

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

Área de Toxicologia

**Desenvolvimento de método analítico para o monitoramento ambiental de
peptídeos de cianobactérias em amostras de água**

Felipe Garcia Carvalho

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

Área de Toxicologia

**Desenvolvimento de método analítico para o monitoramento ambiental de
peptídeos de cianobactérias em amostras de água**

Felipe Garcia Carvalho

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2023

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

CARVALHO, FELIPE

C257d Desenvolvimento de método analítico para o monitoramento ambiental de peptídeos de cianobactérias em amostras de água / FELIPE CARVALHO. - São Paulo, 2023.

90 p.

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

Orientador: Júnior, Ernani

1. cianopeptídeos. 2. espumiginas. 3. namalídeos. I. T. II. Júnior, Ernani, orientador.

Felipe Garcia Carvalho

Desenvolvimento de método analítico para o monitoramento ambiental de peptídeos de
cianobactérias em amostras de água

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior
orientador/presidente



Prof. Dra.

1o. examinador

Prof. Dr.

2o. examinador

Prof. Dr.

3o. examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ernani Pinto Junior, pela orientação e por todo o apoio durante o mestrado, além dos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, da FCF-USP, que me apoiaram desde o início e contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Em especial à Larissa Passos, Éryka Costa, Fernanda Jacinavicius, Mariana Torres, Rhuana Médice, Vanessa Geraldles, Kelly Fernandes, Felipe Dörr e Mirian Sanz. Agradeço também aos demais alunos e funcionários do Laboratório pelo apoio na realização do projeto. E também as funcionárias da secretaria, principalmente a Elaine, nesta reta final.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido sob a bolsa número 132566/2019-2.

RESUMO

CARVALHO, F. G. **Desenvolvimento de método analítico para o monitoramento ambiental de peptídeos de cianobactérias em amostras de água.** 2022. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022, 90f.

Cianobactérias são organismos fotossintetizantes que habitam diferentes ecossistemas. No ambiente de água doce, especialmente em represas, lagos e lagoas, podem crescer de forma acelerada (floração) e causar problemas de toxicidade e contaminação da água. Elas produzem diversos metabólitos que podem ser tóxicos, como microcistinas e nodularinas, mais amplamente conhecidas e estudadas. No entanto, a riqueza de compostos produzidos é alta e ainda muito pouco se conhece em relação à sua estrutura química e sua toxicidade. Sabe-se, entretanto, que boa parte destes compostos são de origem peptídica, geralmente polipeptídeos necessários para sua sobrevivência. Desta forma, esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC ou LC) acoplada a espectrometria de massas (em inglês, *mass spectrometry*, MS) para a determinação quantitativa e simultânea dos cianopeptídeos namalídeos e espumiginas. Ambos compostos foram recém descobertos, e analisados neste estudo a partir da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024). Foram testados diversos métodos de extração, purificação e separação com sua biomassa seca. Todos com vantagens e desvantagens, no entanto, a melhor opção foi uma extração direta. Outro ponto avaliado foram os padrões internos (PI), na qual foram testados diversos compostos quimicamente similares aos do estudo, e alguns se mostraram promissores para o estudo, como o HHL (N-Hippuryl-His-Leu-hidratado) e GPA (Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida acetate salt). O método cromatográfico foi otimizado para as análises.

Palavras-chave: cianopeptídeos, cromatografia, espectrometria de massas, espumiginas, namalídeos.

ABSTRACT

CARVALHO, F. G. **Developing a bioanalytical method for environmental monitoring cyanobacterial peptide metabolites in water samples. 2022.** Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022, 90f.

Cyanobacteria are photosynthetic organisms that inhabit different ecosystems. In the freshwater environment, especially in dams, lakes, and ponds, they can proliferate (bloom) and cause problems of toxicity and water contamination. They produce several metabolites that can be toxic, such as microcystins and nodularins, which are more widely known and studied. However, the compounds' richness is high and very little is known about their chemical structure and toxicity. It is known, however, that most of these compounds are of peptide origin, generally polypeptides necessary for their survival. Thus, this study aimed to develop an analytical methodology using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC or LC) coupled with mass spectrometry (MS) for the quantitative and simultaneous determination of namalide and spumigin cyanopeptides. Both compounds were recently discovered and analyzed in this study from the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* (strain ITEP-024). Several extractions, purification, and separation methods were tested with their dry biomass. All with advantages and disadvantages. However, the best option was a direct extraction. Another point evaluated was the internal standards (IP), in which several compounds chemically similar to those in the study were tested, and some showed promise for the study, such as HHL (N-Hippuryl-His-Leu-hydrated) and GPA (Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida acetate salt). The chromatographic method was optimized for the analyses.

Keywords: chromatography, cyanopeptides, mass spectrometry, namalides, spumigins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção do gradiente da fase B utilizada nos testes por LC-QqQ-MS/MS.

Tabela 2: Proporção do gradiente da fase B utilizada nos testes por LC-QqQ-MS/MS

Tabela 3: Características da extração exploratória por SPE.

Tabela 4: Volumes utilizados em cada cartucho de SPE durante a extração.

Tabela 5: Características dos padrões internos utilizados no teste.

Tabela 6: Características dos picos dos padrões de microcistinas e nodularina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Florações de cianobactérias em reservatórios de água no Brasil. Da esquerda para direita: lago do Museu Mariano Procópio em Juiz de Fora, MG; Praia dos Namorados em Americana, SP; detalhe da Represa do Funil, RJ.

Figura 2: Microscopia da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae*.

Figura 3: Estruturas moleculares dos peptídeos namalídeos B e C e spumiginas K-N.

Figura 4: Cultivo da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* - (a) cepa ITEP-024 e (b) biomassa após a liofilização.

Figura 5: Cromatograma com os picos de microcistinas e nodularina.

Figura 6: Cromatograma obtido por LC-MS em modo Scan para identificação de namalídeos e espumiginas.

Figura 7: Comparação entre os cromatogramas de namalídeos (vermelho - filtrado; rosa - não filtrado) e espumiginas (verde - filtrado; preto - não filtrado) de uma amostra da cepa ITEP-024 com filtro de seringa de 0,22 μm .

Figura 8: Extratos da cepa ITEP-024 com SPE (cartucho 1) foram analisados com 100 % (a), 80 % (b), 60 % (c), 40 % (d) e 20 % (e) de MeOH, buscando os compostos em ambas as relações de m/z de 576 e 613.

Figura 9: Extratos da cepa ITEP-024 com SPE (cartucho 2) foram analisados com 100 % (A), 80 % (B), 60 % (C), 40 % (D) e 20 % (E) de MeOH, buscando os compostos em ambas as relações de m/z de 576 e 613.

Figura 10: Biomassa da cepa ITEP-024 em cromatografia em coluna, em diferentes frações de MeOH: 100 % (A), 90 % (B) e 80 % (C); buscando os compostos em ambas as relações de m/z de 576 e 613.

Figura 11: Comparativo de intensidade de picos em amostra da cepa ITEP-024 entre as 3 primeiras frações.

Figura 12: Extrato da cepa CENA 543 com 100 % (A), 90 % (B) e 80 % (C) de MeOH.

Figura 13: Comparativo de intensidade de picos em amostra de CENA entre as 3 primeiras frações.

Figura 14: Etapa exploratória com acetona 90 % (A), base com acetona 90 % (B), exploratória com água (C), base com água (D), exploratória com água acidificada (E), exploratória com diclorometano (F) e base com diclorometano (G).

Figura 15: Comparativo entre a extração direta e extração de pigmentos entre os cromatogramas de namalídeos (vermelho - pigmento; rosa - direto) e espumiginas (verde - pigmento; preto - direto).

Figura 16: Comparativo entre diferentes energias de colisão no perfil de fragmentação da espumigina.

Figura 17: Comparativo entre diferentes energias de colisão no perfil de fragmentação do namalídeo.

Figura 18: Cromatograma do padrão de nodularina (A); espectro de massas da nodularina (B) e espectro de massas da nodularina após a reação 1.

Figura 19: Cromatograma (A) e espectro de massas do padrão de microcistina YR (B) usado como controle positivo da reação (pico antes da reação). Cromatograma (C) e espectro de massas do padrão de microcistina YR (D) usado como controle positivo da reação, após a reação.

Figura 20: Cromatograma (A) e espectro de massas (B) da nodularina usada na reação 2 (pico antes da reação).

Figura 21: Cromatograma (A) e espectro de massas (B-C) da nodularina usada na reação 2 com formação do fragmento de m/z 839(B) e 853(C). Picos depois da reação com m/z de 825 (verde), 839 (azul) e 853 (roxo) e seus respectivos espectros de massas.

Figura 22: Cromatograma (A) e espectro de massas (B) do padrão de microcistina YR utilizado como controle positivo da reação (pico antes da reação).

Figura 23: Cromatograma (A) e espectro de massas (B-C) do padrão de microcistina YR (roxo) utilizado como controle positivo da reação (picos depois da reação).

Figura 24: Pico de nodularina de m/z 825 extraída com água acidificada. Cromatograma (A) e espectro de massas (B).

Figura 25: Pico de nodularina de m/z 825 extraído com água acidificada e submetido a redução com borohidreto de sódio e sem formação de outros fragmentos (nodularina intacta).

Figura 26: Sobreposição dos picos de m/z de 825, 839 e 853 (nodularina + nodularina monometilada + nodularina dimetilada).

Figura 27: Pico de nodularina com m/z de 825 após reação com 3-BF. Cromatograma (A) e espectro de massas (B).

Figura 28: Pico de nodularina, m/z de 839 e 853, após reação com 3-BF, em que praticamente quase toda a nodularina é convertida nestes novos compostos (nodularina modificada). Cromatograma (A) e espectro de massas (B).

Figura 29: Sobreposição dos picos de m/z de 825 (vermelho), 839 (preto) e 853 (roxo), após a reação com 3-BF, mostrando que há nodularinas modificadas, mas voltou a aparecer o pico de nodularina base que anteriormente tinha sido consumida quase por completo.

Figura 30: Padrão de nodularina comercial de 1 $\mu\text{g/mL}$ (A); padrão de nodularina comercial 1 $\mu\text{g/mL}$ após reação com 3-BF (B); padrão de nodularina comercial 1 $\mu\text{g/mL}$ reagido com borohidreto de sódio e posterior reação com 3-BF (C); sobreposição dos picos da cepa ITEP-024 (roxo - namalídeo; azul - espumigina) e do padrão de nodularina modificada (vermelho), mostrando a resolução entre eles (D).

Figura 31: Cromatograma do aciclovir utilizado para teste de padrão interno com a função de TIC (roxo) e EIC (verde) (A) e sua estrutura química (B).

Figura 32: Cromatograma com o pico do aciclovir (2,6 min) e namalídeo (6,8 min) no modo Scan.

Figura 33: Cromatograma da amostra normal e reduzida (A) sobrepostos contendo os picos de aciclovir (2,6 min - azul e roxo), espumigina (3,6 min - laranja) e namalídeo (6,8 min - azul) e espectro de massas do aciclovir no cromatograma (B).

Figura 34: Estrutura química do NAPTLAME (A); cromatograma do NAPTLAME utilizado para teste de padrão interno (B) e espectro de massas do NAPTLAME do cromatograma (C).

Figura 35: Cromatograma com os picos de NAPTLAME (3,6 min - verde), espumigina (3,6 min - roxo) e namalídeo (6,8 min - azul).

Figura 36: Espectros de massas do pico da espumigina (A) e do NAPTLAME (B).

Figura 37: Estrutura química do Tryptophan-d5 (A); cromatograma do Tryptophan-d5 utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do Tryptophan-d5 (2,9 min - vermelho) e namalídeo (6,8 min - roxo) (B), e espectro de massas do Tryptophan-d5 do cromatograma (C).

Figura 38: Estrutura química do melatonin-d4 (A); cromatograma do melatonin-d4 utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do melatonin-d4 (6,4 min - azul) e namalídeo (6,8 min - vermelho) (B), e espectro de massas do melatonin-d4 do cromatograma (C).

Figura 39: Cromatograma contendo os picos de espumigina (3,6 min - azul), melatonin-d4 (6,4 min - 237(roxo) e 259 (vermelho) e namalídeo (6,8 min - verde) (A) e espectro de massas do melatonin-d4 mostrando a formação do pico de m/z 259 (B).

Figura 40: Estrutura molecular do N-succinil-Gly-Gly-Fe-p-nitroanilida.

Figura 41: Estrutura química do HHL (A); cromatograma do HHL utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do HHL (3,8 min - azul) e namalídeo (6,8 min - azul) (B) e espectro de massas do HHL do cromatograma (C).

Figura 42: Estrutura química do GPA (A), cromatograma do GPA utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do GPA (5,6 min - roxo) e namalídeo (6,8 min - preto) (B), e espectro de massas do GPA do cromatograma (C).

LISTA DE SIGLAS

Non-ribosomal peptide synthetases = NRPS

Cromatografia líquida de alta eficiência = HPLC ou LC

Detector de arranjo de diodos = DAD

Espectrômetro de massas = MS

Triplo quadrupolo = QqQ ou MS/MS)

Extração em fase sólida = SPE

Injetor de eletrospray = ESI

Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo e eletrospray (HPLC-ESI-QqQ)

Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas e Cianobactérias = LTPNA

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo = FCF-USP

Extração em fase sólida = EFS ou SPE

Cromatografia em coluna = CC

Diclorometano = DCM

Padrão interno = PI

Tempo de retenção = TR

LISTA DE SÍMBOLOS

Borohidreto de sódio = NaBH_4

Ácido fórmico = AcF

Metanol = MeOH

Acetonitrila = ACN

Microcistina YR = MC-YR

Trifluoreto de boro em MeOH = 3-BF

Borohidreto de sódio = NaBH_4

Água = H_2O

Solução metanol: água (1:1) = MeOH: H_2O 50:50 (v/v)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cianobactérias e produtos naturais	1
1.2 Cianopeptídeos	2
1.3 <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> (Cyanobacteria: Nostocales)	3
1.4 Namalídeos B e C e Espumiginas K-N	4
1.5 Métodos de extração e análise para a determinação de cianopeptídeos	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. HIPÓTESE	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1 Reagentes	8
4.2 Produção de biomassa da cepa ITEP-024 (<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>)	8
4.4 Teste de extrações	11
4.4.1 Extração simples por sonicação	11
4.4.2 Extração exploratória por SPE	11
4.4.3 Extração em fase sólida (EFS ou SPE)	13
4.4.4 Extração comparativa de amostras de ITEP-024 e CENA 543	13
4.4.5 Cromatografia em coluna ou extração em fase sólida (SPE)	14
4.4.6 Extração líquido-líquido	15
4.5 Padrão Interno	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Produção de biomassa da cepa ITEP-024 (<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>) e CENA 543 (<i>Nostoc sp.</i>)	19
5.2 Testes iniciais com espectrometria de massas (MS)	19
5.3 Testes de filtração	21
5.4 Testes de extração	22
5.4.1 Extração exploratória por SPE	22
5.4.2 Extração exploratória por SPE - Cartucho 1	22
5.4.4 Extração exploratória por SPE - Cartucho 2	24
5.4.5 Cromatografia em coluna	27
5.4.6 Cromatografia em coluna - CENA 543	29
5.4.7 Extração líquido-líquido	31
5.4.8 Extração líquido-líquido - Retirada de pigmentos	34
5.5 Avaliação da energia de colisão	35
5.6 Padrão Interno	36

5.6.1 Nodularina modificada	37
5.6.1.1 Reação 1	37
5.6.1.2 Reação 2	40
5.6.2 Nodularina - Extração da cepa CENA 543	46
5.6.3 Aciclovir	52
5.6.4 N-alfa-para-tosyl-L-arginina metil ester (NAPTLAME)	54
5.6.5 Tryptophan-d5	57
5.6.6 Melatonin-d4	58
5.6.7 N-succinil-Gly-Gly-Fe-p-nitroanilida	60
5.6.8 N-Hippuryl-His-Leu-hidratade (HHL)	61
5.6.9 Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida acetate salt (GPA)	62
5.7 Resultados promissores	63
5.7.1 Extração da biomassa para liberação dos compostos de interesse	63
5.7.2 Padrões internos promissores: HHL e GPA	63
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cianobactérias e produtos naturais

As cianobactérias são microrganismos procariotos e fotossintetizantes que estão presentes nos mais diversos ecossistemas. Em razão de sua ampla variedade de gêneros, espécies e capacidade de adaptação, elas produzem uma enorme variedade de metabólitos secundários bioativos. Muitos metabólitos secundários são de origem peptídica, tipicamente de origem bioquímica não ribossomal, e conhecidos como cianopeptídeos (Lima, et al., 2017). Os cianopeptídeos são comumente agrupados de acordo com similaridades estruturais, com vias de biossíntese compartilhadas, como as aeruginosinas, anabaenopeptinas, cianopeptolinas, ciclamidas, microgininas, microviridinas e microcistinas (Welker et al., 2006). Alguns desses compostos possuem atividades farmacológicas diversas como ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticâncer, imunossupressora e de inibição de proteases diversas (Gademann and Portmann, 2008; Chlipala et al., 2011).

Alguns dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias exibem propriedades tóxicas e são chamados de cianotoxinas. Entre os efeitos danosos aos organismos, pode-se citar hepatotoxicidade, neurotoxicidade, dermatotoxicidade e inibição proteica (Sanz et al., 2017; Bortoli et al., 2014). A ação antrópica tem levado ao crescimento acelerado de cianobactérias em alguns reservatórios, e a presença de cianotoxinas é de grande preocupação. Esse crescimento, denominado floração (“*bloom*” em inglês) (Figura 1), está intimamente relacionado com fatores ambientais como luminosidade, temperatura, pH, irradiação e nutrientes (Hameed et al., 2020). A avaliação dessas condições pode ajudar a compreender os mecanismos de defesa e de produção de metabólitos secundários de cianobactérias através de variações no meio ambiente (Chen e Xie, 2016).

Figura 1: Florações de cianobactérias em reservatórios de água no Brasil. Da esquerda para direita: lago do Museu Mariano Procópio em Juiz de Fora, MG; Praia dos Namorados em Americana, SP; detalhe da Represa do Funil, RJ.



Fonte: Acervo pessoal.

Contudo, pouca atenção tem sido dada aos cianopeptídeos quanto a sua presença em água doce e sua toxicidade. Neste projeto, serão avaliados os namalídeos B e C e espumiginas K-N, produzidos pela cianobactéria ITEP 024 *Sphaerospermopsis torques-reginae*. Esses cianopeptídeos foram recém descobertos e apresentam atividade inibitória de proteases (Sanz et al., 2017).

1.2 Cianopeptídeos

Os cianopeptídeos representam cerca de 60 % dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias conhecidas até o momento (Žula et al., 2018). Com quase 1500 estruturas já descritas na literatura, a maior parte dos cianopeptídeos descritos são sintetizados pela via não ribossomal (NRPS do inglês *Non-ribosomal peptide synthetases*) (Welker e von Döhren, 2006). A produção de peptídeos estruturalmente diferentes pode ser mais vantajosa para a cianobactéria, já que não ocorre a dominância de apenas um tipo de peptídeo (Welker and von Döhren, 2006).

