de CL₅₀, NOAEL e LOAEL com intervalos de confiança de 95% obtidos para os embriões/larvas de *D. rerio* expostos aos extratos aquoso e metanólico de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) após 96 h de exposição.

Composto	NOAEL (mg.mL ⁻¹)	NOAEL (mg.mL ⁻¹)	CL50 (mg.mL ⁻¹)
Extrato bruto aquoso (EBA)	ND	0.04	0,25 (0,15-0,27)
Extrato bruto metanólico (EBM)	ND	0.2	0.46 (0,40-0,52)

Efeitos teratogênicos foram avaliados com base na observação de malformações durante o desenvolvimento dos embriões/larvas expostos às substâncias por 96 hpf. Ambos os extratos não apresentaram efeitos teratogênicos (malformações) aparentes sobre os embriões nas concentrações estudadas de 0,0016 a 0,2 mg.mL⁻¹ em comparação com o controle (água reconstituída). Na dose de 1 mg.mL⁻¹ não foi possível analisar esses parâmetros devido à morte precoce dos animais com 24 hpf. Já o efeito cardiotoxico após 96 hpf foi observado apenas no

tratamento com EBM. Na dose de 1 mg.mL^{-1} do EBM, 57% das larvas analisadas apresentaram formação de edema no pericárdio, indicativo de cardiotoxicidade (Figura 56).

Figura 56: Embriões com 96 hpf. (A) Animal do grupo controle negativo, com desenvolvimento cardíaco normal (*) e (B) Animal exposto ao tratamento com EBM (1 mg.mL^{-1}) com edema no pericárdio (→)

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, em que se verificou maior toxicidade de extratos brutos de cianobactérias do que de compostos isolados, inclusive de microcistinas, conhecidas pela sua ação hepatotóxica. Oberemm et al. (1997), por exemplo, não verificaram nenhum efeito tóxico agudo de microcistinas puras (MC-RR, -LR, -YR) em concentrações de até $50 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ sobre os embriões de *D. rerio*. No entanto, verificaram malformações e altas taxas de mortalidade durante o desenvolvimento embrional quando expostas à vários extratos aquosos de cianobactérias, contendo concentrações variadas de MC-LR. Edema cardíaco pronunciado e curvatura dorsal foram as principais alterações morfológicas observadas. Nenhum dos embriões tratados com extrato bruto evoluiu para estágios larvais, sendo a morte reportada nos primeiros 5 dpf. Assim como no trabalho de Oberemm et al. (1997), o EBA apresentou toxicidade aguda, com taxa de mortalidade dos embriões nos primeiros dias de vida, e o EBM causou, além da letalidade de embriões, edemas cardíacos como principal alteração nos organismos vivos.

Palíková et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes frações obtidas no processo de extração de biomassa de cianobactérias sobre o desenvolvimento embrio-larval de *C. carpio* e verificaram diferentes níveis de toxicidade das frações. Amostra *in natura* de floração de cianobactérias e o extrato bruto aquoso, independentemente do conteúdo de microcistinas presentes, foram os mais tóxicos para os embriões em desenvolvimento. Por outro lado, frações obtidas por SPE, contendo microcistinas concentradas, induziram pouco ou nenhum efeito tóxico aos embriões/larvas. E mais, algumas frações livres de microcistinas resultaram em mortalidade significativa ou induziram efeitos secundários aos animais. Esses resultados mostraram que os efeitos sobre o desenvolvimento embrio-larval de *C. carpio* foram

independentes do conteúdo de microcistina e que outros compostos produzidos por cianobactérias podem estar envolvidos na toxicidade, assim como possíveis interações sinérgicas entre vários constituintes da biomassa de cianobactérias (Palíková et al. 2007).

Segundo Wu et al. (2012) algumas espécies de cianobactérias, especialmente aquelas dominantes em florações, como *M. flosaquae*, *M. aeruginosa*, *Anabaena* e *Ap. flos-aquae*, podem produzir quantidades significativas de ácidos retinóicos. Esses compostos podem estar relacionados com o aumento das frequências de deformidades e o declínio das populações locais de vertebrados aquáticos (Wu et al. 2013, Wu et al. 2012). Produto metabólico da clivagem oxidativa dos carotenoides, o ácido retinóico é um dos principais mediadores do desenvolvimento embrionário e, consequentemente, um potente teratogênico ((Wu et al. 2013, Wu et al. 2012); (Jaja-Chimedza et al. 2017)). Dessa forma, é possível que os carotenóides possam contribuir de maneira semelhante para esses efeitos nos ecossistemas aquáticos, como precursores biossintéticos dos retinóides. Ao contrário das cianotoxinas reconhecidas, os carotenóides não são filogeneticamente restritos e são produzidos por todas as cianobactérias, tanto como pigmentos acessórios, quanto para proteção contra o estresse foto oxidativo associado (Jaja-Chimedza et al. 2017). A embriotoxicidade dos carotenóides em *D. rerio*, considerado um modelo de vertebrado aquático ambientalmente relevante, destaca o potencial impacto dessa toxicidade nas populações de vertebrados aquáticos. Assim como as microcistinas, esses pigmentos nos extratos brutos EBA e EBM podem ter causado as altas taxas de letalidade nos ensaios de FET, no entanto, devido à complexidade metabólica desses extratos é difícil atribuir a sua toxicidade a um determinado composto. Existe ainda o potencial efeito sinérgico entre os diferentes componentes do extrato sobre a toxicidade.

Como a faixa de concentração testada foi muito alta e os efeitos foram observados apenas nas concentrações mais elevadas (0,2 e 1 mg.mL⁻¹), o indicado seria testar uma faixa de concentração mais estreita, que incluísse as doses testadas que apresentaram efeito tóxico sobre o desenvolvimento embrional de *D. rerio*. Esse refinamento pode gerar informações de efeitos teratogênicos ou outros efeitos tóxicos que não foram observados na faixa de concentração testada neste estudo. A caracterização dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e a investigação da toxicidade desses compostos individualmente e em combinação são essenciais para a compreensão das substâncias responsáveis pelos efeitos negativos.

5.9.2. Avaliação da toxicidade de cianopeptídeos isolados de *M. aeruginosa* (LTPNA 08)

A embriotoxicidade dos cianopeptídeos isolados, identificados como MG 770 e Microciclâmica 583 foi avaliada através do percentual de mortalidade e anomalias morfológicas observadas nos embriões e larvas de *D. rerio*, após 96 h de exposição à diferentes concentrações desses compostos. As taxas de mortalidade dos controles negativo (água reconstituída) e positivo (etanol 2%) foram de 3% e 76%, respectivamente.

Ao final do período experimental (96 hpf), observou-se que concentrações entre 1 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do composto MG 770 não produziram diferenças estatísticas significativas nas taxas de letalidade dos embriões/larvas em comparação ao controle (Figura 57). Como a taxa de sobrevivência dos animais expostos às concentrações de 1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MG 770 foi de aproximadamente 90%, não foi possível obter uma curva dose-resposta para o cálculo da CL50. Também não foram observadas malformações indicativas de efeitos teratogênicos ou cardiotoxicos (edema cardíaco), nas concentrações estudadas, que fossem diferentes do controle e estatisticamente significativos. Concluiu-se que o composto MG 770 não é tóxico aos embriões em fase de desenvolvimento nas condições estudadas.

Figura 57: Gráfico da taxa de mortalidade dos embriões expostos às concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do composto MG 770 por 96 hpf. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

O composto Microciclâmica 583, por outro lado, causou mortalidade em 62% dos embriões na dose de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ao final do período experimental de 96 hpf, sendo estatisticamente diferente ($p < 0.05$) dos demais tratamentos e do controle (Figura 58). Nas demais concentrações testadas (1 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não houve diferenças estatísticas significativas nas taxas de letalidade dos embriões/larvas em comparação ao controle.

Figura 58: (A) Gráfico da taxa de mortalidade dos embriões de *D. rerio* expostos às concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do composto 583 Da por 96 hpf e (B) Curva de dose-resposta obtido após 96 h de exposição. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

A partir da curva de dose-resposta, foi possível calcular a CL_{50} (96 hpf) para a Microciclâmica 583 de 42,98 (37,79-48,89) $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Não foram observadas alterações consideradas teratogênicas até 96 hpf, nas concentrações de 1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mas alterações significativas no desenvolvimento cardíaco (edemas no pericárdio) foram observadas nas larvas tratadas com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Microciclâmica 583 (Figura 59).

Figura 59: Embriões com 96 hpf. (A) Animal do grupo controle negativo, com desenvolvimento cardíaco normal (*) e (B) Animal exposto ao tratamento com EBM (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com edema no pericárdio (→).

Microgininas e microciclâmidas são comumente produzidas por cianobactérias do gênero *Microcystis* e podem ser detectadas no ambiente em concentrações equivalentes às hepatotoxinas microcistinas. A co-ocorrência desses compostos, assim como de outros

cianopeptídeos é bastante comum, tanto em cianobactérias cultivadas em laboratório, quanto no ambiente natural, o que torna a avaliação toxicológica dessas misturas extremamente complexa ((Carneiro et al. 2012); (Janssen 2019); (Le Manach et al. 2019)). Em geral, esses cianopeptídeos, são considerados compostos não-tóxicos, no entanto, grande parte desses metabólitos apresentam atividade biológica e são potentes inibidores de proteases, e não devem ser ignorados quanto ao seu potencial toxicológico. Embora uma variedade de cianopeptídeos seja detectada simultaneamente no ambiente, a avaliação da toxicidade individual dos cianopeptídeos deve ser realizada para identificar quais desses metabólitos são relevantes do ponto de vista (eco)toxicológico.