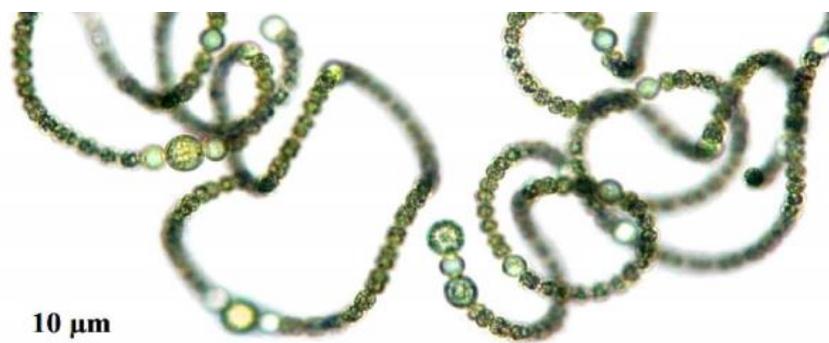
Alguns cianopeptídeos apresentam atividades antifúngicas, antibacterianas, citotóxica e de inibição de proteases e outras enzimas (Chlipala et al., 2011). Assim, uma

vez fora das células das cianobactérias, podem afetar os organismos presentes no ecossistema (Bober e Bialczyk, 2017). Ainda, devido à diversidade de metabólitos secundários produzidos e de suas diferentes propriedades, as cianobactérias são consideradas fontes promissoras de novos compostos farmacêuticos e agrícolas, como por exemplo micosporinas como fotoprotetores (Barrios-Llerena et al., 2007) (Geraldês et al., 2020).

1.3 *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria: Nostocales)

A espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Figura 2) é uma cianobactéria filamentosa encontrada em algumas regiões do continente sul-americano, em países como Brasil, Colômbia e Argentina (Werner et al., 2012). Essa espécie possui a capacidade de produzir os cianopeptídeos: anabaenopeptinas, namalídeos e espumiginas (Jacinavicius et al., 2020; Sanz et al., 2017), além de aminoácidos do tipo micosporinas (Geraldês et al., 2020) e guanitoxina (Fernandes et al., 2020). Em relação aos cianopeptídeos, pouca atenção tem sido dada à sua presença em ecossistemas aquáticos.

Figura 2: Microscopia da espécie ITEP 024 *Sphaerospermopsis torques-reginae*.



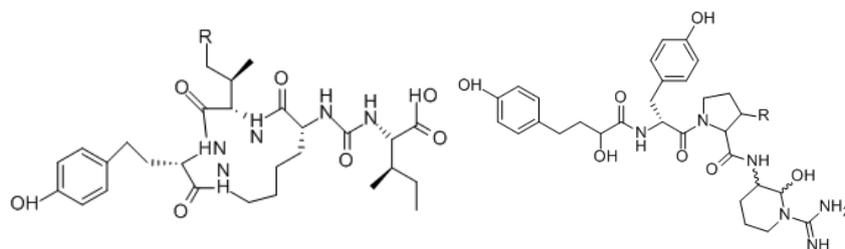
Fonte: Werner et al. (2012).

1.4 Namalídeos B e C e Espumiginas K-N

O trabalho de Sanz et al. (2015) foi responsável pela elucidação das estruturas dos namalídeos B e C e das espumiginas K-N na cepa ITEP 024 (*S. torques-reginae*) (Figura 3). Os namalídeos são tetrapeptídeos cíclicos, que apresentam semelhanças estruturais com as anabaenopeptinas, com exceção de dois aminoácidos macrocíclicos, (Sanz et al., 2017). Essas moléculas foram relatadas na literatura como sendo produzidos pela esponja marinha *Siliquariaspongia mirabilis* (Itou et al., 1999) e mais recentemente, pela cianobactéria ITEP 024 (Sanz et al., 2017). Até o momento, sabe-se que estes compostos são inibidores da carboxipeptidase A em nível submicromolar (Cheruku et al., 2012; Sanz et al., 2017).

As espumiginas são tetrapeptídeos lineares, com vinte e quatro isoformas relatadas em cepas de cianobactérias dos gêneros *Nodularia*, *Dolichospermum* e *Sphaerospermopsis* (ITEP 024) (Fujii et al., 1997; Sanz et al., 2017). Esses peptídeos são potentes inibidores de proteases de serina e cisteína por vias biossintéticas de NRPS (Anas et al., 2012).

Figura 3: Estruturas moleculares dos peptídeos namalídeos (tetrapeptídeo cíclico - esquerda) e espumiginas (tetrapeptídeo linear - direita).



Fonte: Sanz et al., 2017.

1.5 Métodos de extração e análise para a determinação de cianopeptídeos

Atualmente, as técnicas cromatográficas mais utilizadas para análise e identificação de cianopeptídeos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de arranjo de diodos (DAD) e/ou de um espectrômetro de massas (MS) do tipo triplo quadrupolo (QqQ ou MS/MS). A técnica de extração mais utilizada é a extração em fase sólida (SPE) (Bortoli et al., 2014; Sanz et al., 2017; Dörr et al., 2010; Paiva et al., 2017; Lima et al., 2017; Sanz et al., 2015; Hoff-Risseti et al., 2013).

A SPE foi introduzida em 1976 para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido, e hoje, consiste no método mais popular de preparo de amostras, sendo utilizada pela maioria dos laboratórios em análises de rotina. Possui um vasto campo de aplicação como em análises de fármacos, contaminantes alimentares e ambientais e nas áreas de bioquímica e de química orgânica. As vantagens apresentadas pela SPE em comparação com a extração líquido-líquido clássica são o menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e solventes (Matuszewski et al., 2003, Fontes., 2010).

Os principais objetivos da SPE são a remoção de interferências da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos. O fator de concentração é obtido pela razão entre o volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume final de solução concentrada. A concentração pode ser aumentada por um fator de 100 a 5000, tornando possível a análise qualitativa e quantitativa em concentração de ppm a ppb. As fases sólidas e estacionárias empregadas em SPE, são similares àquelas utilizadas em cromatografia líquida em coluna, conseqüentemente, os mecanismos de separação

também são similares. Os principais mecanismos são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão (Matuszewski et al., 2003, Fontes., 2010).

A história da espectrometria de massas moderna é geralmente atribuída inicialmente aos experimentos de J.J. Thomson sobre raios catódicos. Ao aplicar um campo elétrico no tubo, Thomson, em 1897, observou uma deflexão do elétron dentro do mesmo, sendo esta considerada uma das primeiras determinações da razão m/z . Thomson ganhou o prêmio Nobel de Física em 1906 por estes estudos. De acordo com o Prof. J. B. Fenn, ganhador do Prêmio Nobel em Química no ano de 2002 pelo trabalho pioneiro no uso de *electrospray* como fonte de ionização branda para espectrometria de massas, a espectrometria de massas é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie. Para praticar esta arte, colocamos carga nas moléculas de interesse, isto é, os analitos, e então medimos como as trajetórias dos íons resultantes respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Claramente, a condição *sine qua non* deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons.

A amostra a ser analisada é introduzida por um *inlet* (dispositivo para a introdução da amostra no espectrômetro) e direcionada para a fonte de ionização. Nos estágios iniciais do desenvolvimento da técnica, a amostra era introduzida pela vaporização direta da mesma; com o desenvolvimento das técnicas cromatográficas tornou-se bastante comum o uso de cromatografia como fonte de introdução da amostra no MS. Neste último caso, os picos cromatográficos gerados pela separação dos componentes da amostra são individualmente introduzidos na fonte de ionização do MS para gerar os íons a serem posteriormente separados no analisador e encaminhados para detecção e quantificação.

Um software apropriado instalado em um computador efetua os cálculos, gera os espectros de massas a serem impressos e comanda as funções do espectrômetro (Dörr et al, 2010; Miller et al., 2010; Lanças, 2009).

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo desenvolver um método analítico por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) para a determinação quantitativa e simultânea dos metabólitos recém descobertos namalídeos B e C e espumiginas K-N produzidos pela cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Cultivar a cepa ITEP 024 para obtenção de células para realização dos experimentos de extração e identificação de namalídeos B e C e espumiginas K-N;
- ii. Testar diferentes tipos de extração para obtenção de um extrato bruto contendo os cianopeptídeos de interesse;
- iii. Realizar fracionamento por cromatografia em coluna aberta, a partir do extrato selecionado, para obtenção de amostras enriquecidas com os cianopeptídeos de interesse;
- iv. Utilizar técnicas de LC-MS a fim de otimizar a identificação dos namalídeos B e C e espumiginas K-N para monitoramento ambiental e utilização de padrão interno para fazer a quantificação destes compostos, haja visto que não há padrões comerciais destes.

3. HIPÓTESE

A cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (HPLC-ESI-QqQ) é uma técnica analítica robusta e abrangente o suficiente para detectar e quantificar os compostos de interesse neste estudo (polipeptídeos), em análises de rotina para monitoramento ambiental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

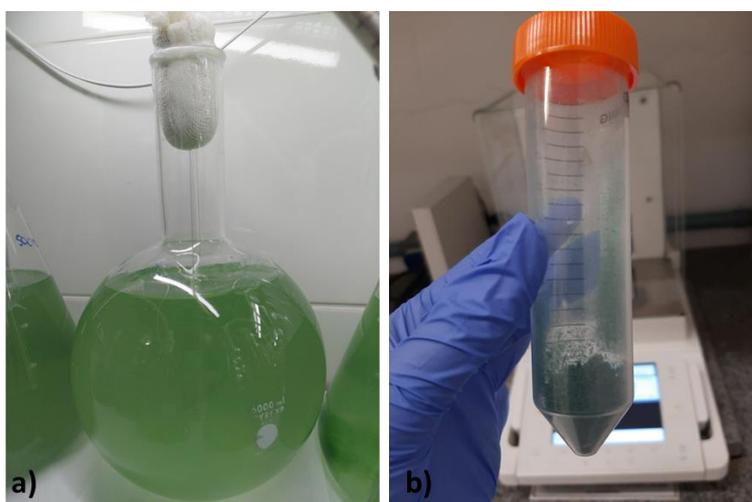
Sais para o preparo do meio ASM-1 grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Água ultrapura MilliQ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes utilizados para as análises LC-MS/MS são grau HPLC. Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), e metanol e acetonitrila (JT Baker, Phillipsburg, EUA). Todos os reagentes sólidos também foram obtidos com Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha).

4.2 Produção de biomassa da cepa ITEP-024 (*Sphaerospermopsis torques-reginae*)

Os experimentos foram conduzidos a partir da cepa ITEP 024 da cianobactéria da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae*, isolada de uma floração tóxica no reservatório de Tapacurá, Pernambuco, Brasil (Molica et al., 2005) e mantida no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas e Cianobactérias (LTPNA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). As culturas foram mantidas em meio ASM-1, 24 ± 2 °C, fotoperíodo 12:12 (claro:escuro), intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e aeração constante (Figura 4a). A cultura de cianobactérias mostrou um crescimento bom apenas com suplementação de nitrogênio

e alguns outros sais e que por tanto o meio ASM-1 é adequado (Miranda, C.T. 2017). Após 15-20 dias de cultivo, as culturas foram centrifugadas (8.000 rpm, 15 °C, e 10 minutos) e então liofilizadas (L101, Liotop) (Figura 4b).

Figura 4: Cultivo da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* - (a) cepa ITEP 024 e (b) biomassa após a liofilização.



Fonte: Acervo pessoal.

4.3 Espectrometria de Massas (MS) - testes preliminares

Baseando no trabalho de Sanz et al. (2017), foram realizados os primeiros experimentos para avaliar se o método proposto se adequaria ao nosso equipamento. Para isso, foi utilizado como base um método de identificação de microcistina, mais abrangente e comum na literatura. Uma mistura de padrões de referência de microcistina e nodularinas (Braxis, EUA) juntamente com uma amostra extraída foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrômetro de massa do tipo triplo-quadrupolo (HPLC-ESI-QqQ) Agilent 6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) com ionização por eletrospray (ESI), em modo positivo e a 3500 V. O nitrogênio

foi o gás nebulizador (45 psi) e gás de secagem (5 mL/min a 300 °C). As amostras foram analisadas por um modo *Scan* de varredura de massas.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna cromatográfica Luna C18 (250 x 3,5 mm x 5µm) (Phenomenex, EUA). As fases móveis foram água + ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B); volume de injeção: 5 µL. A separação cromatográfica foi realizada com fluxo de 0,25 mL/min, 40 °C e a proporção do gradiente entre as fases A e B está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Proporção do gradiente da fase B utilizada nos testes por LC-QqQ-MS/MS.

Tempo (min)	0	20	26	28	35
B (%)	25	95	95	25	25

4.3.1 Otimização do método cromatográfico

Após os testes iniciais, foi realizada otimização do método para que as análises pudessem ser mais rápidas e precisas. Para isso, foram realizados testes com uma coluna menor e conseqüentemente um tempo de corrida menor - Luna C18 (150 x 2 mm x 3µm) (Phenomenex, EUA). As fases móveis A e B foram as mesmas das descritas na Tabela 1. Volume de injeção de 5 µL, fluxo de 0,25 mL/min e temperatura do forno a 40 °C foram mantidos ao longo da corrida. A nova proporção do gradiente entre as fases A e B está descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Proporção do gradiente da fase B utilizada nos testes por LC-QqQ-MS/MS.

Tempo (min)	0	10	12,5	13	19
-------------	---	----	------	----	----

B (%)	25	95	95	25	25
-------	----	----	----	----	----

4.4 Teste de extrações

4.4.1 Extração simples por sonicação

Uma alíquota de 10 mg de células liofilizadas da cepa ITEP-24 foi extraída com 1 mL de solução metanol: água (1:1) (MeOH:H₂O 50:50 (v/v)) com auxílio de ultrassom com probe (OMNI Sonic Ruptor 400) com intensidade de 30 % durante 7 min (1 ciclo). Essa amostra passou por um segundo ciclo para garantir que todas as células foram lisadas. Depois a amostra foi centrifugada (Eppendorf 5415 R Centrífuga) em 8000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado por filtro de seringa PVDF 0,22 µm (Analítica, São Paulo) e a amostra foi então analisada por LC-MS.

4.4.2 Extração exploratória por SPE

Foram realizados três testes com diferentes cartuchos de SPE a fim de avaliar a interação da amostra com os diferentes tipos de recheio da fase estacionária. Como cada cartucho apresenta quantidades diferentes de sílica, foram adaptadas as quantidades de amostra com a finalidade de não sobrecarregar a mesma. A Tabela 3 apresenta as informações do tipo de cartucho e a quantidade de amostra.

Tabela 3: Características da extração exploratória por SPE.

Número de cartucho	Tipo de cartucho	Quantidade de amostra (mg)	Volume de solubilização da amostra em MeOH 70 % (µL)
--------------------	------------------	----------------------------	------------------------------------------------------

1	Bond-Elut-C18, 100 mg 3 mL (Variant, EUA)	50	500
2	Sep-PakVac 3cc C18 (500 mg, 3 mL) (Waters, EUA)	10	500
3	Strata SI-1 Sílica (55 μ m, 70Å), 500 mg, 3 mL (Phenomenex, EUA)	50	200

As amostras foram ressuspensas em MeOH: H₂O 70:30 (v/v), e as células foram lisadas em probe de ultrassom com intensidade de 30 %, por 7 min (2 ciclos). Em seguida foi feita a centrifugação da amostra e o sobrenadante foi transferido para os cartuchos de SPE.

Os cartuchos foram previamente acondicionados, inicialmente com água (100%) e depois MeOH: H₂O 90:10 (v/v). Em seguida, foram feitas as eluições seriadas com o seguinte gradiente: MeOH:H₂O 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 e 100:0 (v/v). Os volumes utilizados para cada cartucho são descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Volumes utilizados em cada cartucho de SPE durante a extração.

Cartucho	Volumes usados (mL)
1	3
2	3
3	1

Os eluatos foram coletados e secos em *Speed Vac* (CentriVap Cold Trap, LABCONCO) inicialmente a 40 °C por 240 min. Após esse tempo permaneceu apenas com vácuo, em temperatura ambiente até sua completa secagem (aproximadamente 24h). Na sequência, foram reconstituídos em 500 µL de MeOH:H₂O 50:50 (v/v) para injeção no LC-MS.

4.4.3 Extração com Extração em fase sólida (EFS ou SPE)

Após os testes iniciais, foi definido um protocolo de extração com o uso de SPE: 20 mg de biomassa seca, ressuspensos em 400 µL de MeOH:H₂O 70:30 (v/v), células lisadas em probe de ultrassom com intensidade de 30 %, por 7 min (2 ciclos). Na sequência, foram adicionados 2400 µL de água MilliQ para que a porcentagem final de MeOH na amostra fosse de 10 % (v/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes adicionados aos cartuchos SPE 1 e 2. Os cartuchos foram condicionados como descrito no item 4.4.2. Em seguida, foram feitas eluições seriadas com quantidades crescentes de metanol para averiguar o espectro de eluição dos compostos presentes na amostra. Partiu-se de MeOH: H₂O 10:90 e foram seguidos por 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 e 100:00 (v/v).

As frações foram secas em *Speed Vac* e posteriormente, ressuspensas com 500 µL de MeOH: H₂O 50:50 (v/v) e filtradas (0,22 µm) para então serem injetadas no LC-MS. Uma alíquota desta amostra (50 µL) foi adicionada a 50 µL de uma solução saturada de borohidreto de sódio (NaBH₄) para que ocorresse a redução dos compostos analisados.

4.4.4 Extração comparativa de amostras de ITEP-024 e CENA 543

Para realizar uma comparação entre os compostos de interesse da cepa ITEP 024 (espumiginas e namalídeos) e o padrão interno (nodularinas da cepa CENA 543, *Nostoc sp.*), foi feita uma extração comparativa. Para isso, 20 mg de biomassa seca, de ambas as cepas, foram individualmente ressuspensas em 500 µL de MeOH: H₂O 70:30 (v/v), levadas ao ultrassom com probe. Foram utilizados dois cartuchos de SPE, previamente usados no item 4.4.3. Foi feita a eluição dos compostos com MeOH: H₂O 10:90 (v/v) e foi prosseguido conforme o item anterior (item 4.4.3).

Também foi avaliada a extração direta, sem uso de SPE, onde 10 mg de biomassa seca foram ressuspensos em 1 mL de MeOH: H₂O 70:30 (v/v). As amostras foram sonicadas em ultrassom com probe e centrifugadas. Parte da amostra foi injetada em LC-MS de forma direta, e outra parte foi filtrada e injetada em LC-MS na sequência, para avaliar se o filtro retém os compostos, conforme procedimento do item 4.4.3.

4.4.5 Cromatografia em coluna ou extração em fase sólida (SPE)

Foram preparadas duas amostras com aproximadamente 300 mg de biomassa liofilizada e 5 mL de MeOH: H₂O 70:30 (v/v). As amostras foram submetidas à lise celular por ultrassom com probe e o processo foi repetido duas vezes. Uma delas foi direcionada para a coluna de sílica e a outra passou por centrifugação. Após a extração simples, o extrato bruto foi colocado cuidadosamente no topo da coluna de sílica.

Nos métodos de SPE na fase normal para cromatografia em coluna (CC), utilizando uma coluna de vidro de 18,75 x 2,00 cm. A coluna foi embalada com 10 g de sílica gel poro 60Å com partículas de 230-400µm (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) usando algodão na parte inferior e superior da coluna. A coluna foi

condicionada com MeOH 100 %, e depois inseriu-se a amostra na coluna e, em seguida, foram realizadas lavagens sequenciais com 30 mL de metanol de 10 a 100 % (MeOH:H₂O (v/v)). Posteriormente, todas as amostras foram secas no *Speed Vac*.

4.4.6 Extração líquido-líquido

Como uma tentativa de extrair os demais pigmentos da amostra, foram realizados métodos de extração líquido-líquido para avaliar a eficácia desta técnica para utilização nesta metodologia. Foi utilizada a mesma preparação do item 4.4.5 e foram testados alguns solventes diferentes: água, metanol e n-hexano.

Foram adicionados 10 mL de cada um destes solventes na amostra; o conjunto foi agitado manual e vigorosamente por 1 min e, em seguida, deixado em repouso para que ocorresse a decantação e/ou separação de fases. Os extratos foram secos e ressuspensos em 100 µL de MeOH:H₂O 50:50 (v/v) e injetados no LC-MS. Posteriormente, para testar outros solventes, foram preparadas alíquotas de 10 mg de biomassa seca e ressuspensas em 5 mL dos seguintes solventes: água, água + 0,1 % ácido fórmico, acetona: H₂O 90:10 (v/v) e diclorometano (DCM) 100%.

4.5 Padrão Interno

Após definição das condições cromatográficas ideais para identificação dos namalídeos e espumiginas, buscou-se por candidatos a padrão interno. A proposta inicial foi de utilizarmos uma nodularina modificada, devido sua similaridade química e fácil obtenção. Para realizar a modificação da nodularina, foram propostos 2 tipos de reações (reação 1 e 2) diferentes.

4.5.1 Reação 1

A primeira tentativa (reação 1) de modificar a nodularina deu-se utilizando a metodologia de Miles et al. (2003) na qual o padrão de nodularina (2 µg/mL - 10 µL) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) é misturado com tampão de bicarbonato de amônio (0,2 M, pH 9,2, 50 µL) e 2-Mercaptoethanol (1 µL) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). A reação foi acompanhada no LC-MS.

4.5.2 Reação 2

A reação 2, baseada no método de metilação, foi feita diluindo-se 5 µL do padrão de microcistina (YR) e 45 µL de trifluoreto de boro em MeOH (3-BF) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). A amostra foi misturada em vórtex e analisada por LC-MS (Miles et al, 2013; Puddick et al., 2016; De Oliveira, 2016).

4.5.3 Reação utilizando nodularinas (CENA 543)

Durante os testes para encontrarmos um padrão interno, foi utilizada a cepa CENA 543 devido a sua capacidade de produzir grandes quantidades de nodularina, a fim de evitarmos o consumo do padrão comercial desta. Para isso, foi realizada a mesma extração utilizada com a cepa ITEP-024, que consiste em ressuspender 10 mg de biomassa seca em 1 mL de ácido fórmico 0,1 %, seguida de secagem e ressuspensão em MeOH:H₂O 50:50 (v/v). Parte da amostra (50 µL) foi reduzida com borohidreto de sódio (50 µL) e injetada em LC-MS. Outra parte foi utilizada para realização da reação de adição de 3-BF (50 µL amostra + 50 µL 3-BF + 30 min de reação). Em seguida, foram adicionados mais 50 µL da solução de borohidreto para reduzir tudo. Na sequência, foram misturados

30 μ L desta amostra com 30 μ L de amostra da cepa ITEP-024 para verificar a interação entre elas.

4.6 Comparação de resultados com a etapa de *clean-up*

Foi realizado um teste simples de comparação de perdas que ocorreram durante a etapa de *clean-up* durante a extração por SPE. Assim, comparamos o rendimento de uma amostra que passou apenas pelo processo de extração com o rendimento que foi extraída e passou por *clean-up* com SPE.

4.7 Teste de diferentes padrões internos

Outros compostos foram testados como padrão interno (PI) a fim de verificarmos se havia melhora na resposta do equipamento (LC-MS). A Tabela 5 apresenta a relação entre eles.

Tabela 5: Características dos padrões internos utilizados no teste.

PI	MM (g/mol)	Massa (mg)	Solvente (mL)	Marca
Nodularina Modificada	839	N/A	1 mL MeOH: H ₂ O 50:50 (v/v)	CENA 543/
Aciclovir	225,2	10,71	10 mL H ₂ O+AcF 0,1 %: MeOH (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich

N-alfa-para-tosyl-L-arginina metil éster	378,87	5	1 mL MeOH: H ₂ O (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich
L-tryptophan-d5	209,26	5	1 mL MeOH: H ₂ O (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich
Melatonin-d4	236,30	5	1 mL MeOH: H ₂ O (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich
N-hyppuriyl-His-Leu hydratade	447,5/ 429,5 (sem hidratação)	3	1,5 mL MeOH: H ₂ O (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich
N-succinil-Gly-Gly-Fe-p-nitroanilida	499,97	3	1,5 mL MeOH: H ₂ O (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich
Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida acetate salt	662,7/ 602,7 (sem acetato)	3	1 mL MeOH: H ₂ O (50:50) (v/v)	Sigma-Aldrich

N/A = não se aplica.

A amostra da cepa ITEP-024 foi preparada utilizando-se 20 mg de células liofilizadas ressuspendidas em 2 mL de ácido fórmico 0,1 %. A extração foi realizada seguindo os métodos do item 4.4.3. Após secagem no *Speed Vac*, as amostras foram ressuspendidas em 0,5 mL de MeOH:H₂O 50:50 (v/v). Foram preparados 2 tipos de amostra, uma “normal”, sem sofrer redução, e uma amostra reduzida preparada com 50 µL da amostra ressuspendida final e 50 µL de uma solução saturada de NaBH₄. As

amostras finais foram preparadas misturando 30 µL das amostras da cepa ITEP 024 (normal e reduzida) e 20 µL da solução final do PI. Além disso, foram realizados testes com diferentes energias de colisão para avaliar a fragmentação destes compostos. Além disso, outro teste foi realizado com as amostras, que consiste na verificação da estabilidade destas soluções de acordo com o tempo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de biomassa da cepa ITEP-024 (*Sphaerospermopsis torques-reginae*) e CENA 543 (*Nostoc sp.*)

Em todo o processo de cultivo da cepa ITEP-024 de *S. torques-reginae*, foram produzidos aproximadamente 25 g de biomassa liofilizada. Para a cepa CENA 543 *Nostoc sp.*, foram obtidos cerca de 5 g de biomassa liofilizada.

5.2 Testes iniciais com espectrometria de massas (MS)

A literatura existente sobre espumiginas e namalídeos é muito escassa. São classes de compostos peptídicos recentemente descobertas (Fujii et al., 1997; Sanz et al., 2017) e que, portanto, são pouco conhecidas. Diante disso, partiu-se de uma estratégia um pouco diferente para conseguir analisar estes compostos inicialmente. A estratégia utilizada foi o mimetismo de compostos. A classe de microcistinas, peptídeos também produzidos por cianobactérias, são muito bem caracterizadas e estudadas, com uma vasta literatura presente (Miles et al, 2013; Puddick et al., 2016; De Oliveira, 2016). Desta forma, foi testado um método de quantificação de microcistina, para avaliar sua viabilidade no equipamento LC-MS descrito anteriormente. Como são compostos com características

físico-químicas similares, era esperado que se comportassem de maneira parecida na cromatografia líquida.

Sendo assim, foi realizado o preparo e a injeção de um mix de padrões de microcistinas (MC-LA, LR, RR e YR) e nodularina, justamente para realizar essa primeira avaliação e foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 5. É possível observar cinco picos bem definidos e que apresentam boa separação entre eles, mostrando que o método é adequado às nossas condições laboratoriais, uma vez que reproduziu os resultados do artigo utilizado como referência (Sanz et al. 2017). A Tabela 6 especifica cada pico.

Figura 5: Cromatograma com os picos de microcistinas e nodularina.

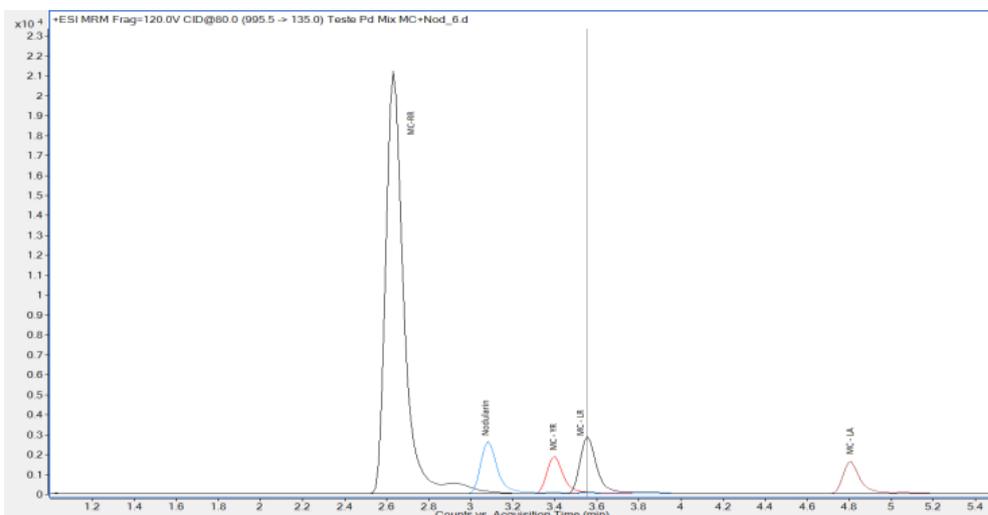


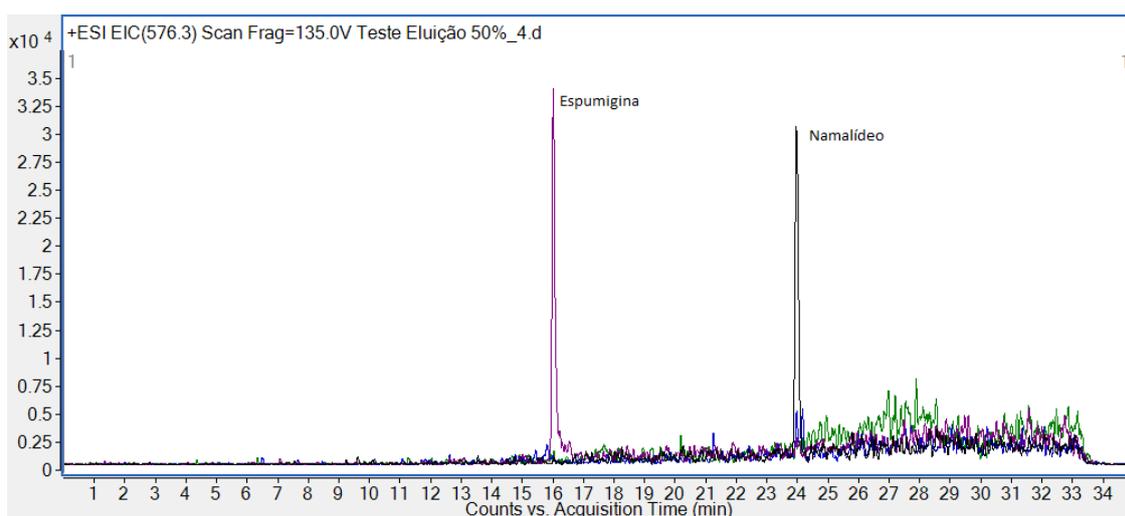
Tabela 6: Características dos picos dos padrões de microcistinas e nodularina.

Padrão	<i>m/z</i>	Tempo de retenção
Microcistina YR	1045,5	3,4

Microcistina LR	995,5	3,6
Microcistina LA	910,5	4,8
Microcistina RR	519,9	2,6
Nodularina	825,0	3,1

Uma vez que o método se mostrou efetivo para microcistinas e nodularina, a etapa seguinte foi realizar a análise de umas amostras da cepa ITEP-024 para avaliar o comportamento cromatográfico dos compostos de interesse. Desta forma, foram avaliados como espumiginas e namalídeos poderiam ser encontrados e se estes seriam detectados. Na Figura 6, é possível observar o cromatograma no modo Scan da amostra.

Figura 6: Cromatograma obtido por LC-MS em modo Scan para identificação de namalídeos e espumiginas.

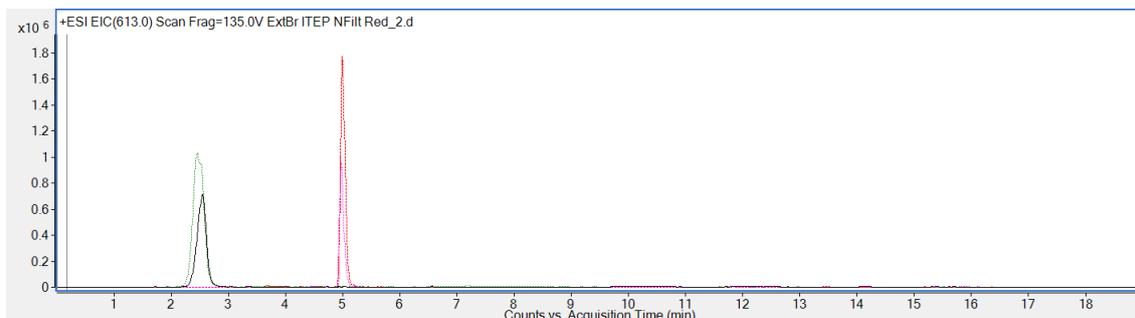


Os namalídeos conseguem aparecer sem prévio tratamento enquanto as espumiginas precisam sofrer um processo de redução para se tornar estável para o espectrômetro de massas (Sanz et al., 2015). Mesmo com esta etapa a mais, a extração com ultrassom por probe é eficaz para extrair os compostos de interesse. No entanto, microrganismos apresentam uma complexidade metabólica enorme, e desta forma, algumas etapas de purificação (*clean up*) seriam necessárias, com a finalidade de obter os compostos mais puros possíveis para se utilizar no processo de validação analítica.

5.3 Testes de filtração

Foram realizados testes de filtração para avaliar se o uso do filtro teria impacto na concentração final dos compostos analisados. Os resultados mostraram que houve perdas no processo e consequentemente de namalídeos e espumiginas, sendo de aproximadamente 10% de redução para namalídeos e 18% para espumiginas, indicando que ocorreu sim perda na filtração (Figura 7).

Figura 7: Comparação entre os cromatogramas de namalídeos (vermelho - filtrado; rosa - não filtrado) e espumiginas (verde - filtrado; preto - não filtrado) de uma amostra da cepa ITEP-024 com filtro de seringa de 0,22 µm.



5.4 Testes de extração

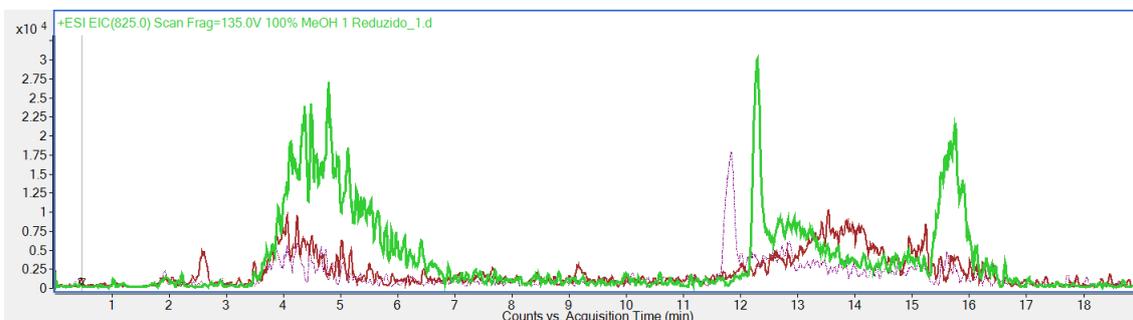
5.4.1 Extração exploratória por SPE

Um dos métodos de extração/separação mais utilizados na área de toxicologia é a técnica por extração em fase sólida (SPE), onde uma fase estacionária, geralmente sílica, é usada para separar os componentes. A SPE é uma técnica adequada para um metodologias exploratórias devido à pequena quantidade de amostra usada, assim como de fase móvel, além de uma variedade enorme de fases estacionárias, se adequando às suas necessidades analíticas. Nos experimentos, foram testados alguns tipos de cartuchos de SPE para avaliar qual apresentaria melhor resolução e separação dos compostos estudados.

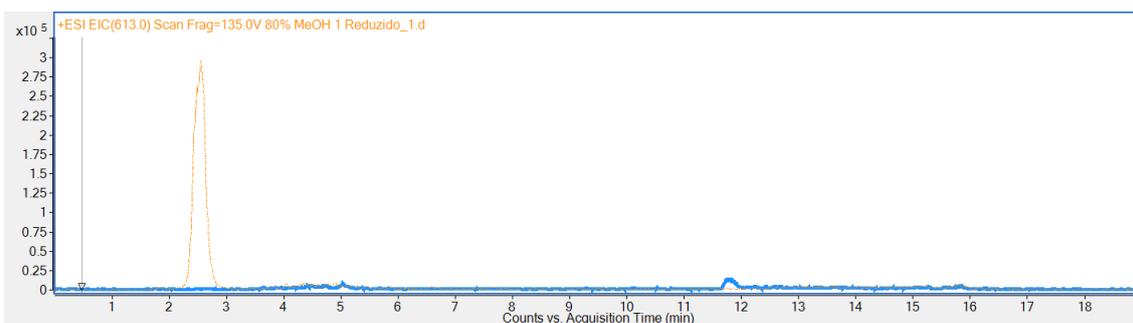
5.4.2 Extração exploratória por SPE - Cartucho 1

Os resultados de extração por SPE com o cartucho 1 são apresentados na Figura 8A. Com a extração da cepa ITEP 024 com MeOH 100 %, não foi eluído nenhum composto de interesse nesta fração, mostrando que essa solução extratora não é adequada para extração e detecção de namalídeos e espumiginas. Com MeOH: H₂O 80:20 (v/v) (Figura 8B) e MeOH: H₂O 60:40 (v/v) (Figura 8C), as espumiginas saíram nestas frações, no entanto, os namalídeos não foram detectados. Analisando um extrato com MeOH: H₂O 40:60 (v/v) (Figura 8D), os namalídeos foram detectados, mas desta vez, não foi possível detectar as espumiginas. Em MeOH: H₂O 20:80 (v/v), é possível observar que ambos os compostos já haviam sido eluídos (Figura 8E).

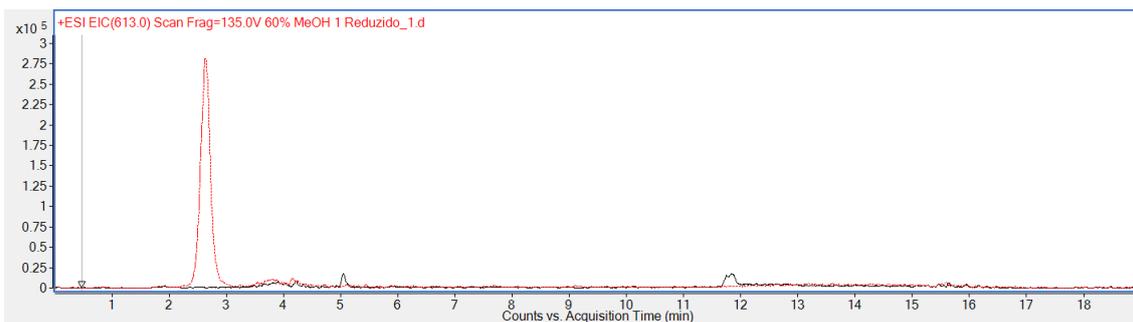
Figura 8: Cromatograma dos extratos da cepa ITEP-024 com SPE (cartucho 1) foram analisados com 100 % (a), 80 % (b), 60 % (c), 40 % (d) e 20 % (e) de MeOH:H₂O (v/v), buscando os compostos em ambas as relações de *m/z* de 576 e 613.