As MG são conhecidas por inibir metaloproteinases dependentes de zinco tais como a enzima conversora de angiotensina (ECA), aminoproteinase M e leucina aminopeptidase ((Okino et al. 1993a); (Ishida et al. 1997); (Ishida et al. 1998); (Ishida et al. 2000a); (Kraft et al. 2006); (Lodin-Friedman e Carmeli 2018)). No entanto, a maioria desses compostos não apresentou atividade contra proteases tais como tripsina, trombina, plasmina, quimotripsina, elastase e papaína ((Ishida et al. 2000a); (Bober e Bialczyk 2017)). Ishida et al. (2000a) demonstraram que os grupos amino e hidroxil do Ahda das microgininas e a porção C-terminal da molécula composta pelo dipeptídeo *N*-MeTyr – Tyr desempenham um papel importante na inibição da ECA. Assim como os dipeptídeos formados por aminoácidos aromáticos ou Pro na porção C-terminal e os aminoácidos Val ou Ile na porção *N*-terminal (Cheung et al. 1980). A inibição da ECA desempenha um papel importante no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, tornando as microgininas candidatas para o desenvolvimento de novos inibidores da ECA para o tratamento de doenças cardiovasculares ((Okino et al. 1993a); (Paiva et al. 2017)). Estudos prévios confirmaram que a MG 770 pode inibir eficientemente a ECA, com um IC_{50} de $3,33 \mu\text{g. mL}^{-1}$, tendo características em comum com inibidores comerciais, como captopril e enalaprilato, que são frequentemente usados no tratamento da hipertensão em humanos (Paiva et al. 2017). O mesmo composto foi também avaliado quanto a atividade enzimática inibitória da aminopeptidase M (AMP), apresentando níveis de inibição (IC_{50} $1.20 \pm 0.1 \mu\text{M}$) comparáveis à inibidoras de AMP conhecidas, como a amastatina (IC_{50} $0.98 \pm 0.1 \mu\text{M}$) (Ferreira et al. 2019). Inibidores da aminopeptidase têm sido considerados alvos potenciais para a terapia do câncer, devido ao seu papel na promoção da angiogênese, crescimento tumoral e metástase (Ferreira et al. 2019).

Apesar de sua ação inibitória contra algumas proteases ser bem conhecida, dados acerca da atividade tóxica de MG ainda são escassos. São poucos os trabalhos que buscaram avaliar a

toxicidade desses compostos em modelos animais ((Bober e Bialczyk 2017); (Lenz et al. 2019); (Fernandes et al. 2019)) e em células tumorais (Ujvárosi et al. 2020). Bober e Bialczyk (2017) avaliaram a toxicidade da MG FR3 em larvas de *T. platyurus* (crustáceo) e verificaram atividade biológica com elevada taxa de mortalidade dos animais após 48 h de exposição, obtendo-se uma LC₅₀ de 7,78 µg.mL⁻¹. Lenz et al., (2019) avaliaram o efeito tóxico de diferentes classes de cianopeptídeos (anabaenopeptinas, cianopeptolinas, microginina e microcistina), na reprodução, tempo de incubação, taxa de crescimento, expectativa de vida e integridade vulvar relacionada à idade do nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Dentre os compostos testados (na concentração de 10 µg.L⁻¹), as anabaenopeptinas e cianopeptolinas se mostraram as mais tóxicas, inclusive mais tóxicas que a própria MC-RR, e a microginina (MG 690) a menos tóxica. Em um outro estudo, realizado por Ujvárosi et al. (2020), a atividade citotóxica e genotóxica de 4 congêneres de MG (MG FR3, MG GH787, Cyanostatin B e MGL 402) foi avaliada em uma linhagem celular humana de carcinoma hepatocelular (HepG2). Após 72 h de exposição às MG, foi verificado uma relação dose-dependente com decréscimo na proliferação celular, com a MGL 402 sendo a mais potente e a MG FR3 a menos potente. A viabilidade celular decaiu de 20 a 42% nas concentrações de 50 e 100 µg.mL⁻¹. Todas as variantes testadas induziram dano ao DNA após 4 e 24 h de exposição, em concentrações entre 0,01 e 1 µg.mL⁻¹. Este foi o primeiro estudo a fornecer evidências de que as MG exercem atividade citotóxica e genotóxica.

Além dos peptídeos lineares, um número crescente de peptídeos cíclicos contendo aminoácidos heterocíclicos, formando anéis de tiazol, oxazol, tiazolina e oxazolina, têm sido isolados de cianobactérias de água doce, incluindo nostociclamidas, microciclamidas e aeruciclamidas ((Todorova et al. 1995); (Jüttner et al. 2001); (Ishida et al. 2000b); (Portmann et al. 2008a); (Portmann et al. 2008b); (Ziemert et al. 2008); (Raveh et al. 2010)). Ao contrário das outras classes de cianopeptídeos, esse grupo de metabólitos é sintetizado via síntese ribossômica (Ziemert et al. 2008), semelhante à via da patelamida, descoberta em *Prochloron didemni*, uma cianobactéria que vive em simbiose com o ascídio *Lissoclinum patella* (Schmidt et al. 2005). Na literatura, elas são descritas como metabólitos com propriedades citotóxicas, antimicrobiana e anti-parasitária ((Ishida et al. 2000b); (Ziemert et al. 2008); (Portmann et al. 2008a); (Portmann et al. 2008b); (Raveh et al. 2010); Sadler e Elert, 2014).

A Microciclamida foi o primeiro hexapeptídeo cíclico dessa classe isolado da cianobactéria *M. aeruginosa*, apresentando toxicidade moderada contra células leucêmicas de murinos (P388), com valor de IC₅₀ de 1.2 µg.mL⁻¹ (Ishida et al. 2000b). Nostociclamidas

apresentaram diferentes níveis de atividade alelopática contra cianobactérias do gênero *Anabaena* e toxicidade contra rotíferos de água doce (*Brachionus calyciflorus*) e crustáceos (*T. platyurus*), indicando atividade protetora contra herbivoria ((Todorova et al. 1995); (Jüttner et al. 2001)). O potencial anti cancerígeno das microciclamidas GL616, GL582, GL614A, GL614B, GL614C, GL546A, GL546B, GL628 e Microciclamida A, isoladas de uma floração de *Microcystis* sp. foram avaliadas em linhagens de células tumorais A549-lung e Molt-4 (Raveh et al. 2010). Microciclamida GL582 apresentou baixa citotoxicidade contra a linhagem celular Molt-4, com inibição do crescimento de 20% a uma concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os demais compostos não apresentaram efeitos sobre as linhagens celulares nas concentrações testadas de 1 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As aeruciclamidas A e B não foram consideradas tóxicas para *T. platyurus*, com valores de CL_{50} de 30.5 e 33.8 μM , respectivamente (Portmann et al. 2008a). Aeruciclamidas A, B, C e D foram avaliadas quanto à atividade antiparasitária, em *Plasmodium falciparum* K1 e *Trypanosoma brucei rhodesiense* STIB 900, e em linhagem celular de mioblastoma de rato L6 (Portmann et al. 2008b). A avaliação antiplasmodial estabeleceu valores submicromolares de IC_{50} de aeruciclamida B contra *P. falciparum*, indicando potente atividade antiparasitária, e elevada seletividade do parasita com relação às células L6. Contra *T. brucei rhodesiense*, o composto mais ativo foi a aeruciclamida C, embora com atividade moderada. Neste mesmo estudo, a aeruciclamida C foi testada quanto à toxicidade sobre crustáceos *T. platyurus*, mas foi encontrada baixa toxicidade, com valor de CL_{50} de 70,5 μM (Portmann et al. 2008b).

Sadler e von Elert (2014) avaliaram a interação entre *M. aeruginosa* e *Daphia magna* e observaram um possível mecanismo de defesa induzido em *M. aeruginosa* contra a predação. A presença da *Daphia*, estimulou a produção intracelular de cianopeptídeos (aeruciclamidas, cianopeptolinas e microciclamida), além da microcistina, sugerindo um papel desses compostos na proteção contra a herbivoria. Além do aumento da produção intracelular, a presença de *Daphnia* induziu a liberação da microciclamida 7806A para o meio circundante, o que sugere que esse composto extracelular pode constituir outra linha ainda não descrita de defesa contra predação em *Microcystis*.

Como demonstrado por Raveh et al. (2010), mesmo compostos muito parecidos estruturalmente, apresentaram efeitos distintos. Microciclamida GL582 e a Microciclamida A (microciclamida) apresentam apenas um dos centros esteroquímico diferentes entre si, enquanto uma apresentou baixa citotoxicidade, com inibição do crescimento, a outra não apresentou

nenhum efeito sobre as células tumorais (Raveh et al. 2010). A sequência dos aminoácidos ou até mesmo a conformação estereoquímica pode favorecer ou não uma determinada atividade.

Uma das hipóteses levantada para a ausência de toxicidade de MG 770 nos embriões e larvas de *D. rerio*, mesmo em concentrações elevadas, é a presença de uma membrana extra-embriônica espessa chamada córion protegendo o embrião, que pode dificultar a passagem de metabólitos solúveis em água ((Oberemm et al. 1999); (Jacquet et al. 2004); Berry et al., 2006). Como já evidenciado em microcistinas, existe a possibilidade de as substâncias testadas não terem sido absorvidas pelo embrião devido à presença dessa barreira. Entretanto, não foram observados efeitos tóxicos nos embriões mesmo após a eclosão (entre 48 - 72 hpf), onde as larvas estão mais diretamente em contato com os contaminantes, indicando baixa ou nenhuma toxicidade do composto no desenvolvimento embrio-larval de *D. rerio* nas condições testadas. A Microciclâmica 583, por outro lado, se mostrou um pouco mais tóxica em relação à MG 770, apresentando uma taxa de mortalidade acima de 50% na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Apesar da mortalidade observada, ela pode ser considerada de baixa toxicidade, pois os efeitos foram observados em concentrações muito elevadas, dificilmente encontradas no ambiente.

As concentrações dos cianopeptídeos utilizadas no presente trabalho, assim como no trabalho de Ujvárosi et al. (2020), estão muito além dos valores normalmente detectados no ambiente (µg.L⁻¹) para estes compostos. No entanto, a evidência de efeitos adversos desses cianopeptídeos em concentrações ambientalmente relevantes, indica que o potencial tóxico desses compostos não deve ser descartado. Concentrações elevadas de MG 770 não apresentaram efeitos tóxicos ou teratogênicos nos organismos teste, que por sua vez, se mostraram potentes inibidoras de ECA e AMP, o que as tornam potenciais candidatas ao desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Apesar da baixa toxicidade ou ausência de toxicidade observada, esses compostos são frequentemente detectados no ambiente e devem exercer um papel fisiológico e ecológico relevante que deve ser melhor explorado. As ciclâmicas, por exemplo, apresentam atividade alelopática sobre outros organismos do fitoplâncton e podem estar envolvidas no mecanismo de proteção química contra a herbivoria. As informações toxicológicas obtidas para esses compostos isolados são de extrema importância e podem auxiliar no desenvolvimento de políticas de gerenciamento de risco.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do perfil metabólico do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 mostrou a co-ocorrência de diversos cianopeptídeos e microcistinas, com a identificação de quatro classes de cianopeptídeos: microcistinas, microgininas, cianopeptolinas e um composto desconhecido que foi posteriormente identificado como uma microciclâmida. As MG 756 e MG 770 já haviam sido reportadas em trabalhos anteriores ((Carneiro et al. 2012); (Paiva et al. 2017)), entretanto, sem elucidação estrutural por RMN. Tanto a MG 770 como o composto desconhecido foram isolados e purificados para a caracterização estrutural por RMN e LC-HR-QTOF-MS/MS. As análises espectrométricas permitiram a elucidação planar dos dois cianopeptídeos. A MG 770 apresentou a mesma estrutura da MG 478, identificada por Ishida et al. (2000a) e o composto desconhecido apresentou a mesma estrutura planar da microciclâmida, microciclâmida A e microciclâmida GL582, a primeira identificada por Ishida et al. (2000b) e as duas últimas por Raveh et al. (2010).

A toxicidade aguda dos cianopeptídeos isolados foi avaliada por meio do ensaio FET, em que se avaliou o efeito tóxico desses compostos no desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio*, um modelo de vertebrado aquático bastante utilizado em ecotoxicologia. Ambos os compostos se mostraram pouco tóxicos aos embriões de *D. rerio*, a microciclâmida (m/z 583) causou letalidade em 62% dos animais, após 96 h de exposição na concentração de $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, com evidências de cardiotoxicidade (edemas cardíacos). O valor de CL_{50} calculado para a microciclâmida foi de 42,98 (37,79-48,89) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A MG 770, por outro lado, não apresentou efeitos tóxicos ou teratogênicos, após 96 hpf, em nenhuma das concentrações testadas e por isso a sua CL_{50} não pode ser calculada. A biomassa de LTPNA 08, submetida à extração aquosa e hidroalcóolica também foi avaliada e apresentou alta taxa de letalidade para ambos os extratos na concentração mais alta de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, por um período de 96 h. Os valores de CL_{50} obtidos para o EBA e o EBM foram de 0,25 (0,15-0,27) e 0,46 (0,40-0,52) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Não foram observados efeitos teratogênicos em ambos os extratos; o efeito cardiotóxico foi observado apenas no EBM na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. A caracterização dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e a investigação da toxicidade desses compostos individualmente e em combinação são essenciais para a compreensão das substâncias responsáveis pelos efeitos negativos, que não se limitam apenas às toxinas produzidas.

O método de triagem desenvolvido para a detecção de microgininas por LC-QqQ-MS/MS em modo *precursor ion scan* identificou compostos suspeitos em 11 amostras de cianobactérias. A confirmação dos compostos foi feita por LC-HR-QTOF-MS/MS, que

identificou a presença das microgininas em 7 das 9 amostras de cianobactérias isoladas e em 2, no amostras ambientais. No total foram identificadas 19 variantes de MG, das quais 11 já foram descritas na literatura e as demais foram tentativamente caracterizadas através da comparação dos espectros de fragmentação de MG conhecidas. Algumas apresentaram perfil de fragmentação semelhante ao de MG conhecidas, com diferença de massa de 14 Da ($-\text{CH}_2$), 34 Da ($-\text{Cl}$) ou 16 Da ($-\text{O}$). O método de triagem em modo *precursor ion scan* se mostrou uma análise rápida e sensível na busca por microgininas conhecidas e desconhecidas. Esse tipo de análise tem ganhado destaque na área de produtos naturais na busca de novas variantes de classes de compostos conhecidos.

Apesar de sua ampla ocorrência, a função ecológica desses compostos ainda permanece incerta. A complexidade estrutural desses metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e os dados biológicos disponíveis ainda não são suficientes para afirmar a sua verdadeira função ou relevância ecológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D.G. (2002) The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 523-561, Springer Netherlands, Dordrecht.

Agha, R., Cirés, S., Wörmer, L. e Quesada, A. (2013) Limited Stability of Microcystins in Oligopeptide Compositions of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria): Implications in the Definition of Chemotypes. *Toxins* 5(6).

Azevedo, S.M.F.O. (2002) Cianobactérias tóxicas: causas ecológicas e consequências para a saúde pública. Apostila: Curso de especialização em Limnologia, gerenciamento de recursos hídricos e aquíicultura. IBCCFº - UFRJ.

Azevedo, S.M.F.O. e Brandão, C.C.S.B. (2003) Cianobactérias Tóxicas na água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano. FUNASA.

Banker, R. e Carmeli, S. (1998) Tenuocyclamides A–D, Cyclic Hexapeptides from the Cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* var. *tenuum*. *Journal of Natural Products* 61, 1248-1251.

Bateman, I.J., Langford, I.H., Turner, R.K., Willis, K.G. e Garrod, G.D. (1995) Elicitation and truncation effects in contingent valuation studies. *Ecological Economics* 12(2), 161-179.

Bautista, A.C., Moore, C.E., Lin, Y., Cline, M.G., Benitah, N. e Puschner, B. (2015) Hepatopathy following consumption of a commercially available blue-green algae dietary supplement in a dog. *BMC Veterinary Research* 11(1), 136.

Benayache, N., Nguyen-Quang, T., Hushchyna, K., McLellan, K., Afri-Mehennaoui, F.-Z. e Bouaïcha, N. (2019).

Berry, J.P., Gantar, M., Gibbs, P.D.L. e Schmale, M.C. (2007) The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* : CBP 145(1), 61-72.

Bhunia, A.K. (2018) Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. Bhunia, A.K. (ed), pp. 175-180, Springer New York, New York, NY.

Bicudo, C. (2009) Limnologia by J G Tundisi and T Matsumura Tundisi. *Brazilian Journal of Biology* 69, 227-227.

Bicudo, C. e Menezes, M. (2006) Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições.

Bober, B. e Bialczyk, J. (2017) Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin. *Journal of Applied Phycology* 29(3), 1355-1362.

Bogialli, S., Bortolini, C., Gangi, I., Gregorio, F., Lucentini, L., Favaro, G. e Pastore, P. (2017) Liquid chromatography-high resolution mass spectrometric methods for the surveillance monitoring of cyanotoxins in freshwaters. *Talanta* 170.