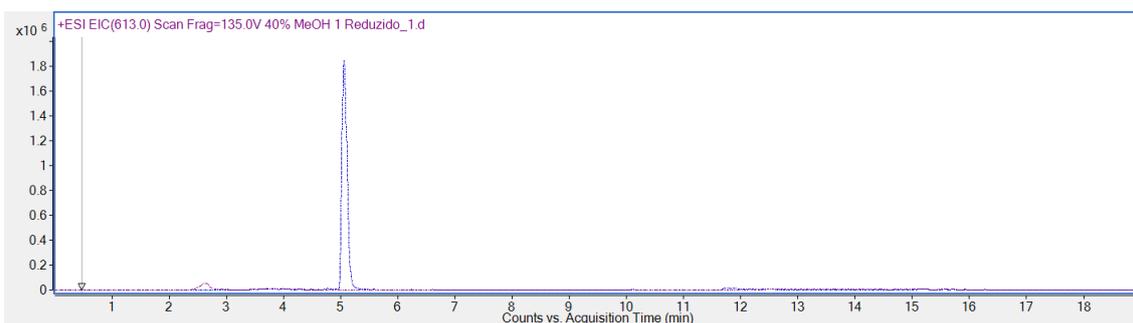
(a)



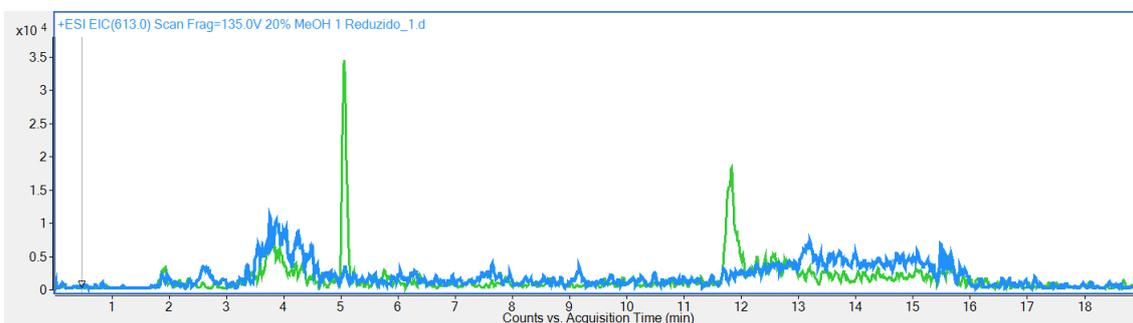
(b)



(c)



(d)

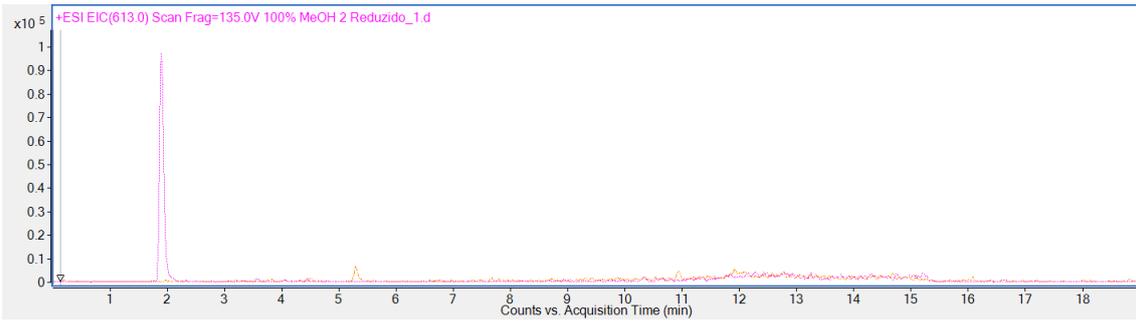


(e)

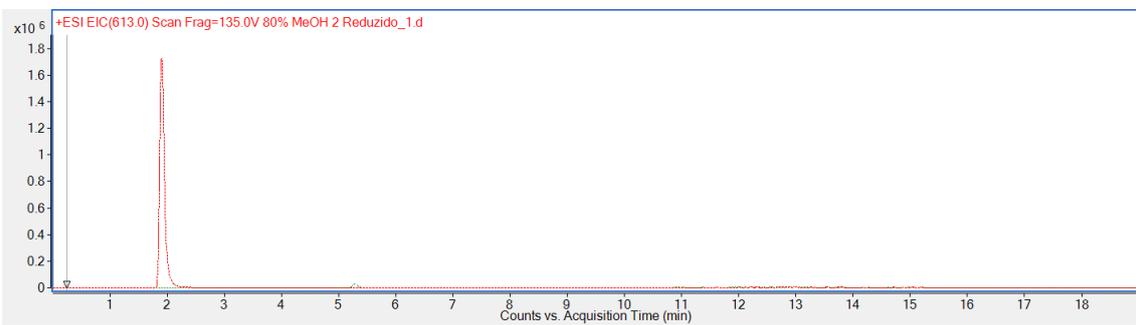
5.4.4 Extração exploratória por SPE - Cartucho 2

Foi analisado um segundo cartucho (2), com as mesmas frações de MeOH: H₂O (v/v) (100 - 20 %) utilizados com o cartucho 1. Com 100 % (Figura 9A), 80 % (Figura 9B) e 60 % (Figura 9C) de MeOH, apenas as espumiginas foram detectadas. Com 40 % (Figura 9D) e 20 % (Figura 9E) de MeOH: H₂O (v/v), os namalídeos começaram a sair nestas frações, mas não mais as espumiginas.

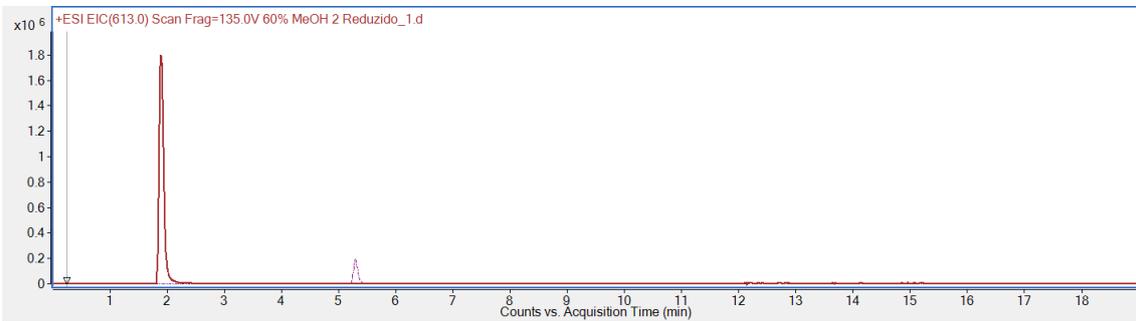
Figura 9: Cromatograma dos extratos da cepa ITEP 024 com SPE (cartucho 2) foram analisados com 100 % (A), 80 % (B), 60 % (C), 40 % (D) e 20 % (E) de MeOH: H₂O (v/v), buscando os compostos em ambas as relações de m/z de 576 e 613.



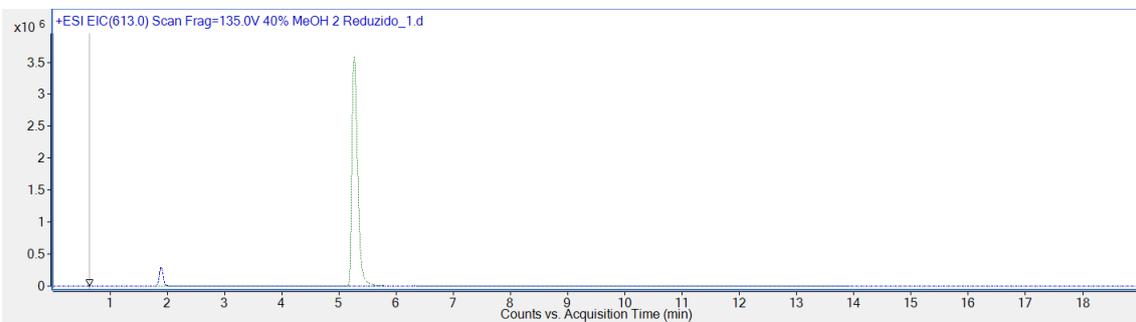
(a)



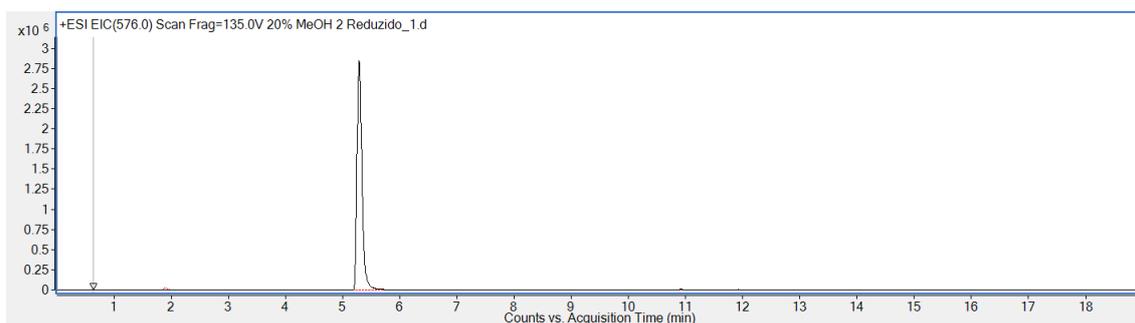
(b)



(c)



(d)



(e)

O cartucho 3 não apresentou resultados porque não foi possível terminar de realizar os processos de SPE, porque houve entupimento do cartucho, mesmo seguindo o processo de centrifugação prévia das amostras para diminuir materiais particulados. Provavelmente o sobrenadante tinha muita afinidade pelo conteúdo dos cartuchos (base sílica modificada) e os entupiu (Matuszewski et al., 2003; Fontes, 2010). Esse procedimento foi repetido, para verificar se era um problema de preparo, mas aconteceu a mesma coisa e, portanto, não foram considerados para os resultados.

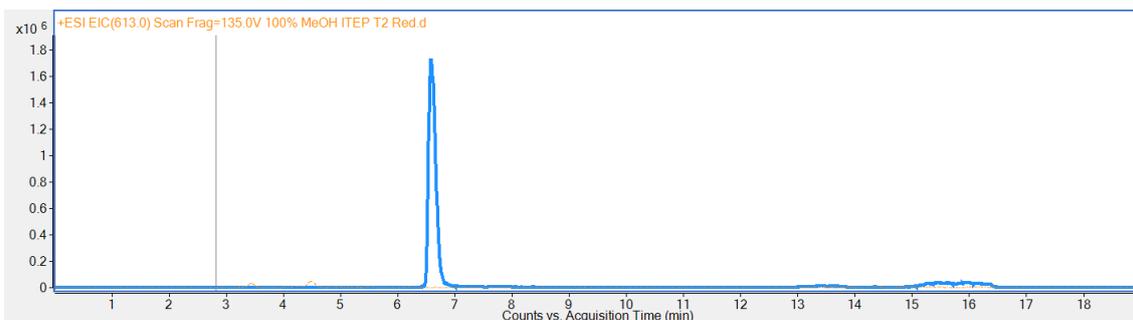
Pelos resultados obtidos, não houveram resultados cromatográficos diferentes entre os dois tipos de cartucho de SPE. Os resultados são parecidos com os obtidos no trabalho de Sanz et al. (2015). Os namalídeos saem preferencialmente nas frações com maior quantidade de água, enquanto as espumiginas saíram nas frações mais metanólicas. Mas neste momento, começou a surgir um problema técnico, para se fazer a validação analítica, seria necessária uma quantidade considerável destes compostos isolados, mas uma das vantagens da SPE, que seria a baixa quantidade de amostra utilizada, acabou se tornando uma desvantagem. Seria necessário fazer um processo de *scale up* da técnica para que se tornasse algo mais produtivo e eficaz. Então o processo natural nos levou a

testar a cromatografia em coluna que seria usada para um *clean-up* das mesmas, assim como a SPE.

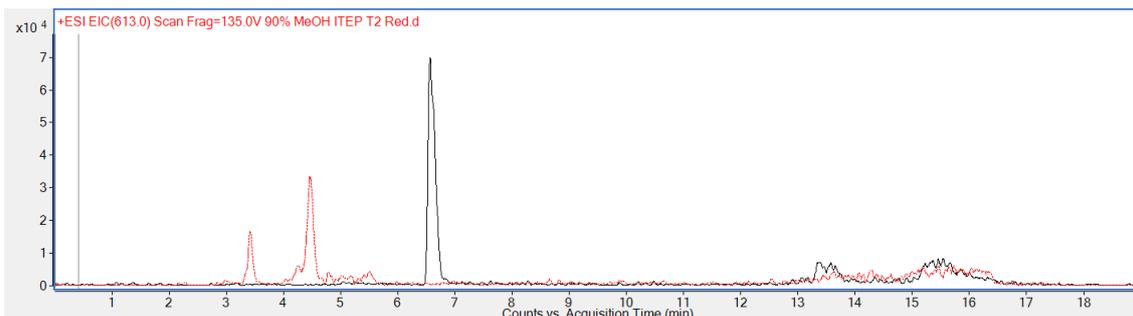
5.4.5 Cromatografia em coluna

Como dito anteriormente, a cromatografia em coluna é um tipo de *scale-up* da SPE, onde podemos processar uma maior quantidade de amostras ao mesmo tempo, além de aumentar a eficiência da separação porque foi usada uma maior quantidade de sílica, conforme a necessidade. Na Figura 10, é possível observar os cromatogramas referentes às frações coletadas com 100 % (A), 90 % (B) e 80 % (C) de MeOH: H₂O (v/v).

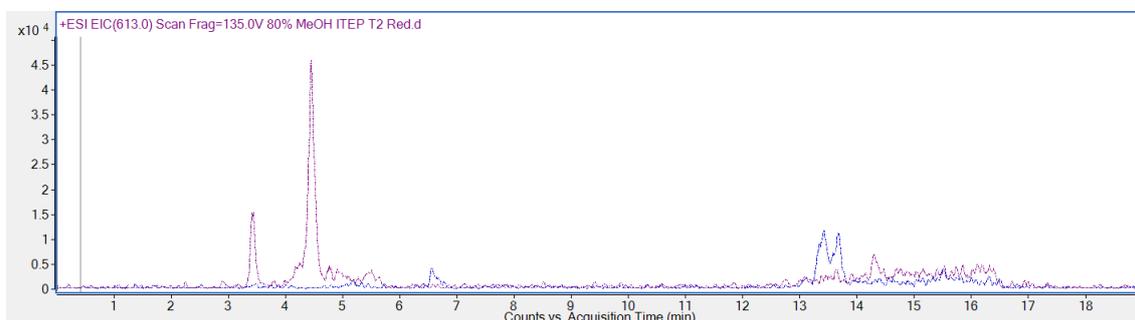
Figura 10: Biomassa da cepa ITEP-024 em cromatografia em coluna, em diferentes frações de MeOH: H₂O (v/v): 100 % (A), 90 % (B) e 80 % (C); buscando os compostos em ambas as relações de m/z de 576 e 613.



(a)



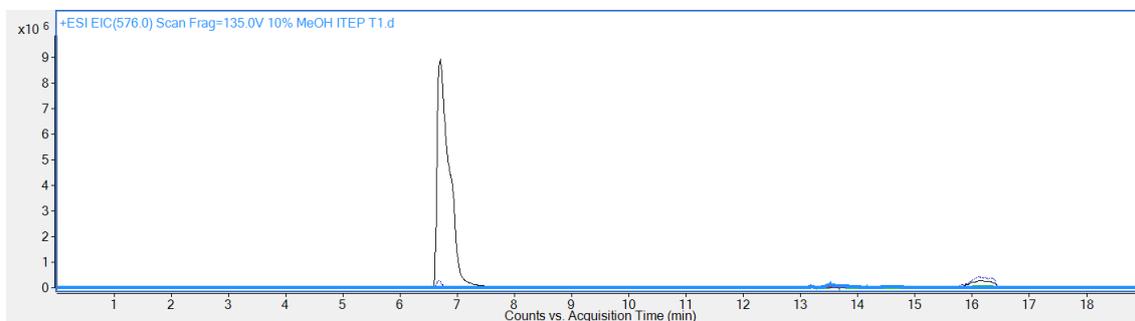
(b)



(c)

Como podemos ver pelos resultados, não houve separação dos compostos de interesse, sendo eluídos na primeira fração, de 100 % metanol. As demais frações depois de 80 % MeOH: H₂O (v/v), apresentam traços, quando presentes, que se confundem com a linha de base. Ao analisar a Figura 11, fica evidente que praticamente todos os compostos de interesse são eluídos na primeira fração, podendo ser considerada quase desprezível as quantidades nas demais frações.

Figura 11: Comparativo de intensidade de picos em amostra da cepa ITEP-024 entre as 3 primeiras frações.

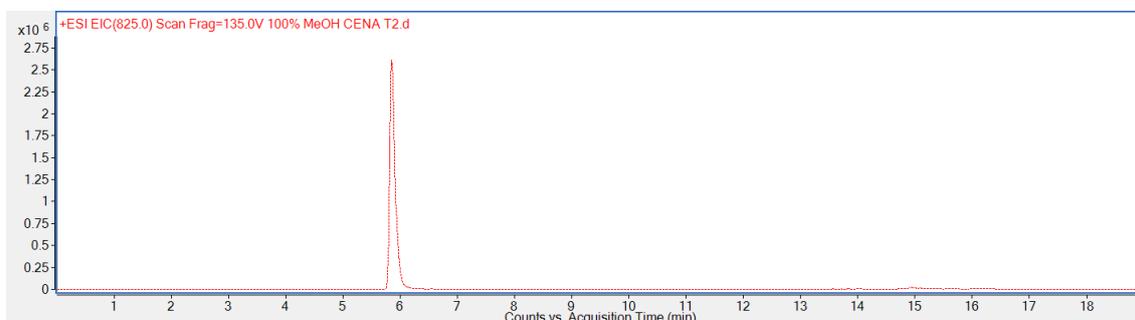


Analisando de forma global, acabou que esta etapa de *clean up*, não atingiu o efeito desejado porque a ideia de fazer um processo de purificação em que as perdas fossem mínimas não foi possível. Não se mostraram com um bom custo-benefício para o método, porque o tempo e custos foram demais para poucos benefícios. Além disso, considerando a mentalidade de toxicologia verde, estas perdas podem ser consideradas críticas, porque não se ainda o real potencial toxicológico destas substâncias, então quanto menor as perdas e descartes desnecessários, melhor para este modelo sustentável.

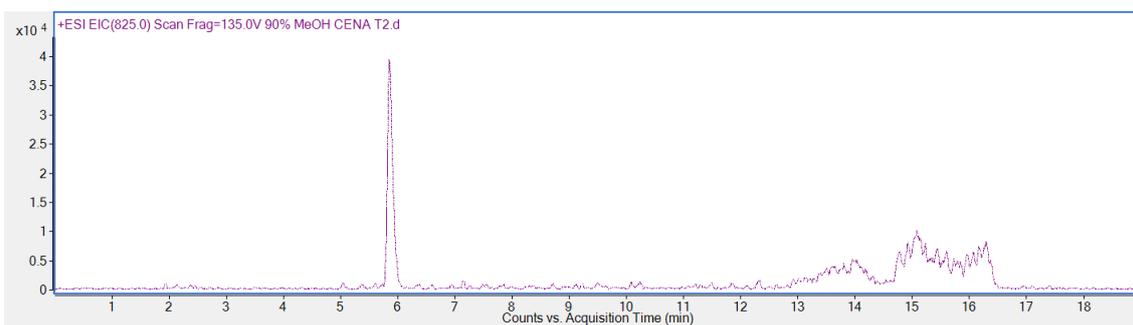
5.4.6 Cromatografia em coluna - CENA 543

Mantendo a ideia de padrão interno, foi realizado esse procedimento para ver se conseguia purificar as nodularinas produzidas a partir da cepa CENA 543, porque ela seria usada como uma candidata de PI para o experimento. Assim, uma amostra foi submetida ao mesmo procedimento que a ITEP-024. Abaixo, a Figura 12 apresenta os resultados deste protocolo com frações de 100 % (A), 90 % (B) e 80 % (C) MeOH: H₂O (v/v).

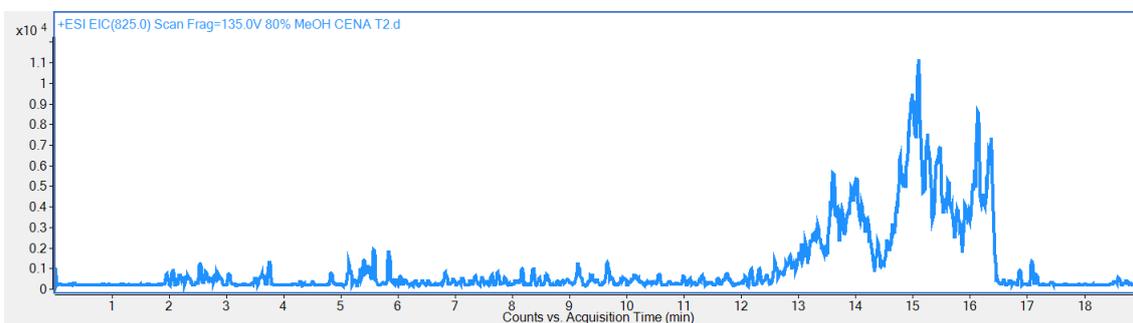
Figura 12: Cromatograma do extrato da cepa CENA 543 com 100 % (A), 90 % (B) e 80 % (C) de MeOH: H₂O (v/v).