- Bortoli, S., Oliveira-Silva, D., Krüger, T., Dörr, F.A., Colepicolo, P., Volmer, D.A. e Pinto, E. (2014) Growth and microcystin production of a Brazilian *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24, 389-398.
- Briand, E., Bormans, M., Quiblier, C., Salençon, M.-J. e Humbert, J.-F. (2012) Evidence of the Cost of the Production of Microcystins by *Microcystis aeruginosa* under Differing Light and Nitrate Environmental Conditions. *PloS one* 7(1), e29981.
- Cantú, M.D., Carrilho, E., Wulff, N.A. e Palma, M.S. (2008) Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova* 31, 669-675.
- Cardona, T., Sánchez-Baracaldo, P., Rutherford, A.W. e Larkum, A.W. (2019) Early Archean origin of Photosystem II. *Geobiology* 17(2), 127-150.
- Cardozo, K., Guaratini, T., Barros, M., Falcão, V., Tonon, A.P. e Lopes, N.P. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 146.
- Carmichael, W. (1992) Cyanobacterial secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 724, 45-459.
- Carmichael, W., Beasley, V., Bunner, D., Eloff, J., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.-i., Krishnamurthy, T., Yu, M. e Moore, R. (1988) Naming of cyclic heptapeptide toxins of Cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 26, 971-973.
- Carneiro, R.L., Dörr, F.A., Dörr, F., Bortoli, S., Delherbe, N., Vásquez, M. e Pinto, E. (2012) Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 82(3), 692-702.
- Cazenave, J., Bistoni, M.d.L.A., Zwirnmann, E., Wunderlin, D.A. e Wiegand, C. (2006) Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos -- benefits and costs of microcystin detoxication. *Environmental Toxicology* 21(1), 22-32.
- Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F. e Cushman, D.W. (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of biological chemistry* 255(2), 401-407.
- Chorus, I. e Bartram, J. (1999) Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring and management / edited by Ingrid Chorus and Jamie Bertram, World Health Organization, Geneva.
- Codd, G.A. (2000) Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16(1), 51-60.
- Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R. e Espindola, E.L.G. (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova* 31, 1820-1830.

Crevelin, E.J., Possato, B., Lopes, J.L., Lopes, N.P. e Crotti, A.E. (2017) Precursor Ion Scan Mode-Based Strategy for Fast Screening of Polyether Ionophores by Copper-Induced Gas-Phase Radical Fragmentation Reactions. *Analytical chemistry* 89(7), 3929-3936.

Czarnecki, O., Henning, M., Lippert, I. e Welker, M. (2006) Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environmental microbiology* 8(1), 77-87.

Dawson, R.M. (1998) The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36(7), 953-962.

de Felício, R., Oliveira, A. e Debonisi, H. (2012) Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. *Ciência e Cultura* 64, 39-42.

Degnan, B.M., Hawkins, C.J., Lavin, M.F., McCaffrey, E.J., Parry, D.L., Van den Brenk, A.L. e Watters, D.J. (1989a) New cyclic peptides with cytotoxic activity from the ascidian *Lissoclinum patella*. *Journal of Medicinal Chemistry* 32(6), 1349-1354.

Degnan, B.M., Hawkins, C.J., Lavin, M.F., McCaffrey, E.J., Parry, D.L. e Watters, D.J. (1989b) Novel cytotoxic compounds from the ascidian *Lissoclinum bistratum*. *Journal of Medicinal Chemistry* 32(6), 1354-1359.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J. e Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR* 6(3), 277-293.

Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U. e Wiedner, C. (2012) Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PloS one* 7(6), e38757-e38757.

Eckart, K. (1994) Mass spectrometry of cyclic peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 13(1), 23-55.

Elersek, T., Blaha, L., Mazur-Marzec, H., Schmidt, W. e Carmeli, S. (2017), pp. 179-195.

Erhard, M., von Dohren, H. e Jungblut, P. (1997) Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 15(9), 906-909.

Falconer, I.R. e Humpage, A.R. (2005) Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *Int J Environ Res Public Health* 2(1), 43-50.

Faltermann, S., Prétôt, R., Pernthaler, J. e Fent, K. (2016) Comparative effects of nodularin and microcystin-LR in zebrafish: 1. Uptake by organic anion transporting polypeptide Oatp1d1 (Slco1d1). *Aquatic Toxicology* 171, 69-76.

Faltermann, S., Zucchi, S., Kohler, E., Blom, J.F., Pernthaler, J. e Fent, K. (2014) Molecular effects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms: Global transcriptome analysis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 149, 33-39.

Fastner, J., Erhard, M. e von Döhren, H. (2001) Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-

assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology* 67(11), 5069-5076.

Fernandes, K., Gomes, A., Calado, L., Yasui, G., Assis, D., Henry, T., Fonseca, A. e Pinto, E. (2019) Toxicity of Cyanopeptides from Two *Microcystis* Strains on Larval Development of *Astyanax altiparanae*. *Toxins* 11(4), 220.

Ferrão-Filho, A.d.S. e Kozlowsky-Suzuki, B. (2011) Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs* 9(12), 2729-2772.

Ferreira, G.M., Kronenberger, T., de Almeida, É.C., Sampaio, J., Terra, C.F., Pinto, E. e Trossini, G.H.G. (2019) Inhibition of Porcine Aminopeptidase M (pAMP) by the Pentapeptide Microginins. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(23), 4369.

Finking, R. e Marahiel, M.A. (2004) Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annual Review of Microbiology* 58(1), 453-488.

Francis, G. (1878) Poisonous Australian Lake. *Nature* 18(444), 11-12.

Funari, E. e Testai, E. (2008) Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. *Critical reviews in toxicology* 38, 97-125.

Gademann, K., Portmann, C., Blom, J.F., Zeder, M. e Jüttner, F. (2010) Multiple Toxin Production in the Cyanobacterium *Microcystis*: Isolation of the Toxic Protease Inhibitor Cyanopeptolin 1020. *Journal of Natural Products* 73(5), 980-984.

Gehringer, M.M. e Wannicke, N. (2014) Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 88(1), 1-25.

Gesner-Apter, S. e Carmeli, S. (2008) Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* 64(28), 6628-6634.

Ghisalberti, E. (2007), pp. 11-76.

Glibert, P.M. (2017) Eutrophication, harmful algae and biodiversity — Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Marine Pollution Bulletin* 124(2), 591-606.

Gorham, P.R., McLachlan, J., Hammer, U.T. e Kim, W.K. (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *SIL Proceedings, 1922-2010* 15(2), 796-804.

Han, X., Aslanian, A. e Yates, J.R., 3rd (2008) Mass spectrometry for proteomics. *Current opinion in chemical biology* 12(5), 483-490.

Hardy, F.J., Johnson, A., Hamel, K. e Preece, E. (2015) Cyanotoxin bioaccumulation in freshwater fish, Washington State, USA. *Environmental monitoring and assessment* 187(11), 667-667.

Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A. e Paerl, H.W. (2016) A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful algae* 54, 4-20.

Hart, J., Fawell, J. e Croll, B. (1998) The fate of both intra- and extracellular toxins during drinking water treatment. *Water Supply* 16, 611-616.

Hauer, T. e Komárek, J. (2020) CyanoDB 2.0 - On-line database of cyanobacterial genera. - World-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>.

Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. e Peterson, R.E. (2005) Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1), 6-19.

Hoham, R.W. e Remias, D. (2019) Snow and Glacial Algae: A Review. *Journal of Phycology* n/a(n/a).

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J. e Stemple, D.L. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446), 498-503.

Huang, I.S. e Zimba, P.V. (2019) Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. *Harmful algae* 83, 42-94.

Hudnell, H.K. (2008) Cynobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs.

Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H. e Visser, P.M. (2018) Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology* 16(8), 471-483.

Humbert, J.-F. e Fastner, J. (2017) Ecology of Cyanobacteria. In Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis (eds J. Meriluoto, L. Spoof and G.A. Codd) doi:10.1002/9781119068761.ch2.

Ibelings, B.W. e Chorus, I. (2007) Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150(1), 177-192.

Imhoff, J.F. (2017) Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects. Hallenbeck, P.C. (ed), pp. 427-480, Springer International Publishing, Cham.

Ishida, K., Kato, T., Murakami, M., Watanabe, M. e Watanabe, M.F. (2000a) Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 56(44), 8643-8656.

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

Ishida, K., Matsuda, H., Murakami, M. e Yamaguchi, K. (1997) Microginins 299-A and -B, leucine aminopeptidase inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-299). *Tetrahedron* 53(30), 10281-10288.

Ishida, K., Nakagawa, H. e Murakami, M. (2000b) Microcyclamide, a Cytotoxic Cyclic Hexapeptide from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 63(9), 1315-1317.

Jacquet, C., Thermes, V., Luze, A.d., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J.-S., Bourrat, F. e Edery, M. (2004) Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon* 43(2), 141-147.

Jaja-Chimedza, A., Sanchez, K., Gantar, M., Gibbs, P., Schmale, M. e Berry, J.P. (2017) Carotenoid glycosides from cyanobacteria are teratogenic in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. *Chemosphere* 174, 478-489.

Janssen, E.M.L. (2019) Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research* 151, 488-499.

Jochimsen, E., Carmichael, W., An, J.S., Cardo, D., Cookson, S., Holmes, C., Antunes, M., Filho, D., Lyra, T., Barreto, V., Azevedo, S. e Jarvis, W. (1998) Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *The New England journal of medicine* 338, 873-878.

Jonas, A., Scholz, S., Fetter, E., Sychrova, E., Novakova, K., Ortmann, J., Benisek, M., Adamovsky, O., Giesy, J.P. e Hilscherova, K. (2015) Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and zebrafish embryos assays. *Chemosphere* 120, 321-327.

Jungmann, D. (1992) Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC786 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnology and Oceanography* 37(8), 1777-1783.

Jüttner, F., Todorova, A.K., Walch, N. e von Philipsborn, W. (2001) Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from Nostoc 31. *Phytochemistry* 57(4), 613-619.

Kabashi, E., Brustein, E., Champagne, N. e Drapeau, P. (2011) Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812(3), 335-345.

Kaiser, C.R. (2000) RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova* 23, 231-236.

Kari, G., Rodeck, U. e Dicker, A.P. (2007) Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical pharmacology and therapeutics* 82(1), 70-80.

Kearns, K.D. e Hunter, M.D. (2000) Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental microbiology* 2(3), 291-297.

Khan, M.N. e Mohammad, F. (2014) Eutrophication: Causes, Consequences and Control: Volume 2. Ansari, A.A. e Gill, S.S. (eds), pp. 1-15, Springer Netherlands, Dordrecht.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. e Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203(3), 253-310.

Kodani, S., Suzuki, S., Ishida, K. e Murakami, M. (1999) Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). *FEMS Microbiology Letters* 178(2), 343-348.

Kohler, E. (2014) The toxicity and enzyme activity of a chlorine and sulfate containing aeruginosin isolated from a non-microcystin-producing *Planktothrix* strain. *Harmful algae v. 39*, pp. 154-160-2014 v.2039.

Komárek, J. (2016) Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. *Hydrobiologia* 764(1), 259-270.

Komarek, J., Kaštovský, J., Mares, J. e Johansen, J. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia -Praha* 86, 295-335.

Koreivienė, J., Anne, O., Kasperovičienė, J. e Burškytė, V. (2014) Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. *Environmental monitoring and assessment* 186(7), 4443-4459.

Kraft, M., Schleberger, C., Weckesser, J. e Schulz, G.E. (2006) Binding structure of the leucine aminopeptidase inhibitor microginin FR1. *FEBS letters* 580(30), 6943-6947.

Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Colepiccolo, P. e Pinto, E. (2006) Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341(1), 273-277.

Lancas, F. (2013) A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. *Scientia Chromatographica* 5, 27-46.

Lanças, F.M. (2009) A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?

Landsberg, J. (2002) The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. Reviews in Fisheries Science - REV FISH SCI 10, 113-390.

Le Manach, S., Duval, C., Marie, A., Djediat, C., Catherine, A., Edery, M., Bernard, C. e Marie, B. (2019) Global Metabolomic Characterizations of *Microcystis* spp. Highlights Clonal Diversity in Natural Bloom-Forming Populations and Expands Metabolite Structural Diversity. *Frontiers in Microbiology* 10(791).

Lecoz, N., Malécot, M., Quiblier, C., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Crespeau, F. e Edery, M. (2008) Effects of cyanobacterial crude extracts from *Planktothrix agardhii* on embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 51(2), 262-269.

Lenz, K.A., Miller, T.R. e Ma, H. (2019) Anabaenopeptins and cyanopeptolins induce systemic toxicity effects in a model organism the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 214, 60-69.

Li, G., Chen, J., Xie, P., Jiang, Y., Wu, L. e Zhang, X. (2011) Protein expression profiling in the zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the microcystin-LR. *PROTEOMICS* 11(10), 2003-2018.

Linington, R., González Santamaría, J., Urena, L., Romero, L., Ortega-Barria, E. e Gerwick, W. (2007) Venturamides A and B: Antimalarial Constituents of the Panamanian Marine Cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Journal of Natural Products* 70, 397-401.

Liu, J. e Stainier, D.Y.R. (2012) Zebrafish in the study of early cardiac development. *Circulation research* 110(6), 870-874.

Lodin-Friedman, A. e Carmeli, S. (2018) Microginins from a *Microcystis* sp. Bloom Material Collected from the Kishon Reservoir, Israel. *Marine Drugs* 16(3).

Lukač, M. e Aegerter, R. (1993) Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31(3), 293-305.

Lydic, T.A., Busik, J.V., Esselman, W.J. e Reid, G.E. (2009) Complementary precursor ion and neutral loss scan mode tandem mass spectrometry for the analysis of glycerophosphatidylethanolamine lipids from whole rat retina. *Anal Bioanal Chem* 394(1), 267-275.

Malbrouck, C. e Kestemont, P. (2006) Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1), 72-86.

Manali, K.M., Arunraj, R., Ramakrishnan, G.S. e Ramya, M. (2019) Development of sensitive and specific multiplex PCR method for the detection of microcystin producing cyanobacteria in spirulina food supplements. *Food Science and Biotechnology* 28(2), 609-614.

Maurya, S.S., Maurya, J.N. e Pandey, V.D. (2014) Factors regulating phycobiliprotein production in cyanobacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3, 764-771.

- Mazur-Marzec, H., Sutryk, K., Hebel, A., Hohlfeld, N., Pietrasik, A. e Błaszczyk, A. (2015) *Nodularia spumigena* Peptides—Accumulation and Effect on Aquatic Invertebrates. *Toxins* 7(11).
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E. e Thomas, O. (2013) State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International* 59, 303-327.
- Meriluoto, J. (1997) Chromatography of microcystins. *Analytica Chimica Acta* 352(1), 277-298.
- Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A., European Cooperation in the Field of, S. e Technical, R. (2017) Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis.
- Metcalf, J.S. e Codd, G.A. (2012) Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Whitton, B.A. (ed), pp. 651-675, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Miles, C.O., Sandvik, M., Nonga, H.E., Rundberget, T., Wilkins, A.L., Rise, F. e Ballot, A. (2013) Identification of microcystins in a Lake Victoria cyanobacterial bloom using LC–MS with thiol derivatization. *Toxicon* 70, 21-31.
- Montesano, C., Sergi, M., Moro, M., Napoletano, S., Romolo, F.S., Carlo, M.D., Compagnone, D. e Curini, R. (2013) Screening of methylenedioxyamphetamine- and piperazine-derived designer drugs in urine by LC–MS/MS using neutral loss and precursor ion scan. *Journal of Mass Spectrometry* 48(1), 49-59.
- Neumann, U., Forchert, A., Flury, T. e Weckesser, J. (1997) Microginin FR1, a linear peptide from a water bloom of *Microcystis* species. *FEMS Microbiology Letters* 153(2), 475-478.
- Ngoka, L.C.M. e Gross, M.L. (1999) Multistep tandem mass spectrometry for sequencing cyclic peptides in an ion-trap mass spectrometer. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 10(8), 732-746.
- Oberemm, A., Becker, J., Codd, G.A. e Steinberg, C. (1999) Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* 14(1), 77-88.
- Oberemm, A., Fastner, J. e Steinberg, C.E.W. (1997) Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research* 31(11), 2918-2921.
- OECD (2019) Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.
- Ogino, J., Moore, R.E., Patterson, G.M. e Smith, C.D. (1996) Dendroamides, new cyclic hexapeptides from a blue-green alga. Multidrug-resistance reversing activity of dendroamide A. *J Nat Prod* 59(6), 581-586.
- Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M. e Yamaguchi, K. (1993a) Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters* 34(3), 501-504.

- Okino, T., Murakami, M., Haraguchi, R., Munekata, H., Matsuda, H. e Yamaguchi, K. (1993b) Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters* 34(50), 8131-8134.
- Oliver, R.L. e Ganf, G.G. (2002) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 149-194, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Oren, A. (2002) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 281-306, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Paerl, H.W. (2002) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 121-148, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Paerl, H.W. e Huisman, J. (2009) Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1(1), 27-37.
- Paerl, H.W. e Paul, V.J. (2012) Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46(5), 1349-1363.
- Paiva, C.R.F., Ferreira, M.G., Trossini, H.G.G. e Pinto, E. (2017) Identification, In Vitro Testing and Molecular Docking Studies of Microginins' Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(12).
- Paizs, B. e Suhai, S. (2005) Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 24(4), 508-548.
- Palíková, M., Krejčí, R., Hilscherová, K., Babica, P., Navrátil, S., Kopp, R. e Bláha, L. (2007) Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 81(3), 312-318.
- Pentecost, A. e Whitton, B.A. (2002) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 257-279, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W. e Hemscheidt, T. (2008) Post-translational Modification in Microviridin Biosynthesis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 9, 3066-3073.
- Pimentel, J.S.M. e Giani, A. (2014) Microcystin Production and Regulation under Nutrient Stress Conditions in Toxic *Microcystis* Strains. *Applied and environmental microbiology* 80(18), 5836.
- Portmann, C., Blom, J.F., Gademann, K. e Jüttner, F. (2008a) Aerucyclamides A and B: Isolation and Synthesis of Toxic Ribosomal Heterocyclic Peptides from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Journal of Natural Products* 71(7), 1193-1196.
- Portmann, C., Blom, J.F., Kaiser, M., Brun, R., Jüttner, F. e Gademann, K. (2008b) Isolation of Aerucyclamides C and D and Structure Revision of Microcyclamide 7806A: Heterocyclic Ribosomal Peptides from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 and Their Antiparasite Evaluation. *Journal of Natural Products* 71(11), 1891-1896.

Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H. e Codd, G.A. (1998) Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 352(9121), 21-26.

Qian, H., Liu, G., Lu, T. e Sun, L. (2018) Developmental neurotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in the early life stages of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 151, 35-41.

Quadri, S., Stratford, R., Boue, S. e Cole, R. (2013) Screening and Identification of Glyceollins and Their Metabolites by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Precursor Ion Scanning. *Analytical chemistry* 85.

Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V. e Carvalho, I.S. (2016) Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical reviews in microbiology* 42(3), 394-405.

Raveh, A., Moshe, S., Evron, Z., Flescher, E. e Carmeli, S. (2010) Novel thiazole and oxazole containing cyclic hexapeptides from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* 66(14), 2705-2712.

Reshef, V. e Carmeli, S. (2001) Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 57(14), 2885-2894.

Reynolds, C.S. (2006) *The Ecology of Phytoplankton*, Cambridge University Press, Cambridge.

Rikkinen, J. (2017) Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects. Hallenbeck, P.C. (ed), pp. 243-294, Springer International Publishing, Cham.

Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M. e Neilan, B.A. (2004) Cyanobacterial Protease Inhibitor Microviridin J Causes a Lethal Molting Disruption in *Daphnia pulex*. *Applied and environmental microbiology* 70(8), 5047.

Sadler, T. e von Elert, E. (2014) Physiological interaction of *Daphnia* and *Microcystis* with regard to cyanobacterial secondary metabolites. *Aquatic Toxicology* 156, 96-105.

Sánchez-Baracaldo, P. e Cardona, T. (2020) On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytologist* 225(4), 1440-1446.

Sant'Anna, C.L., Azevedo, M., Werner, V., Dogo, C., Rios, F. e Carvalho, L. (2008) Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126, 251-265.

Sanz, M., Andreote, P.A., Fiore, F.M., Dörr, A.F. e Pinto, E. (2015) Structural Characterization of New Peptide Variants Produced by Cyanobacteria from the Brazilian Atlantic Coastal Forest Using Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *Marine Drugs* 13(6).

Sanz, M., Salinas, R.K. e Pinto, E. (2017) Namalides B and C and Spumigins K–N from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae*. *Journal of Natural Products* 80(9), 2492-2501.

Sarma, T.A. (2012) *Handbook of cyanobacteria*.

- Schmidt, E.W., Nelson, J.T., Rasko, D.A., Sudek, S., Eisen, J.A., Haygood, M.G. e Ravel, J. (2005) Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(20), 7315-7320.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T. e Voelker, D. (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15(5), 394-404.
- Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R. e Eaglesham, G. (2000) Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. *Toxicon* 38(9), 1203-1213.
- Shen, Q., Lu, Y., Dai, Z. e Cheung, H.-Y. (2015) Precursor ion scan driven fast untargeted screening and semi-determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. *Food Chemistry* 166, 442-447.
- Shestakov, S. e Karbysheva, E. (2017) The origin and evolution of cyanobacteria. *Biology Bulletin Reviews* 7, 259-272.
- Silva-Stenico, M.E., Rigonato, J., Lorenzi, A.S., Azevedo, M.T.P., Sant Anna, C.L. e Marli Fátima Fiore, C.L. (2015) Bioactive Cyanopeptides Produced by *Sphaerocavum brasiliense* Strains (Cyanobacteria). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26, 2088-2096.
- Sivonen, K. (1990) Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and environmental microbiology* 56(9), 2658-2666.
- Smutná, M., Babica, P., Jarque, S., Hilscherová, K., Maršálek, B., Haeba, M. e Bláha, L. (2014) Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon* 79, 11-18.
- Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Miranda, M.N., Mello, M.M., Roland, F. e Lüring, M. (2013) Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia* 717(1), 1-12.
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T. e Meriluoto, J. (2003) Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1020(1), 105-119.
- Steen, H. e Mann, M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(9), 699-711.
- Stenico, E., Lorenzi, A., Silva, C., Rigonato, J. e Fiore, M. (2013) INIBIDORES DE PROTEASES PRODUZIDOS POR CIANOACTÉRIAS: UMA REVISÃO.
- Stewart, I., Seawright, A.A. e Shaw, G.R. (2008) Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Hudnell, H.K. (ed), pp. 613-637, Springer New York, New York, NY.

Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H. e Braunbeck, T. (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* 33(2), 128-132.

Svircev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijovic, B., Codd, G.A. e Meriluoto, J. (2017) Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch Toxicol* 91(2), 621-650.

Svircev, Z., Lalic, D., Bojadzija Savic, G., Tokodi, N., Drobac Backovic, D., Chen, L., Meriluoto, J. e Codd, G.A. (2019) Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch Toxicol* 93(9), 2429-2481.

Swain, S.S., Paidesetty, S.K. e Padhy, R.N. (2017) Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine & pharmacotherapy* = *Biomedecine & pharmacotherapie* 90, 760-776.

Takaichi, S. e Mochimaru, M. (2007) Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(19), 2607.

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T. e Neilan, B.A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 7(10), 753-764.

Todorova, A.K., Juettner, F., Linden, A., Pluess, T. e von Philipsborn, W. (1995) Nostocyclamide: A new macrocyclic, thiazole-containing allelochemical from *Nostoc* sp. 31 (cyanobacteria). *The Journal of Organic Chemistry* 60(24), 7891-7895.

Truhaut, R. (1977) Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf* 1(2), 151-173.

Tundisi, J.G. (2003) *Água no século XXI: enfrentando a escassez*. RiMa, São Carlos.

Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K. e Codd, G.A. (1990) Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *British Medical Journal* 300(6737), 1440.

Ujvárosi, A.Z., Hercog, K., Riba, M., Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G. e Žegura, B. (2020) The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Chemosphere* 240, 124880.

Van Middlesworth, F. e Cannell, R.J.P. (1998) *Natural Products Isolation*. Cannell, R.J.P. (ed), pp. 279-327, Humana Press, Totowa, NJ.

Vargas, R.A., Sarmiento, K. e Vásquez, I.C. (2015) Zebrafish (*Danio rerio*): A Potential Model for Toxicological Studies. *Zebrafish* 12(5), 320-326.

Vasconcelos, V., Oliveira, S. e Teles, F.O. (2001) Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon* 39(10), 1461-1470.

Vincent, W.F. (2002) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 321-340, Springer Netherlands, Dordrecht.

Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J. e Laue, E.D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59(4), 687-696.

Wang, P.-J., Chien, M.-S., Wu, F.-J., Chou, H.-N. e Lee, S.-J. (2005) Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio Rerio*. *Toxicon* 45(3), 303-308.

Welker, M., Dittmann, E. e von Döhren, H. (2012) *Methods in Enzymology*. Hopwood, D.A. (ed), pp. 23-46, Academic Press.

Welker, M., Maršálek, B., Šejnohová, L. e von Döhren, H. (2006) Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides* 27(9), 2090-2103.

Welker, M. e Von Döhren, H. (2006) Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30(4), 530-563.

WHO, W.H.O. (1998) Guidelines for drinking-water

quality – Addendum to volume 1. WHO, Geneva, 2

a.

Edição, 36p.

Wiegand, C. e Pflugmacher, S. (2005) Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3), 201-218.

Wu, X., Jiang, J. e Hu, J. (2013) Determination and Occurrence of Retinoids in a Eutrophic Lake (Taihu Lake, China): Cyanobacteria Blooms Produce Teratogenic Retinal. *Environmental Science & Technology* 47(2), 807-814.

Wu, X., Jiang, J., Wan, Y., Giesy, J.P. e Hu, J. (2012) Cyanobacteria blooms produce teratogenic retinoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(24), 9477.

Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*.

Wynn-Williams, D.D. (2002) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A. e Potts, M. (eds), pp. 341-366, Springer Netherlands, Dordrecht.

Yan, Z., Lin, G., Ye, Y., Wang, Y. e Yan, R. (2014) Triterpenoid saponins profiling by adducts-targeted neutral loss triggered enhanced resolution and product ion scanning using triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 819, 56-64.

Yoo, R.S., Carmichael, W.W., Hoehn, R.C. e Hrudey, S.E. (1995) *Cyanobacterial (blue-green algal) toxins : a resource guide*, Denver, CO : Published by the AWWA Research Foundation and American Water Works Association, [1995] ©1995.

Zanchett, G. e Oliveira-Filho, C.E. (2013) Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins* 5(10).

Zervou, S.K., Gkelis, S., Kaloudis, T., Hiskia, A. e Mazur-Marzec, H. (2020) New microginins from cyanobacteria of Greek freshwaters. *Chemosphere* 248, 125961.

Zhang, X., Xie, P., Wang, W., Li, D., Li, L., Tang, R., Lei, H. e Shi, Z. (2008) Dose-dependent effects of extracted microcystins on embryonic development, larval growth and histopathological changes of southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Toxicon* 51(3), 449-456.

Zhou, Y., Huang, S.-X., Song, J.-Z., Qiao, C.-F., Li, S.-L., Han, Q.-B. e Xu, H.-X. (2009) Screening of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Garcinia* species using precursor ion discovery (PID) scan and ultra performance liquid chromatography electrospray ionization Q-TOF tandem mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 20(10), 1846-1850.