(a)



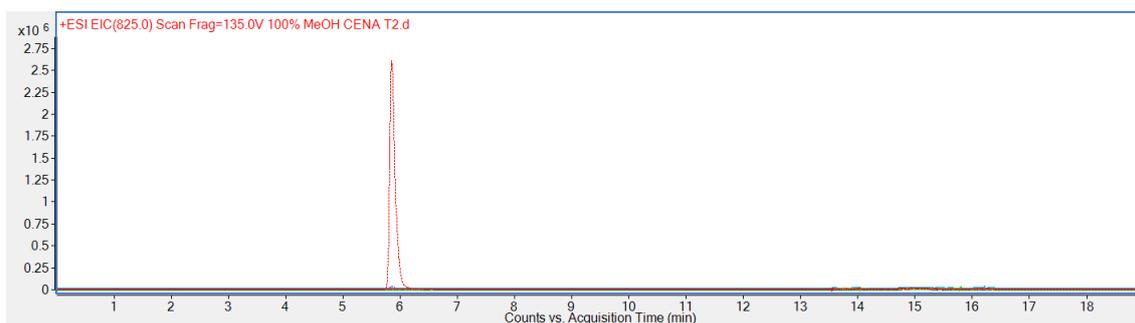
(b)



(c)

Novamente, como foi descrito no item anterior, praticamente toda a nodularina foi extraída (saiu) na fração de 100 % de MeOH e nas demais, se existir, são traços que se confundem com a linha de base do equipamento. A Figura 13, mostra este comparativo visual destes resultados.

Figura 13: Comparativo de intensidade de picos em amostra de CENA entre as 3 primeiras frações.

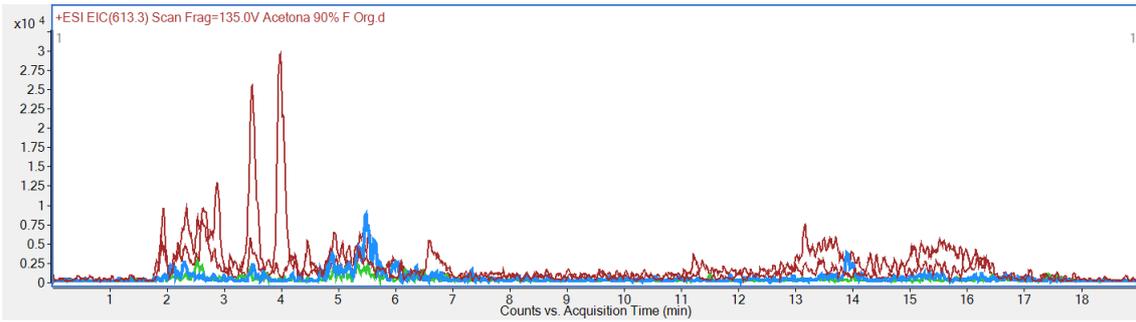


Como discutido anteriormente, chegamos à conclusão de que a extração direta da biomassa evita perdas e ajuda na obtenção dos compostos de interesse.

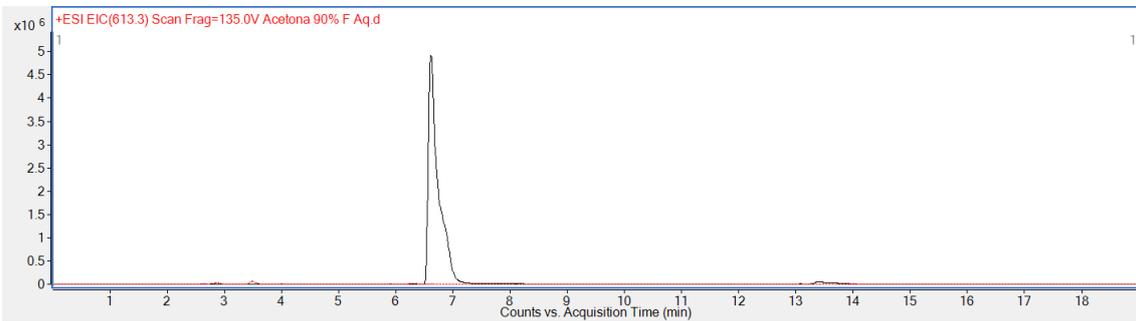
5.4.7 Extração líquido-líquido

Na tentativa de retirar pigmentos e purificar minimamente os compostos de interesse, realizou-se uma etapa de extração líquido-líquido a fim de obter uma amostra com menos contaminantes. Em uma pequena quantidade amostra foram usados diferentes tipos de solventes (exploratório; Figura 14) e analisados no LC-MS, ao mesmo tempo, que os resíduos destas extrações foram ressuspensos com MeOH: H₂O 50:50 (v/v) (base), líquido extrator mais próximo do ideal, e extraídos para verificar o que sobrava no precipitado.

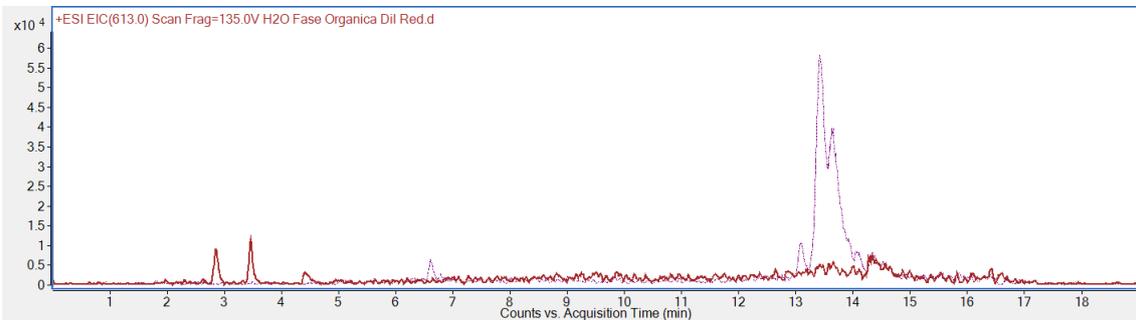
Figura 14: Etapa exploratória com acetona 90 % (A), base com acetona 90 % (B), exploratória com água (C), base com água (D), exploratória com água acidificada (E), exploratória com diclorometano (F) e base com diclorometano (G).



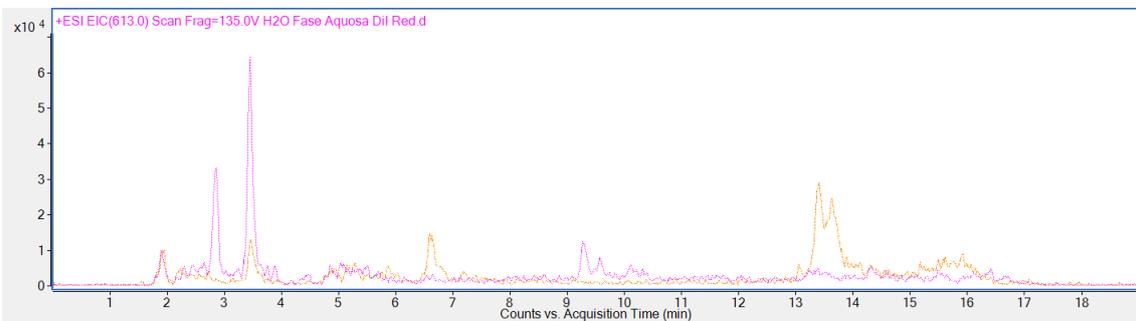
(a)



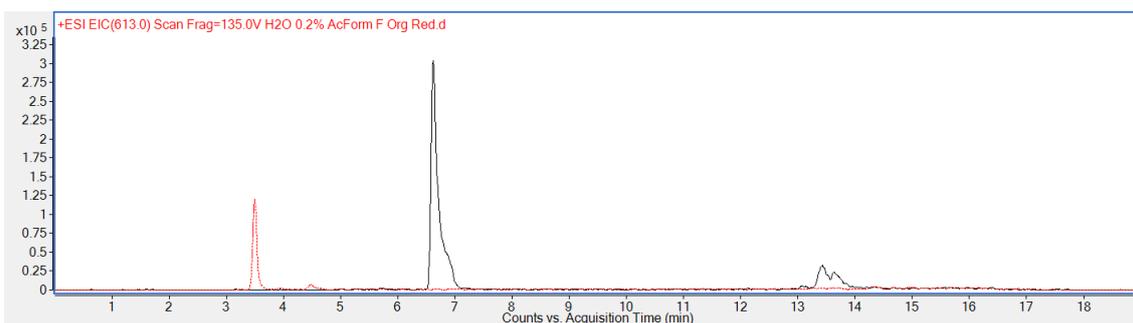
(b)



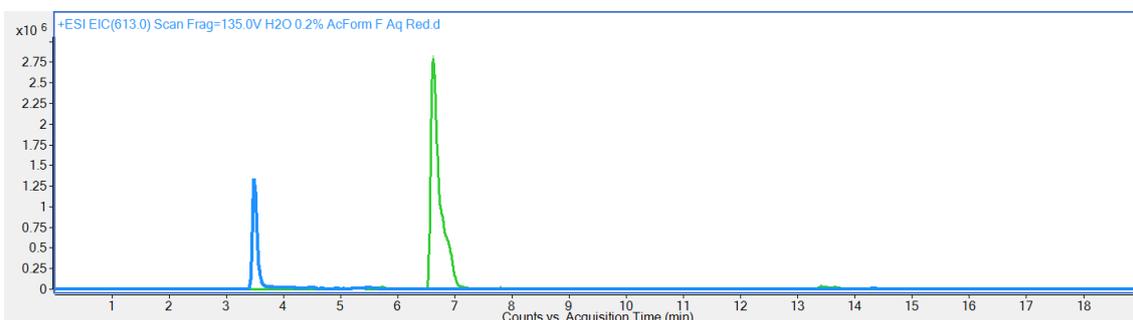
(c)



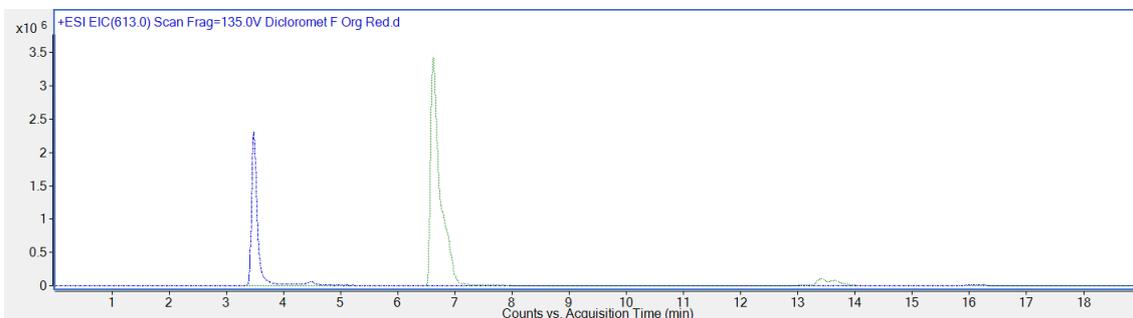
(d)



(e)



(f)



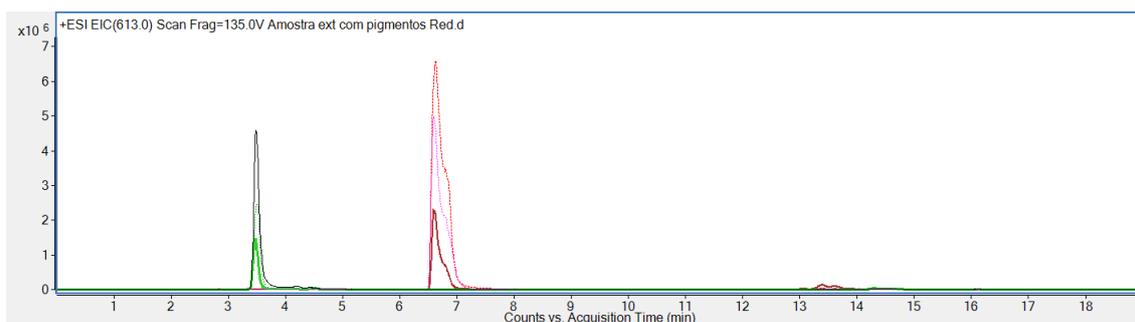
(g)

Pelos resultados mostrados acima podemos tirar algumas conclusões. Tanto a água acidificada como o diclorometano extraem igualmente os compostos estudados, sendo eficaz em ambas as etapas. Acetona 90 % e água não são eficazes para primeira extração, porque praticamente nada é obtido na etapa exploratória e praticamente tudo é encontrado na etapa base. Mas a escolha mais adequada entre os dois primeiros é a água acidificada por ser menos tóxica e mais adequada ao uso no LC-MS.

5.4.8 Extração líquido-líquido - Retirada de pigmentos

Novamente foi realizada uma comparação entre as perdas que acontecem entre fazer esta extração líquido-líquido e a extração direta. A Figura 15 mostra estes resultados.

Figura 15: Comparativo entre a extração direta e extração de pigmentos entre os cromatogramas de namalídeos (vermelho - pigmento; rosa - direto) e espumiginas (verde - pigmento; preto - direto).



É observado que ocorrem perdas consideráveis ao realizar esta etapa de purificação. Como a ideia é reduzir ao máximo estas perdas, viu-se que se torna uma etapa desnecessária para o processo, continuam a ser preferíveis fazer uma extração direta e injetar.

5.5 Avaliação da energia de colisão

Nesta etapa de desenvolvimento do método, é necessário avaliar como os compostos de interesse se comportam com eles. E uma das variáveis que podemos avaliar, especificamente na parte analítica da espectrometria de massas, consiste na avaliação de

que forma a energia de colisão na célula de colisão, dentro do espectro de massas do tipo triplo quadrupolo, afeta a fragmentação das moléculas. Uma energia adequada é quando consegue-se manter a m/z base do composto e gerar fragmentos característicos da molécula. Se a energia for muito alta, pode ocorrer uma fragmentação exagerada e consumir toda a molécula, ficando incapaz de determinar que moléculas mãe gerou tais fragmentos. Da mesma forma, energia muito baixa, não gera fragmentos e a espectrometria de massas perde sua funcionalidade. Abaixo as espectrometrias de massas de ambos os compostos, namalídeo e espumigina, com as variações de energia de colisão.

Como podemos ver pelos resultados, as espumiginas (Figura 16), por sofrerem um processo de redução, adquirem uma maior estabilidade frente a quebra pela energia de colisão, por isso foi necessário o maior valor de energia testado para gerar uma certa fragmentação da molécula. Diferentemente, o namalídeo (Figura 17) consegue sofrer fragmentação com energia menores, que pelos resultados, deve variar em torno de 8 a 15.

Figura 16: Comparativo entre diferentes energias de colisão no perfil de fragmentação da espumigina.

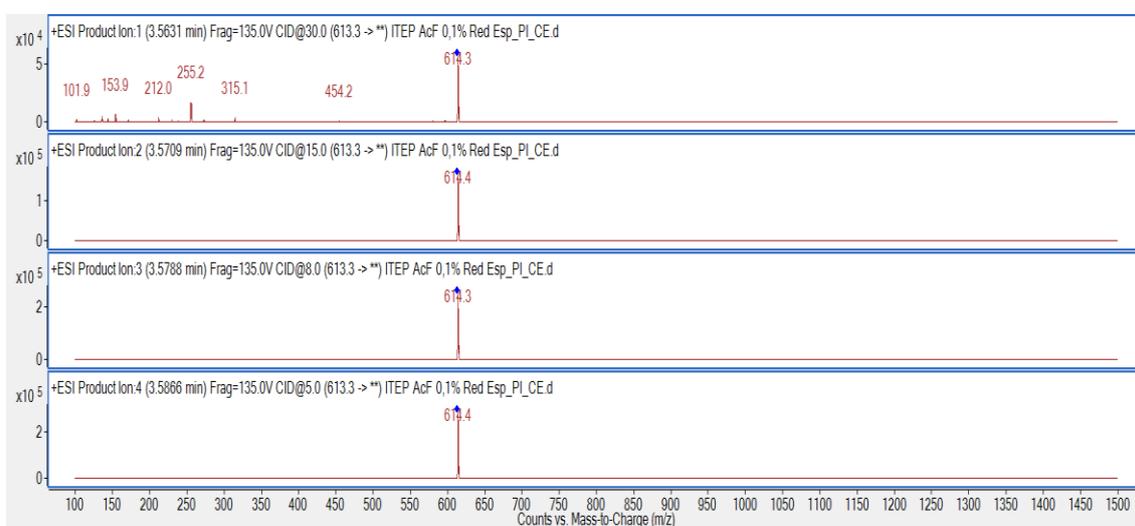
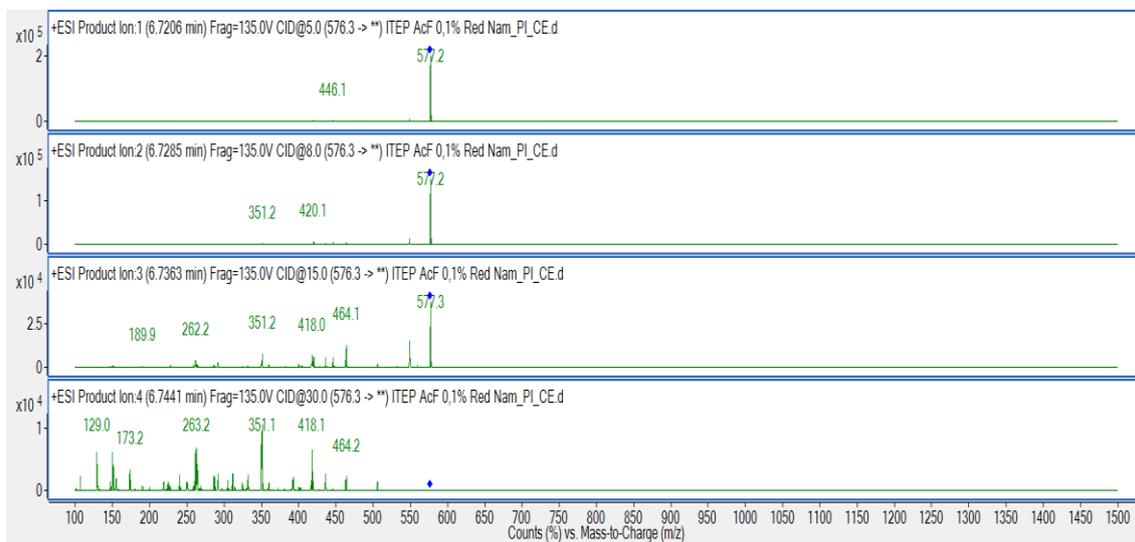


Figura 17: Comparativo entre diferentes energias de colisão no perfil de fragmentação do namalídeo.



5.6 Padrão Interno

Nesta etapa foram avaliados compostos que poderiam trazer benefícios para as análises cromatográficas, por terem comportamento físico-químicos semelhantes aos analitos e com isto teríamos uma melhor resposta cromatográfica. Os compostos utilizados nos testes para escolha do melhor PI estão apresentados na Tabela 5 do item 4.5 dos materiais e métodos.

5.6.1 Nodularina modificada

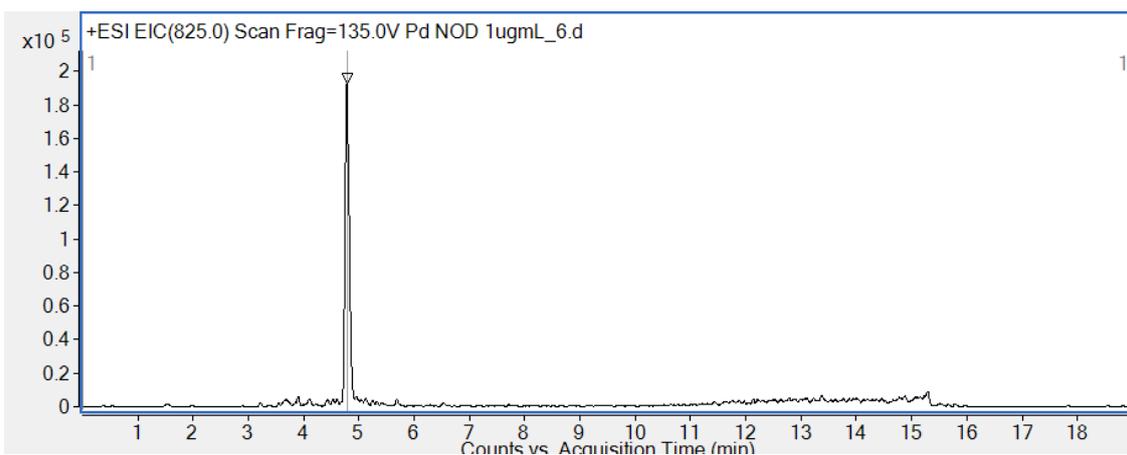
Inicialmente a ideia seria utilizar uma nodularina modificada como padrão interno. Este composto foi obtido realizando algumas reações de adição da molécula descritas nas reações i e ii dos seguintes itens.

5.6.1.1 Reação 1

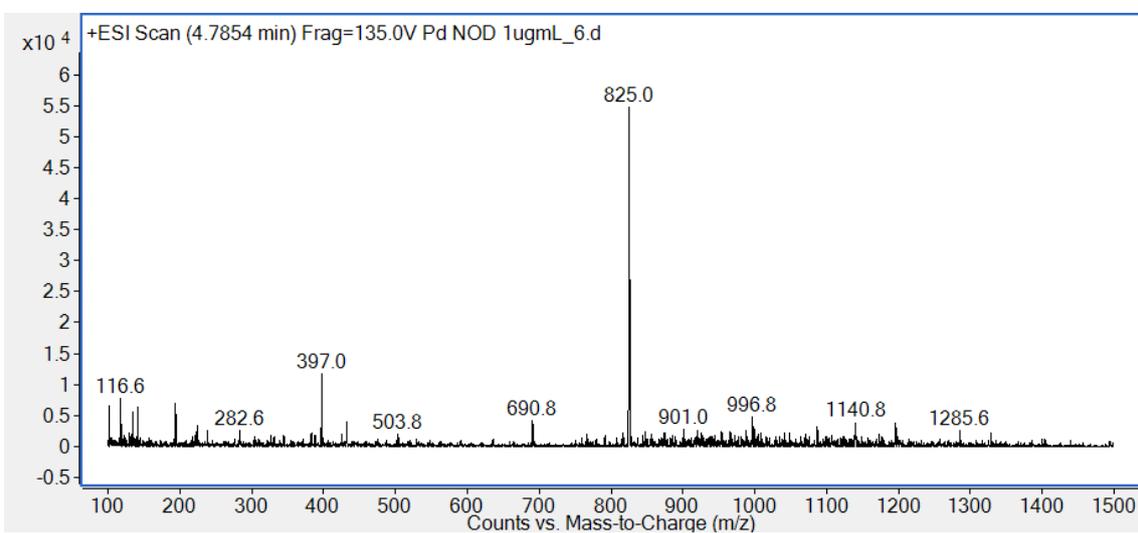
Essa mesma metodologia de modificação foi aplicada ao padrão de microcistina para servir de controle positivo, já que quase todas as metodologias encontradas modificam microcistinas e não nodularinas (Miles et al, 2013; Puddick et al., 2016; De Oliveira, 2016). Os resultados descritos na literatura, ou seja, o padrão de microcistina, reage rapidamente e é quase completamente consumido na reação química, entretanto, diferentemente, a nodularina praticamente não reage, apenas reagindo levemente após 36 h no vial enquanto a microcistina com 5 min já é possível observar os resultados (Figura 18).

Na Figura 18C, é possível observar o espectro de massas da nodularina após a reação 1, mostrando que não há formação de outro pico com massa aumentada em m/z de 78.

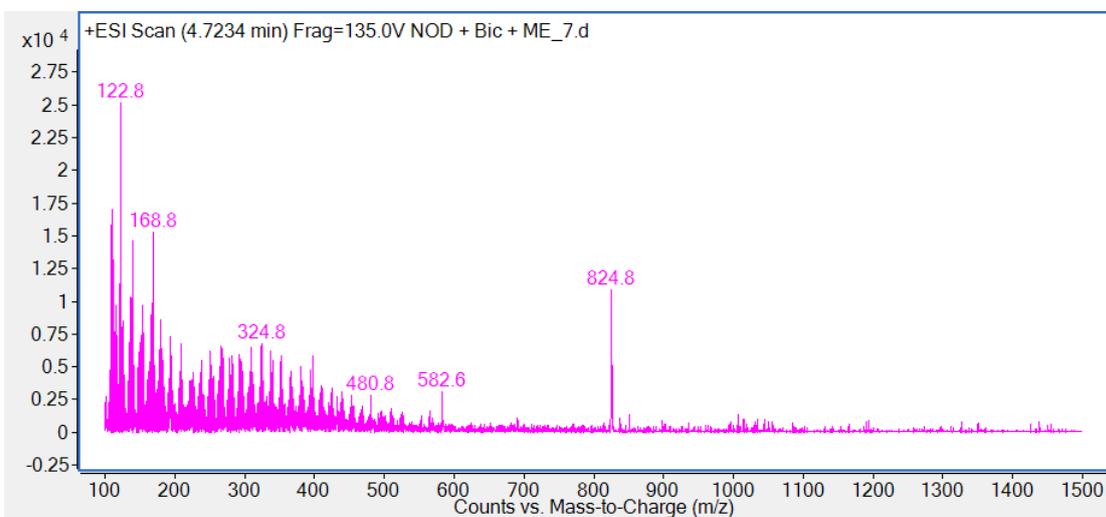
Figura 18: Cromatograma do padrão de nodularina (A); espectro de massas da nodularina (B) e espectro de massas da nodularina após a reação 1.



(a)



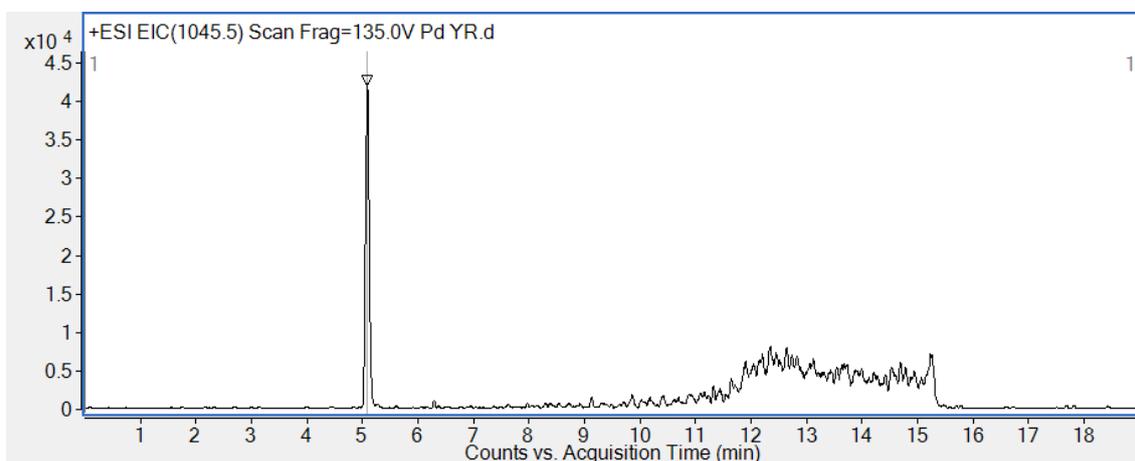
(b)



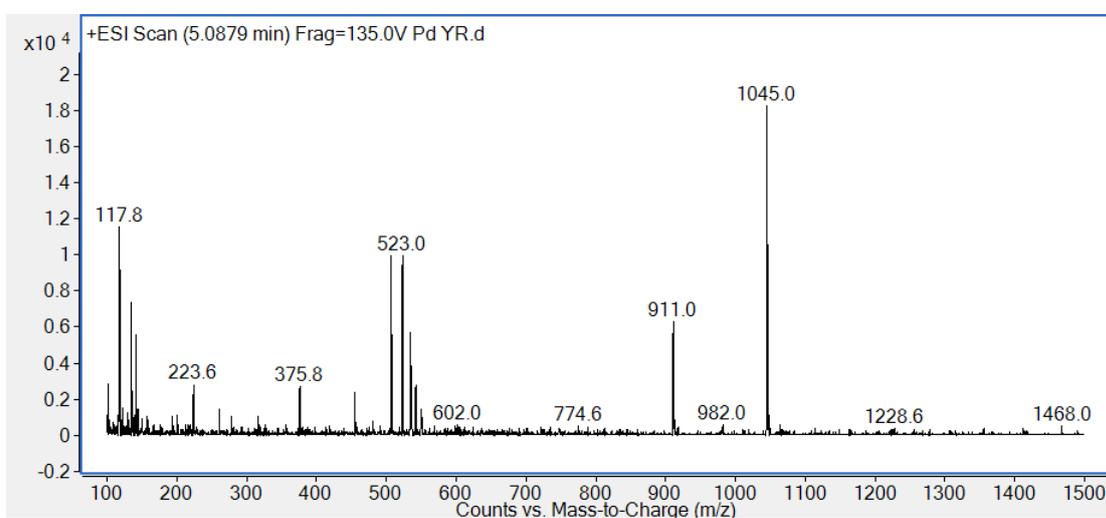
(c)

Na Figura 19, é possível observar os dados do padrão de microcistina YR utilizado como controle positivo da reação. É possível observar que o pico base da microcistina YR desaparece, mas há a formação de fragmentos m/z 1123 na mesma região.

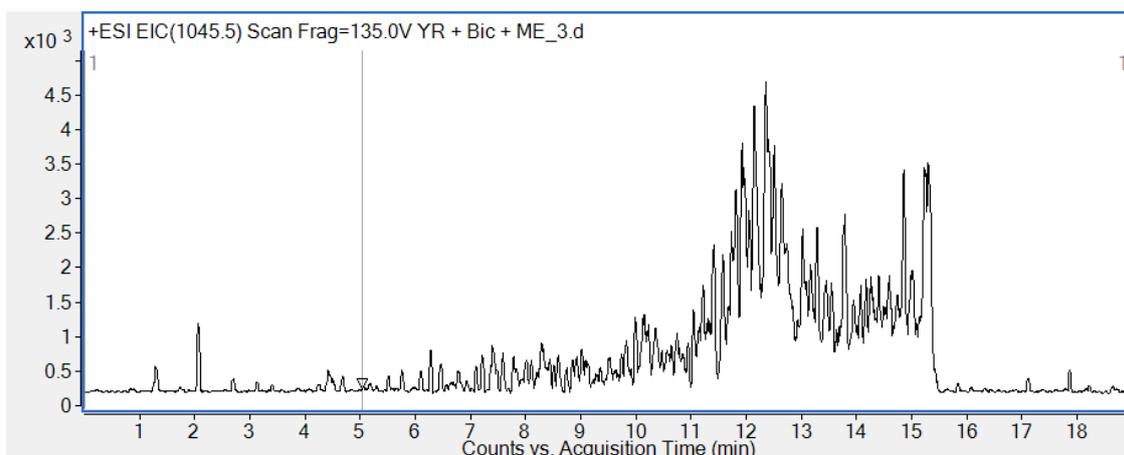
Figura 19: Cromatograma (A) e espectro de massas do padrão de microcistina YR (B) usado como controle positivo da reação (pico antes da reação). Cromatograma (C) e espectro de massas do padrão de microcistina YR (D) usado como controle positivo da reação, após a reação.



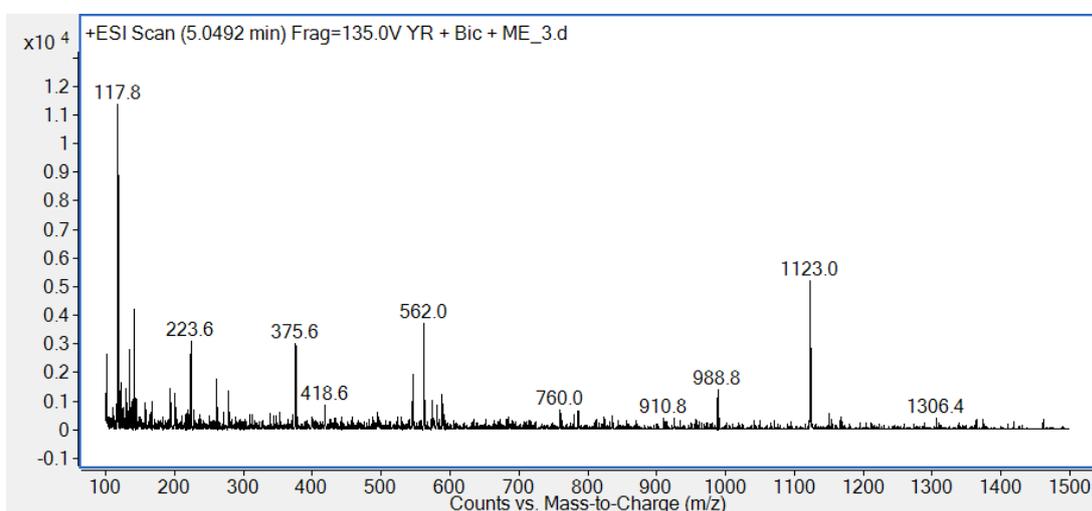
(a)



(b)



(c)



(d)

5.6.1.2 Reação 2

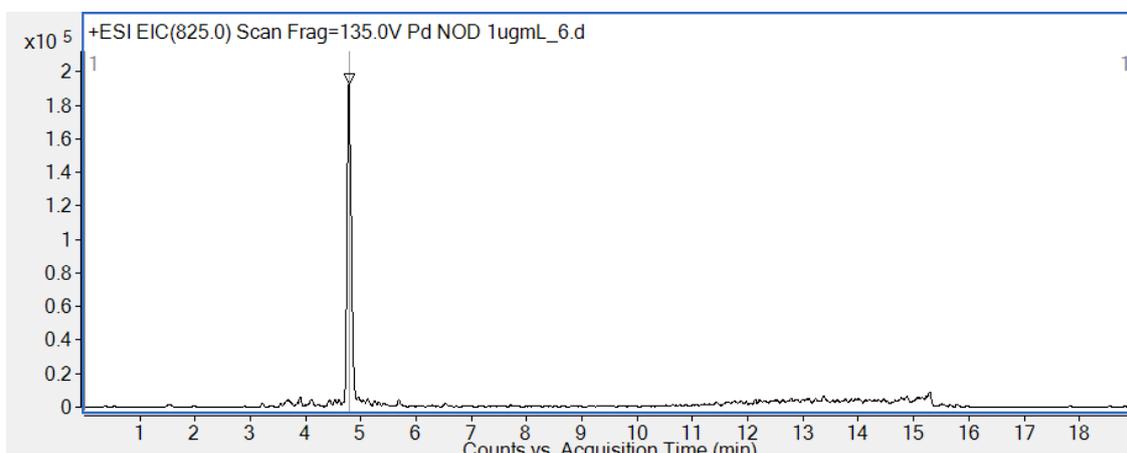
Como a primeira tentativa não foi bem-sucedida, foi testada uma nova metodologia baseada na metilação da nodularina (reação 2). A literatura mostra que os aminoácidos podem ser facilmente convertidos a ésteres metílicos quando reagidos com trifluoreto de boro em metanol (Miles et al, 2013; Puddick et al., 2016; De Oliveira, 2016). Foi visto pelos resultados que a reação de metilação foi bem realizada tanto na nodularina como no controle positivo com a microcistina. Também foi verificado que se

formaram compostos monometilados e dimetilados. Além disso, praticamente todo o padrão foi consumido mostrando que a reação é rápida e eficiente.

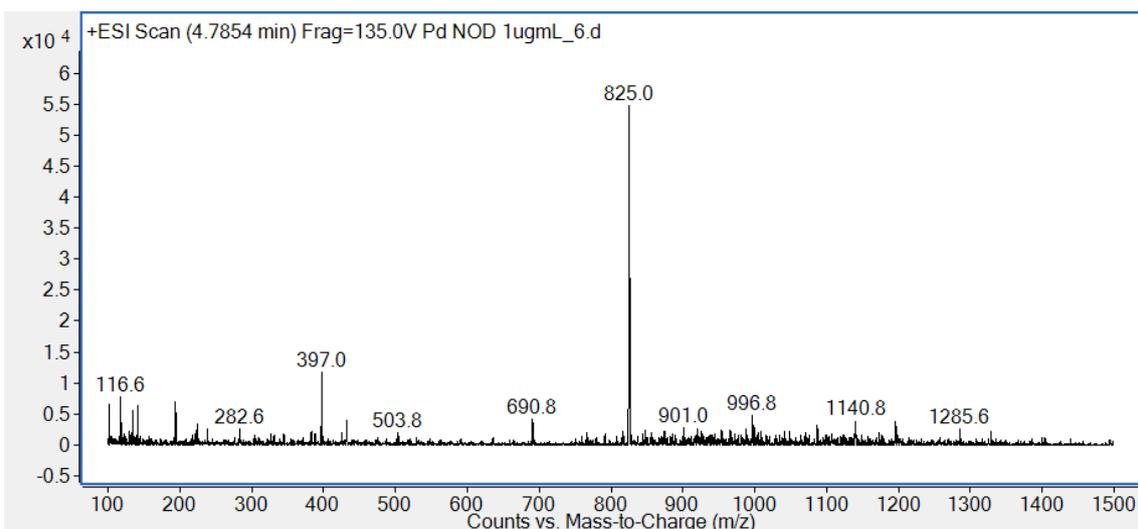
A escolha do PI deve ser considerando algum composto com similaridades químicas com o analito de interesse e que não esteja presente na amostra. Para isso, foi definida uma nodularina modificada devido às suas similaridades estruturais com os demais cianopeptídeos como as espumiginas, namalídeos e microcistinas. Para verificar se a nodularina seria aceitável para o método, foram realizados testes e se mostrou bem aceitável o padrão comercial de nodularina com as microcistinas.

Na Figura 20, estão os dados da nodularina utilizada na reação 2, mostrando o pico antes da reação.

Figura 20: Cromatograma (A) e espectro de massas (B) da nodularina usada na reação 2 (pico antes da reação).