Ziemert, N., Ishida, K., Quillardet, P., Bouchier, C., Hertweck, C., de Marsac, N.T. e Dittmann, E. (2008) Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa. *Applied and environmental microbiology* 74(6), 1791-1797.

8. ANEXO 1

Tabela 22: Congeneres de Microgininas (MG) e suas respectivas sequencias de aminoácidos

Name	Molecular Formula	[M+H] ⁺	AA sequence	Reference
Microginin 511	C ₂₅ H ₄₁ N ₃ O ₆ S	512.2785	Adha – <i>N</i> -MeMet – Tyr	Stewart et al., 2018
Microginin 527	C ₂₅ H ₄₁ N ₃ O ₇ S	528.2743	Adha – <i>N</i> -MeMet(O) – Tyr	Stewart et al., 2018
Microginin 535 *		535.3	Ahda – Ala – Pro – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 549 *	C ₂₈ H ₄₄ N ₄ O ₇	549.5	Ahda – Ala – MePro – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin 551 *		551.1	Ahda – Ser – Pro – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 565A *		565.4	Ahda – Ala – MeLeu – Tyr	Bagchi et al., 2016; Zervou et al., 2020
Microginin 565B *	C ₂₈ H ₄₄ N ₄ O ₈	565.5	Ahda – Thr – Pro – Tyr	Riba et al., 2019; Zervou et al., 2020;
Microginin 568 *		569.1	ClAhda – Ala – Pro – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 91-A	C ₂₈ H ₅₂ N ₄ O ₆ Cl	575.3600	Cl-Adha – Ile – MeLeu – Pro	Ishida et al., 2000
Microginin 576 *		577.2	ClAhda – Ile – MeLeu/Melle – Val	Zervou et al., 2020
Microginin 579A *		578.9	<i>N</i> -MeAhda – Ala – MeLeu/Melle – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 579B *	C ₂₉ H ₄₆ N ₄ O ₈	579.6	<i>N</i> -MeAhda – Thr – Pro – Tyr	Riba et al., 2019; Zervou et al., 2020
Microginin 579C *		579.2	Ahda – Ala – MeTyr/Hty – MeLeu/Melle	Zervou et al., 2020
Microginin 579D *	C ₂₉ H ₄₆ N ₄ O ₈	579.6	Ahda – Thr – MePro – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin 581 *	C ₂₈ H ₄₄ N ₄ O ₉	581.5	Ahda – Thr – Pro – OHTyr	Riba et al., 2019
Oscillagin B	C ₂₉ H ₄₉ N ₈ O ₄	581.3586	Adha – Ser – <i>N</i> -MeVal – Hty	Sano & Kaya, 1997
Microginin 591 *	C ₃₂ H ₅₄ N ₄ O ₆	591.5	<i>N</i> -MeAhda – Leu – MeVal – Phe	Riba et al., 2019
Microginin 591B *		591.2	Ahda – Tyr – MeLeu/Melle – Pro	Zervou et al., 2020
Microginin 595 *	C ₂₉ H ₄₆ N ₄ O ₉	595.5	Ahda – Thr – MePro – OHTyr	Riba et al., 2019
Microginin 598 *		599.2	ClAhda – Thr – Pro – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin KR604	C ₃₂ H ₅₂ N ₄ O ₇	605.3764	<i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin AL584	C ₂₈ H ₄₅ N ₄ O ₇ Cl	607.2838	ClAdha – Ala – <i>N</i> -MeVal – Tyr	Gesner-Apter & Carmeli, 2008
Microginin 607 *	C ₃₂ H ₅₄ N ₄ O ₇	607.5	Ahda – Leu – MeVal – HTy	Riba et al., 2019
Microginin 607A *		607.4	<i>N</i> -MeAdha – Val – Leu/Ile – MeTyr/Hty	Zervou et al., 2020
Microginin 607B *		607.4	Adha – Val – MeLeu/Melle – MeTyr/Hty	Zervou et al., 2020
Microginin 91-B	C ₂₈ H ₅₁ N ₄ O ₆ Cl ₂	609.3177	Cl ₂ -Adha – Ile – MeLeu – Pro	Ishida et al., 2000
Microginin 612	C ₃₂ H ₄₄ N ₄ O ₈	613.3237	Ahoa – Tyr – <i>N</i> -MeTyr – Pro	Strangman & Wright, 2016
Oscillagin A	C ₂₉ H ₄₈ N ₈ O ₄	615.3126	Cl-Adha – Ser – <i>N</i> -MeVal – Hty	Sano & Kaya, 1997
Microginin 621 *	C ₃₃ H ₅₆ N ₄ O ₇	621.6	<i>N</i> -MeAhda – Leu – MeVal – HTy	Riba et al., 2019
Microginin 621A *		621.3	<i>N</i> -MeAdha – Val – MeLeu/Melle – MeTyr/Hty	Zervou et al., 2020
Microginin 621B *		621.4	<i>N</i> -MeAdha – Leu/Ile – MeLeu/Melle – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin KR638	C ₃₂ H ₅₁ N ₄ O ₇ Cl	639.3521	Cl- <i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin 646	C ₃₂ H ₄₃ N ₄ O ₈ Cl	647.2847	Cl-Ahoa – Tyr – <i>N</i> -MeTyr – Pro	Strangman & Wright, 2016
Microginin 650 *		650.0	Ahda – Ala – Val – Leu/Ile – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 674	C ₃₄ H ₅₀ N ₄ O ₈ S	675.3428	Adha – <i>N</i> -MeMet – Tyr – Tyr	Stewart et al., 2018
Microginin 680	C ₃₂ H ₄₂ N ₄ O ₈ Cl ₂	681.2463	Cl ₂ -Ahoa – Tyr – <i>N</i> -MeTyr – Pro	Strangman & Wright, 2016
Microginin 683 *		683.8	ClAhda – Ala – Val – Leu/Ile – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 690	C ₃₄ H ₅₀ N ₄ O ₉ S	691.3377	Adha – <i>N</i> -MeMet(O) – Tyr – Tyr	Stewart et al., 2018
Microginin T2	C ₃₆ H ₅₁ N ₅ O ₉	698.3785	Adha – Ala – Pro – Tyr – Tyr	Kodani et al., 1999
Microginin 91-C	C ₃₇ H ₆₂ N ₅ O ₈	704.4623	Adha – Ile – MeLeu – Pro – Tyr	Ishida et al., 2000
Microginin 704	C ₃₅ H ₅₂ N ₄ O ₉ S	705.3533	<i>N</i> -MeAdha – <i>N</i> -MeMet(O) – Tyr – Tyr	Stewart et al., 2018
Microginin 712 *	C ₃₇ H ₅₃ N ₅ O ₉	712.6	Ahda – Ala – MePro – Tyr – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin	C ₃₇ H ₅₅ N ₅ O ₉	714.4078	Adha – Ala – Val – <i>N</i> -MeTyr – Tyr	Okino et al., 1993