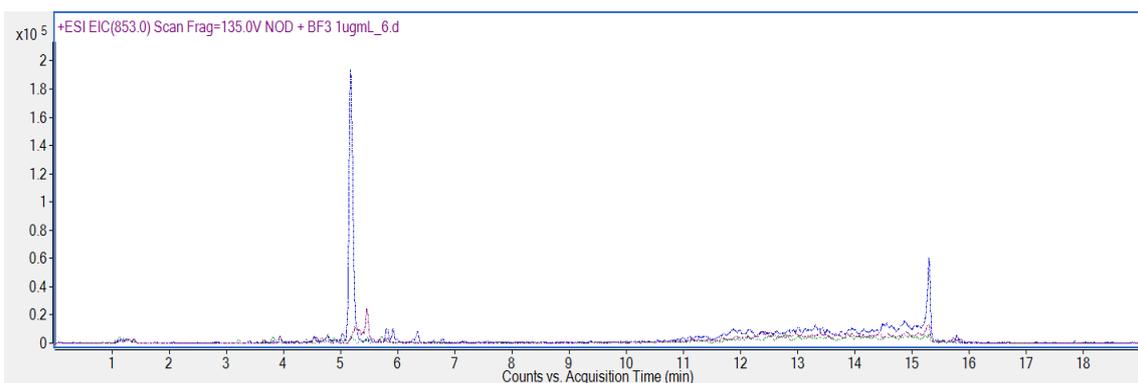
(a)



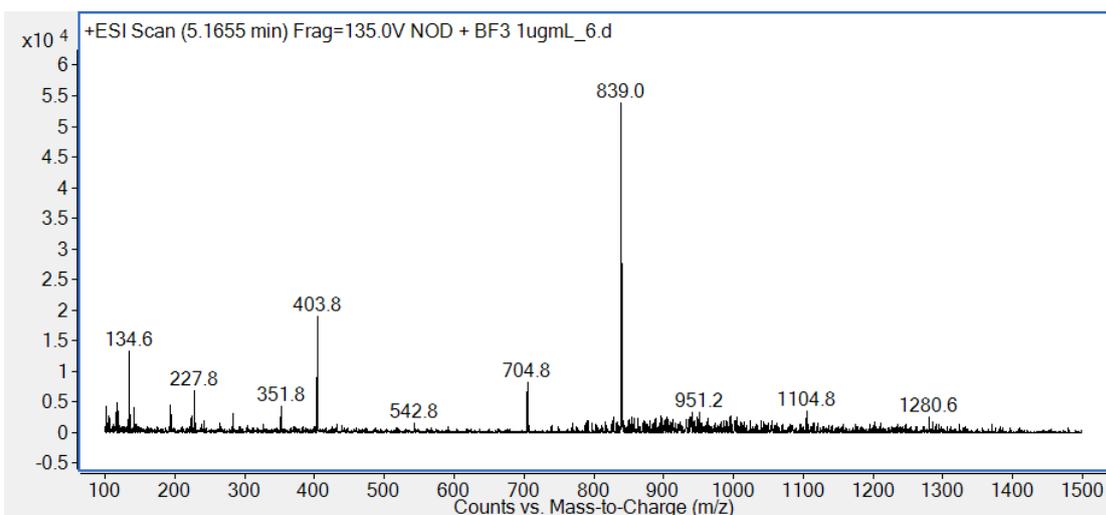
(b)

Na Figura 21, estão apresentados os dados de nodularina com os picos depois da reação 2 (m/z de 825, 839 e 853).

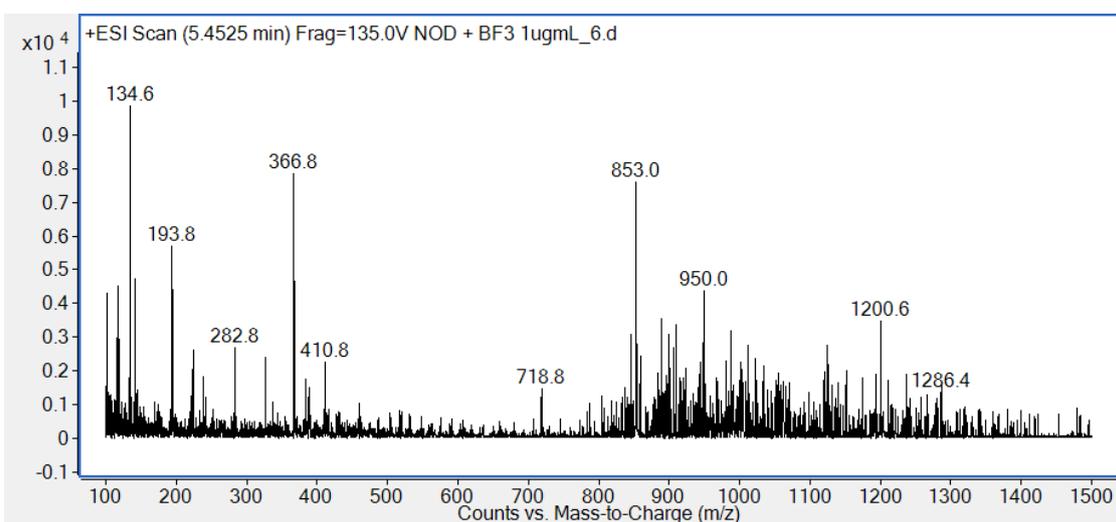
Figura 21: Cromatograma (A) e espectro de massas (B-C) da nodularina usada na reação 2 com formação do fragmento de m/z 839 (B) e 853 (C). Picos depois da reação com m/z de 825 (verde), 839 (azul) e 853 (roxo) e seus respectivos espectros de massas.



(a)



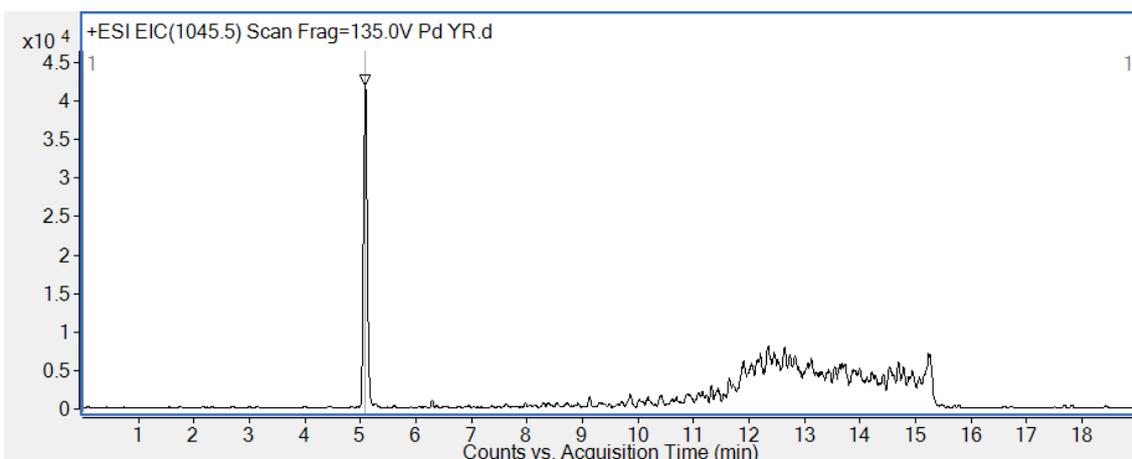
(b)



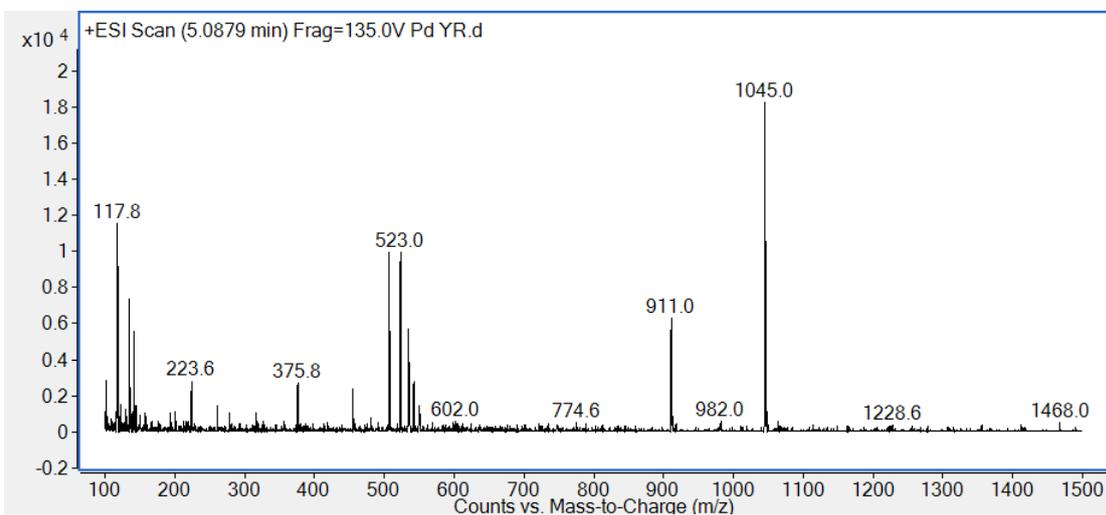
(c)

Na Figura 22, estão apresentados os dados do padrão de microcistina YR utilizado como controle positivo da reação (pico antes da reação).

Figura 22: Cromatograma (A) e espectro de massas (B) do padrão de microcistina YR utilizado como controle positivo da reação (pico antes da reação).



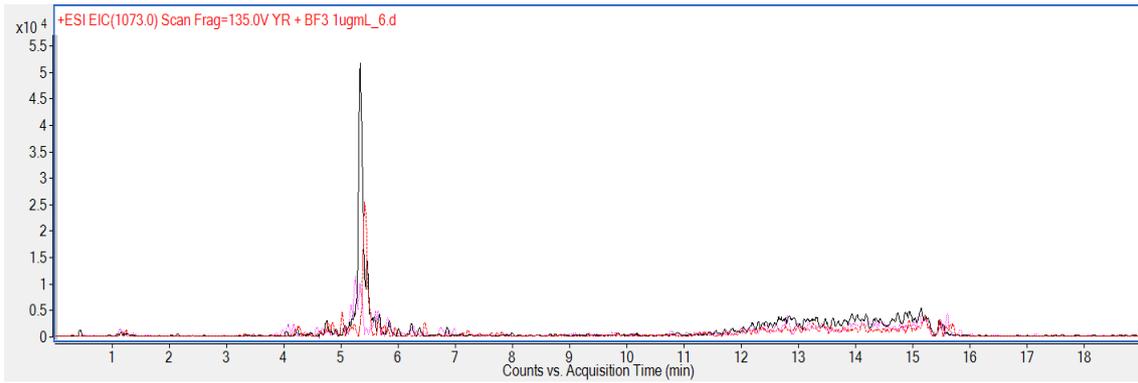
(a)



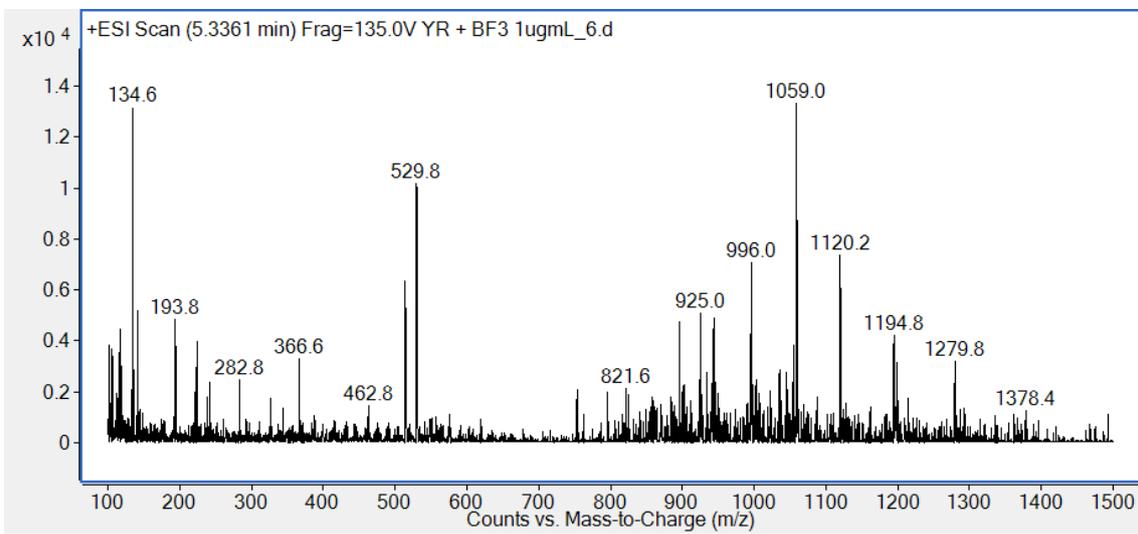
(b)

Na Figura 23, estão apresentados os dados de padrão de microcistina YR utilizado como controle positivo da reação. É possível observar picos depois da reação 2, mostrando que o pico base da microcistina YR diminuiu bastante e há a formação de fragmentos m/z 1059 (vermelho) e m/z 1073 (preto) na mesma região.

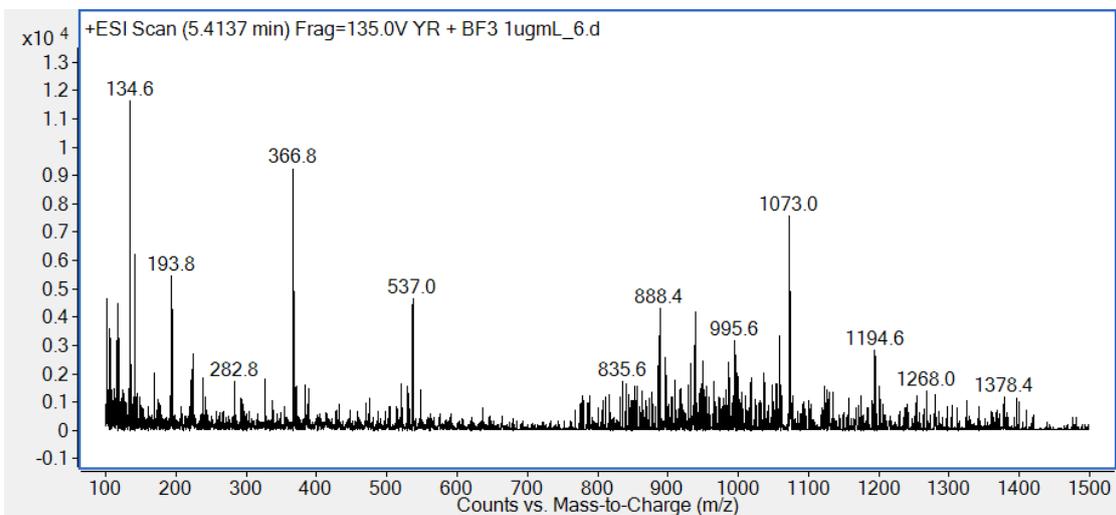
Figura 23: Cromatograma (A) e espectro de massas (B-C) do padrão de microcistina YR (roxo) utilizado como controle positivo da reação (picos depois da reação).



(a)



(b)



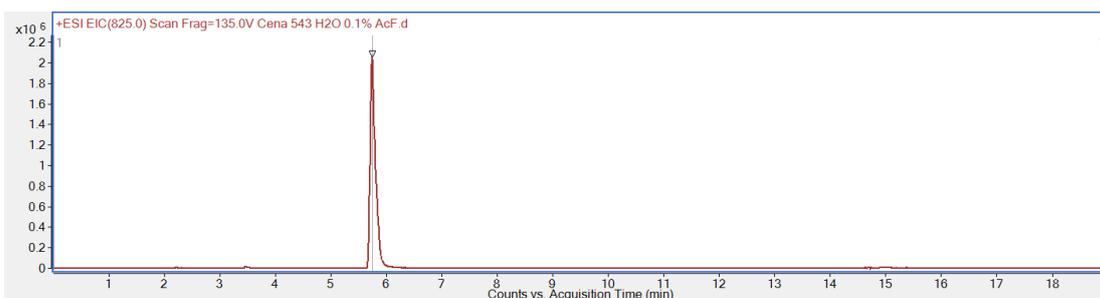
(c)

A estabilidade deste composto (nodularina modificada) não era muito alta após 24h; ele apresentava decaimento cromatográfico, enquanto os picos de espumiginas e namalídeos permaneceram praticamente estáveis. Com isso, foi descartada essa alternativa. A busca de algum composto que atendesse as necessidades da metodologia continuou.

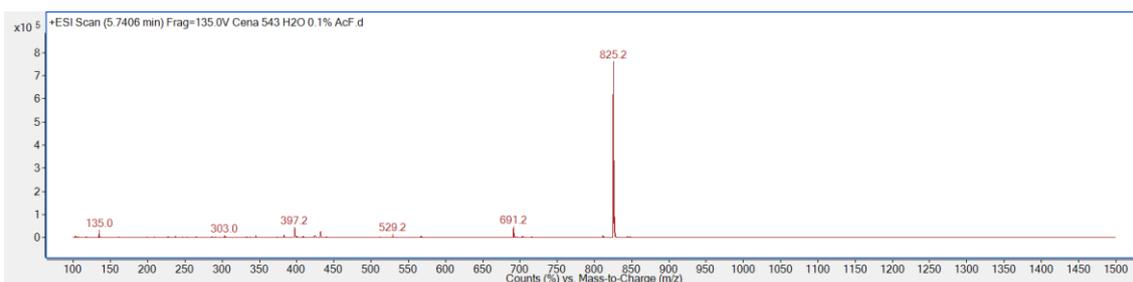
5.6.2 Nodularina - Extração da cepa CENA 543

Uma vez que a nodularina não existe naturalmente na amostra, ela foi considerada uma boa candidata para PI. Contudo, em todos os testes que foram realizados, foi utilizado um padrão comercial de nodularina. Mas como estava numa etapa de testes, seria melhor achar outra fonte de nodularina, para poder realizar todos os testes sem se preocupar com o limite finito deste padrão. Dessa maneira, foi encontrada uma cepa de *Nostoc* sp. CENA 543, que produz alta quantidade de nodularina (em torno de miligramas de nodularina por grama de biomassa seca), o que foi perfeito para o momento em que se encontrava o projeto. Na Figura 24, é possível observar os dados da extração direta da cepa CENA 543 e posterior injeção no LC-MS.

Figura 24: Pico de nodularina de m/z 825 extraída com água acidificada. Cromatograma (A) e espectro de massas (B).



(a)

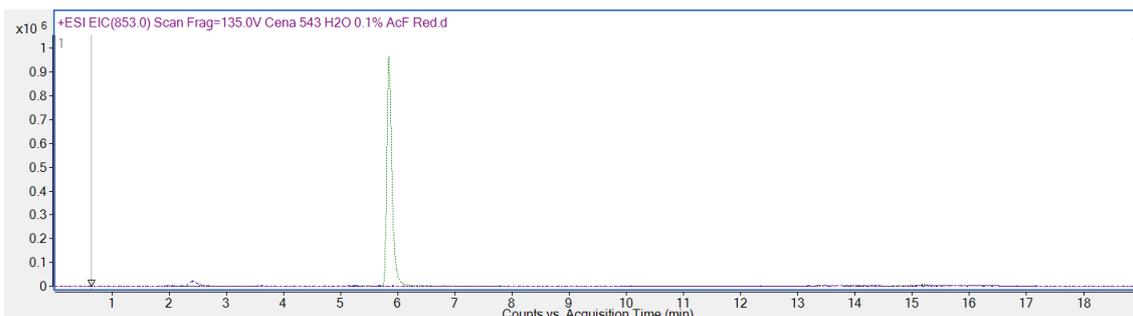


(b)

Como pode ser visto, a nodularina extraída apresentou um bom pico cromatográfico, assim como o padrão comercial anteriormente. Mas seria necessário avaliar mais um ponto. Como na preparação da amostra da cepa ITEP-024 é utilizado uma solução redutora, precisaria avaliar se a mesma não iria causar algum problema com a amostra de CENA 543, visto que é um ambiente mais rico de compostos do que apenas o padrão puro de nodularina.

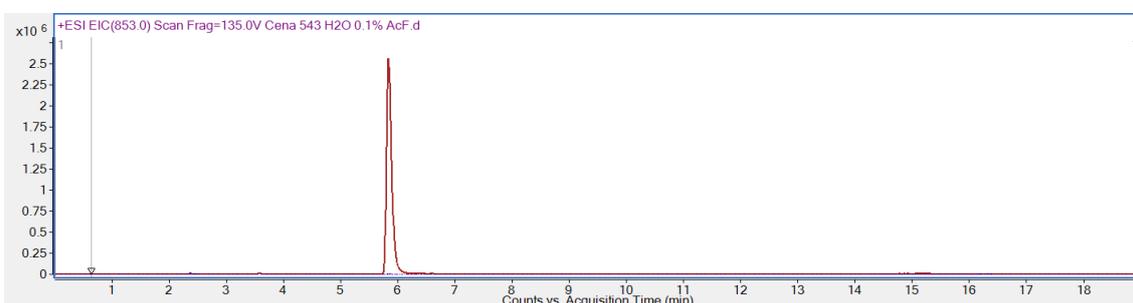
Assim, a Figura 25 mostra o resultado desta reação. A nodularina se mostrou intacta após este procedimento e não houve a formação de outros fragmentos, ou seja, não houve nodularinas modificadas na cepa CENA 543.