Microginin 714B*		714.2	Ahda – Ser – Pro – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 717*		718.3	Cl ₂ –Adha – Ala – Val – Leu/Ile- Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin FR5 *	C ₃₈ H ₅₅ N ₅ O ₉	726.41	Adha – Val – Pro – Tyr – Tyr	Welker et al., 2006; Riba et al., 2019 Neumann,U. et al. unpubl.
Microginin 725 *		726.3	ClAhda – Ala – MeLeu/Ile – MeLeu/Melle – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin FR1*	C ₃₈ H ₅₇ N ₅ O ₉	728.3	Adha – Ala – MeLeu – Tyr – Tyr	Neumann et al., 1997; Welker et al., 2006
Microginin FR3	C ₃₇ H ₅₃ N ₅ O ₁₀	728.3874	Adha – Thr – Pro– Tyr – Tyr	Welker et al., 2006; Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Cyanostatin A	C ₃₈ H ₅₇ N ₅ O ₉	728.4196	Adha – Ala – Val – N-MeTyr – HTy	Sano et al., 2005
Microginin 730 *		730.3	Ahda – Ser – Val – MeTry/HTy – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin T1	C ₃₆ H ₅₀ N ₅ O ₉ Cl	732.3406	ClAdha – Ala – Pro –Tyr –Tyr	Kodani et al., 1999
Microginin 91-D	C ₃₇ H ₆₁ N ₅ O ₈ Cl	738.4241	Cl-Adha – Ile – MeLeu – Pro – Tyr	Ishida et al., 2000
Microginin FR6 *	C ₃₉ H ₅₇ N ₅ O ₉	740.42	N-MeAdha – Val – Pro– Tyr – Tyr	Welker et al., 2006; Riba et al., 2019
Microginin 740B*		740.3	Ahda – Val – Tyr – Pro – MeTyr/Hty	Zervou et al., 2020
Microginin 742A*		742.3	N-MeAhda – Ala – MeLeu/Melle – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 742B*		742.3	N-MeAhda – Ser – Pro – Tyr – MeTyr/Hty	Zervou et al., 2020
Microginin 742C*		742.0	Ahda – Ala – MeLeu/Melle – MeTyr/Hty - Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin FR4	C ₃₈ H ₅₅ N ₅ O ₁₀	742.4031	N-MeAdha – Thr – Pro– Tyr – Tyr	Welker et al., 2006; Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin FR2 *	C ₃₉ H ₅₉ N ₅ O ₉	742.44	N-MeAdha – Ala – N-MeLeu – Tyr – Tyr – OH	Welker et al., 2006
Nostoginin BN 741	C ₃₉ H ₅₉ N ₅ O ₉	742.4386	Ahoa – Val –Melle – MeTyr	Ploutno e Carmeli, 2002
Microginin 744 *	C ₃₇ H ₅₃ N ₅ O ₁₁	744.6	Ahda – Thr – Pro – OHTyr – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin 744*		744.4	Ahda – Ser – MeLeu/Melle – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 747A*		748.3	ClAhda – Ser – Pro – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 747B*		748.2	ClAhda – Ala – Val – MeTyr/Hty – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin FR10 *		749.42		Welker et al., 2006
Microginin FR9 *	C ₃₉ H ₅₄ N ₆ O ₉	751.40	Adha – Thr – Pro – Tyr –Trp	Welker et al., 2006; Riba et al., 2019
Microginin 754	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₉	754.6	Ahda – Leu – Pro – HTy – Tyr	Riba et al., 2019
Cyanostatin B	C ₄₀ H ₅₉ N ₅ O ₉	754.4364	Adha – Tyr – N-Melle – Pro – Tyr	Sano et al., 2005
Microginin SD-755	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	756.4536	N-MeAhoa – Val – N-Melle – N-MeTyr - Tyr	Reshef & Carmeli, 2001
Microginin 756	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	756.4565	Adha – Val – Leu – HTy –Tyr	Carneiro et al., 2012
Microginin 756B*		756.4	N-MeAhda – Ala – MeLeu/Melle – MeTyr/Hty – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 755 *	C ₄₀ H ₆₁ N ₅ O ₉	756.45	Adha – Val – N-MeVal – N-MeTyr –Tyr	Riba et al., 2019
Microginin 299-D	C ₃₆ H ₅₆ N ₅ O ₈ Cl ₂	758.3549	Cl ₂ -Adha – Val – N-MeVal – N-MeTyr – Pro	Ishida et al., 1998
Microginin 757 *	C ₃₉ H ₅₉ N ₅ O ₁₀	758.43	Ahda–Thr–MeLeu–Tyr–Tyr	Welker et al., 2006
Microginin 757B*		758.2	Cl ₂ Ahda – Pro – Val – MeLeu/Melle – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 761A*		762.0	ClAhda – Ala – MeLeu/Melle – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 761B*		762.2	ClAhda – Thr – Pro – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 764 *	C ₄₀ H ₅₆ N ₆ O ₉	765.42	N-MeAdha – Thr – Pro – Tyr –Trp	Riba et al., 2019
Microginin 765 *		766.1	Cl ₂ Ahda – Ala – Pro – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 767 *	C ₄₁ H ₆₁ N ₅ O ₉	768.45	N-MeAdha – Tyr – N-Melle – Pro – Tyr	Riba et al., 2019

Microginin KR767	C ₄₁ H ₆₁ N ₅ O ₉	768.4551	<i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro – Tyr	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin 770	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₉	770.4730	<i>N</i> -MeAdha – Val – Leu – HTy – Tyr	Carneiro et al., 2012
Microginin 478	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₉	770.4517	<i>N</i> -MeAdha – Val – <i>N</i> -MeVal – <i>N</i> -MeTyr – Tyr	Ishida et al., 2000
Microginin 770 *	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₉	770.6	Ahda – Leu – MeVal – HTy – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin 772 *		772.2	Ahda – Thr – MeLeu/Ile – Tyr – MeTyr/Hty	Zervou et al., 2020
Microginin 91-E	C ₃₇ H ₆₀ N ₅ O ₈ Cl ₂	772.3779	Cl ₂ -Adha – Ile – MeLeu – Pro – Tyr	Ishida et al., 2000
Microginin 99-A	C ₄₀ H ₅₈ N ₅ O ₈ Cl	774.406	Cl-Adha – Tyr – Leu – <i>N</i> -MeTyr – Pro	Ishida et al., 1998
Microginin 776 *		776.3	Ahda – Ala – MeTyr/Hty – Hphe – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin KR781	C ₄₂ H ₆₃ N ₅ O ₉	782.4553	<i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro –	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin 784 *	C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₉	784.6	<i>N</i> -MeAhda – Leu – MeVal – HTy – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin KR787	C ₄₀ H ₅₈ N ₅ O ₉ Cl	788.3994	Cl-Adha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro – Tyr	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin 791*		792.2	Cl/Ahda – Thr – MeLeu/Melle – Tyr – Tyr	Zervou et al., 2020
Microginin 798 *	C ₄₃ H ₆₅ N ₅ O ₉	798.6	<i>N</i> -MeAhda – Leu – MeLeu – HTy – Tyr	Riba et al., 2019
Microginin KR801	C ₄₁ H ₆₀ N ₅ O ₉ Cl	802.4166	Cl- <i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro – Tyr	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin 99-B	C ₄₀ H ₅₇ N ₅ O ₈ Cl ₂	806.3647	Cl ₂ -Adha – Tyr – Leu – <i>N</i> -MeTyr – Pro	Ishida et al., 1998
Microginin GH787	C ₃₂ H ₄₃ N ₄ O ₈ Cl	810.3808	ClAdha – Tyr – <i>N</i> -Melle – Pro – Tyr	Lifshits et al., 2011
Microginin KR815	C ₄₂ H ₆₂ N ₅ O ₉	816.4318	Cl- <i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro – Tyr(OCH ₃)	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin KR835	C ₄₁ H ₅₉ N ₅ O ₉ Cl ₂	836.3765	Cl ₂ - <i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeLeu – Pro – Tyr	Lodin-Friedman & Carmeli, 2018
Microginin 299-C	C ₄₅ H ₆₈ N ₆ O ₁₀	853.4878	Adha – Val – <i>N</i> -MeVal – <i>N</i> -MeTyr – Pro – Tyr	Ishida et al., 1998
Microginin 299-A	C ₄₅ H ₆₇ N ₆ O ₁₀ Cl	887.4512	Cl-Adha – Val – <i>N</i> -MeVal – <i>N</i> -MeTyr – Pro – Tyr	Ishida et al., 1997
Microginin 51-A	C ₄₉ H ₆₈ N ₆ O ₁₁	917.4962	Adha – Tyr – <i>N</i> -MeVal – <i>N</i> -MeTyr – Tyr	Ishida et al., 2000
Microginin 299-B	C ₄₅ H ₆₆ N ₆ O ₁₀ Cl ₂	921.4164	Cl ₂ -Adha – Val – <i>N</i> -MeVal – <i>N</i> -MeTyr – Pro – Tyr	Ishida et al., 1997
Microginin 51-B	C ₅₀ H ₅₉ N ₆ O ₁₁	931.5135	<i>N</i> -MeAdha – Tyr – <i>N</i> -MeVal – <i>N</i> -MeTyr – Tyr	Ishida et al., 2000

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação ecotoxicológica de cianopeptídeos isolados de *Microcystis aeruginosa* em *Danio rerio*.**”, registrada com o nº **019/17**, sob a responsabilidade de **Ernani Pinto Júnior** e **Kazumi Kinoshita**, apresentada pelo Biotério Central da FMUSP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 21.02.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-03-2017 Término: 01-06-2020
Espécie/linhagem/raça	Zebra fish
Nº de animais	9.675 (4.500 larvas, 4.500 embriões e 675 adultos)
Peso/Idade	Larvas, embriões e adultos
Sexo	Não se aplica
Origem	Biotério Central da FMUSP

CEUA-FMUSP, 21 de Fevereiro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9143 - 5711725/1 - Kazumi Kinoshita

Email: kazumi.kinoshita@usp.br
Data de Nascimento: 02/05/1989
Cédula de Identidade: RG - 44.813.394-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Toxicologia
Data de Matrícula: 26/10/2015
Início da Contagem de Prazo: 26/10/2015
Data Limite para o Depósito: 27/02/2020
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 07/03/2018 até o presente. Email: ernani@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 26/10/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 26/10/2019 até 23/02/2020
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 19/12/2017
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: Primeira Matrícula em 26/10/2015
Prorrogação em 17/09/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2020

Impresso em: 19/02/2020 16:23:45

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

9143 - 5711725/1 - Kazumi Kinoshita

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-6/4	Análise Espectrométrica de Fármacos	02/03/2016	14/06/2016	150	10	86	A	N	Concluída
FBC5784-3/8	Tópicos Avançados em Toxicologia II	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5883-7/1	Avaliação da Toxicidade de Contaminantes em Amostras Ambientais	08/08/2016	04/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	11/08/2016	19/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5729-8/1	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	11/04/2017	08/05/2017	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0210 – Toxicologia Ambiental, ministrada aos alunos de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	02/07/2018	30/11/2018	-	3	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	28
Estágios:			
Total:	0	20	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588/05, alterada pelas Portarias GR-4391/09 e GR-4601/09 - PAE e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/11/2019.

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 03/02/2020

Impresso em: 19/02/2020 16:23:46