Figura 25: Pico de nodularina de m/z 825 extraído com água acidificada e submetido a redução com borohidreto de sódio e sem formação de outros fragmentos (nodularina intacta).



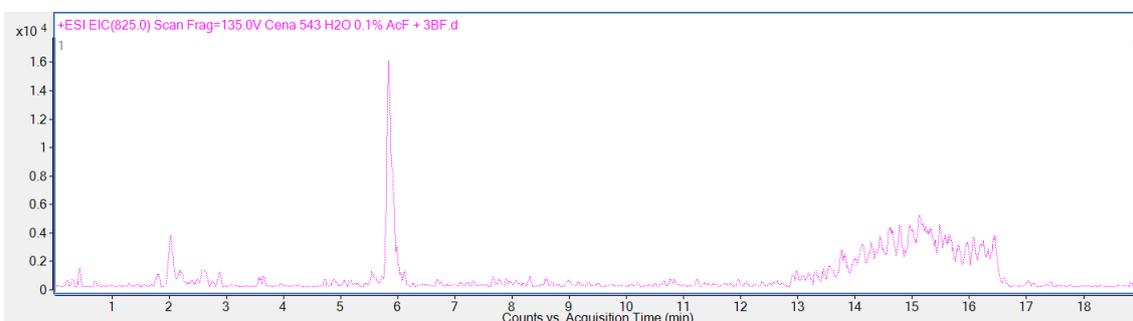
Na sequência, foi realizada a reação da cepa CENA 543 com 3-BF, a fim de avaliar como se comportaria nessa nova situação. A Figura 26 mostra a sobreposição dos 3 picos (nodularina + nodularina monometilada + nodularina dimetilada).

Figura 26: Sobreposição dos picos de m/z de 825, 839 e 853 (nodularina + nodularina monometilada + nodularina dimetilada).

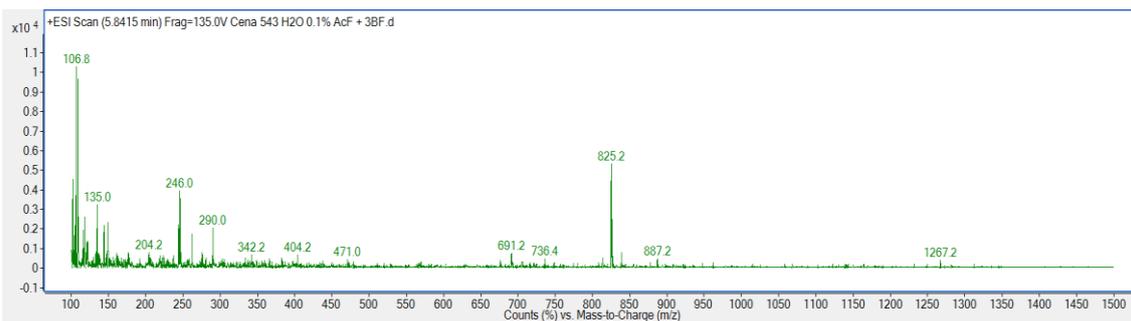


Como pode ser observado, a nodularina é praticamente toda convertida em suas formas metiladas e apresenta um bom pico cromatográfico. Na sequência, a Figura 27 mostra o que sobrou do pico da base nodularina.

Figura 27: Pico de nodularina com m/z de 825 após reação com 3-BF. Cromatograma (A) e espectro de massas (B).



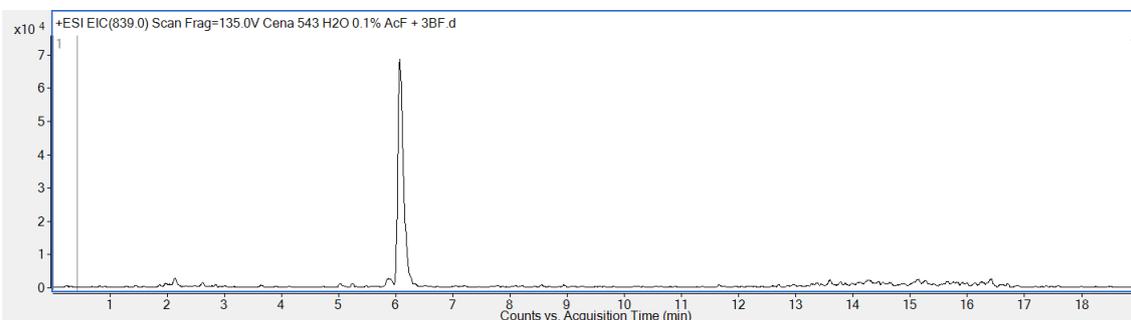
(a)



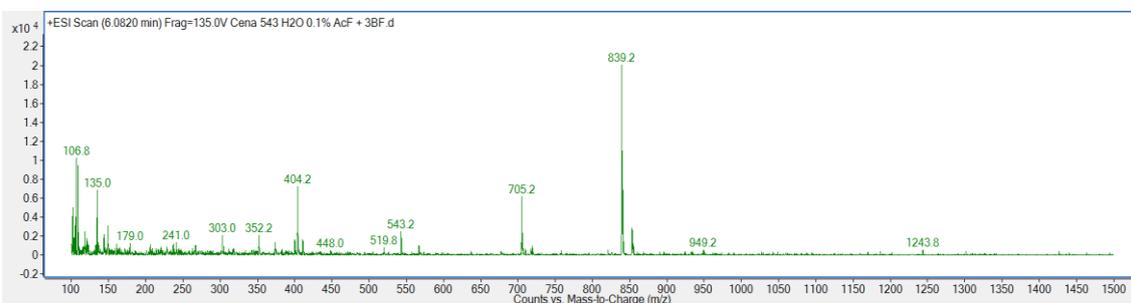
(b)

Na Figura 28, praticamente toda a nodularina é consumida na reação.

Figura 28: Pico de nodularina, m/z de 839 e 853, após reação com 3-BF, em que praticamente quase toda a nodularina é convertida nestes novos compostos (nodularina modificada). Cromatograma (A) e espectro de massas (B).



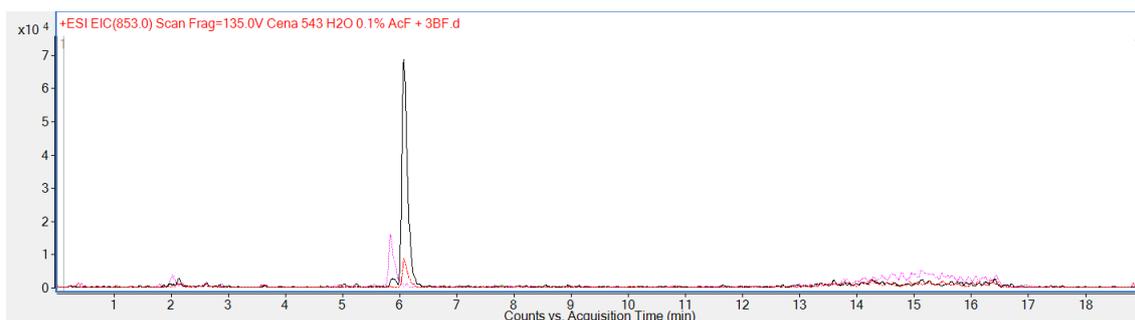
(a)



(b)

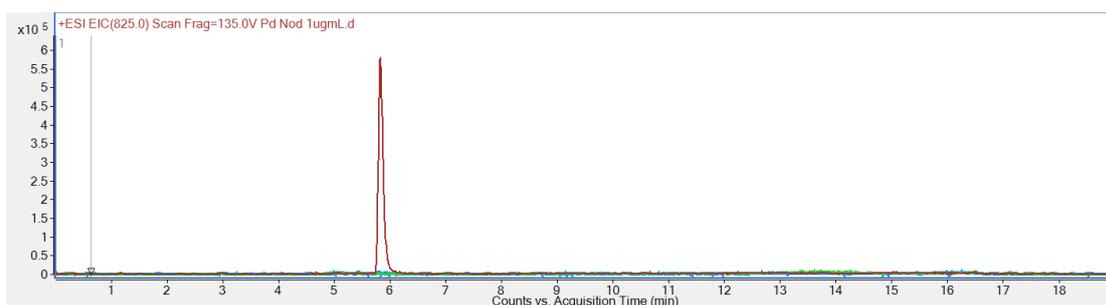
Após 24h da realização da reação de metilação, foi reinjetado o mesmo vial com a reação e apresentou um resultado não adequado deste composto. As metilações que haviam ocorrido anteriormente, começaram a ser desfeitas e voltou a aparecer o pico de nodularina em m/z 825. A Figura 29 mostra a sobreposição destes 3 picos de nodularina que não estavam presentes antes.

Figura 29: Sobreposição dos picos de m/z de 825 (vermelho), 839 (preto) e 853 (roxo), após a reação com 3-BF, mostrando que há nodularinas modificadas, mas voltou a aparecer o pico de nodularina base que anteriormente tinha sido consumida quase por completo.

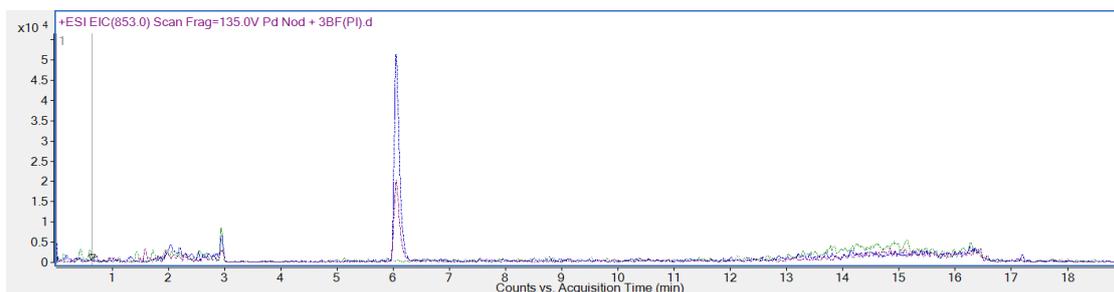


Na Figura 30, encontra-se o comparativo que foi realizado com o padrão de nodularina comercial para avaliar se a nodularina da cepa CENA 543 seria adequada para os experimentos futuros. Na Figura 30B, é possível observar que houve praticamente todo o consumo do m/z de 825 (verde) e formação de m/z 839 (azul) e m/z 853 (roxo). Na Figura 30C, houve praticamente todo o consumo do m/z de 825 (verde) e formação de m/z 839 (azul) e m/z 853 (laranja), e o agente redutor não interferiu na reação de metilação.

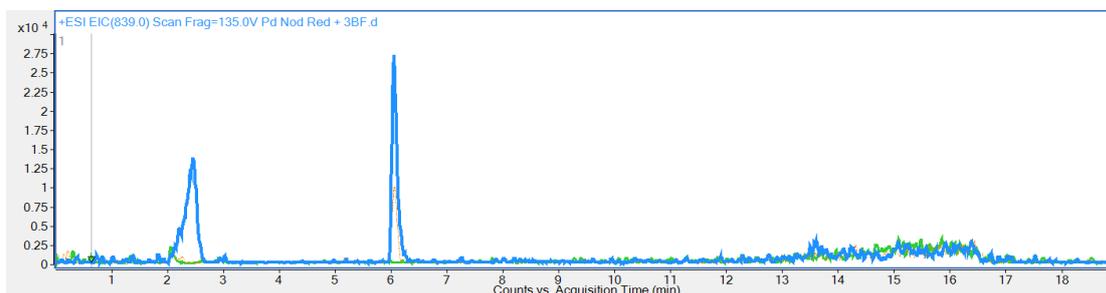
Figura 30: Padrão de nodularina comercial de 1 $\mu\text{g/mL}$ (A); padrão de nodularina comercial 1 $\mu\text{g/mL}$ após reação com 3-BF (B); padrão de nodularina comercial 1 $\mu\text{g/mL}$ reagido com borohidreto de sódio e posterior reação com 3-BF (C); sobreposição dos picos da cepa ITEP-024 (roxo - namalídeo; azul - espumigina) e do padrão de nodularina modificada (vermelho), mostrando a resolução entre eles (D).



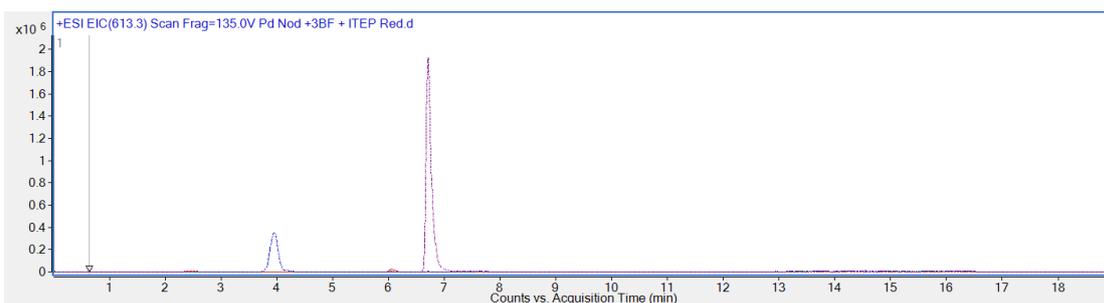
(a)



(b)



(c)



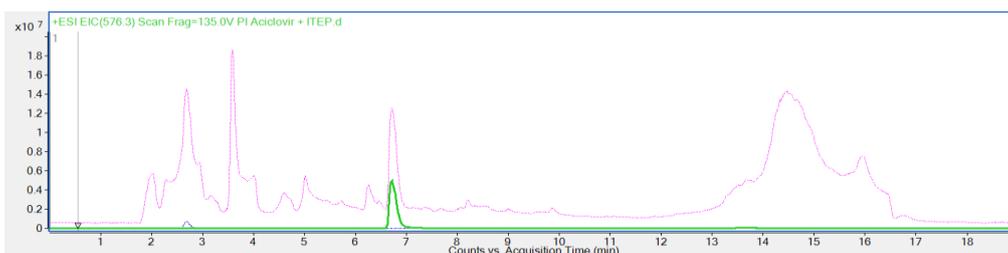
(d)

Mas como dito anteriormente, esse candidato a PI não foi adequado, porque não apresentou estabilidade com o passar do tempo. Outro problema, mais contornável, seria que sempre ocorre a dimetilação da nodularina, não sendo possível para na monometilação. Isto não é um problema caso a proporção de ambas se mantivesse constantes, mas como não foi o caso, então se tornou um problema grave no projeto e com isto foram testados novos candidatos a PI.

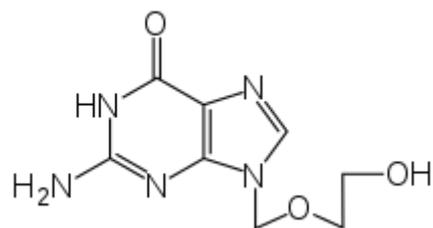
5.6.3 Aciclovir

O aciclovir (nucleosídeo análogo da purina), apresentou um pico de m/z 226 com tempo de retenção de aproximadamente 2,6 min (Figura 31).

Figura 31: Cromatograma do aciclovir utilizado para teste de padrão interno com a função de TIC (roxo) e EIC (verde) (A) e sua estrutura química (B).



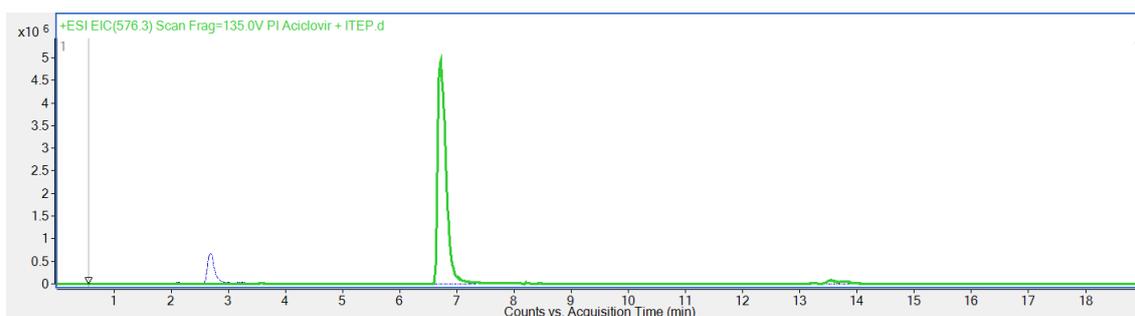
(a)



(b)

Como o aciclovir apresenta uma estrutura menor em comparação com o namalídeo, e também mais polar, era esperado que saísse no começo da corrida, e isso foi visto por meio da análise. Quando contaminada a amostra de ITEP-024 com o aciclovir, obtemos um cromatograma limpo e adequado para as análises, como apresentado na Figura 32.

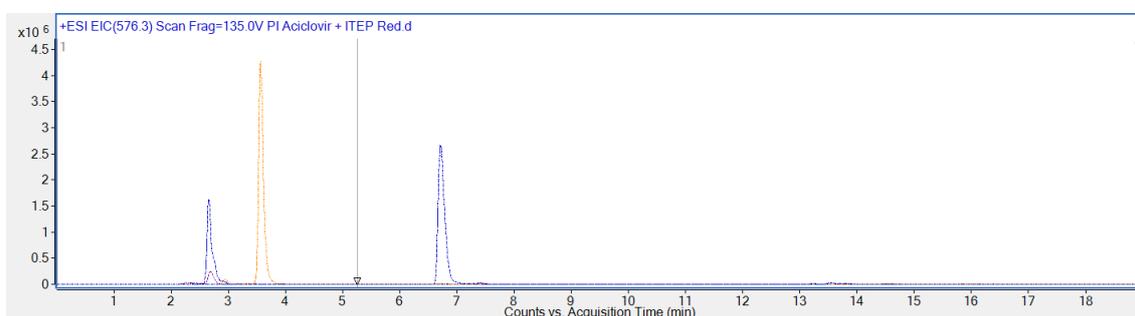
Figura 32: Cromatograma com o pico do aciclovir (2,6 min) e namalídeo (6,8 min) no modo Scan.



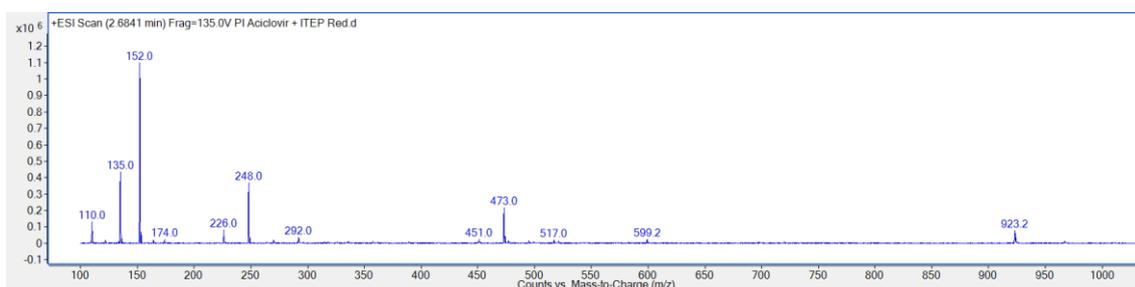
Um problema começa a aparecer quando precisamos fazer a redução da amostra para poder analisar as espumiginas (Figura 33). O pico do aciclovir reage com o agente redutor gerando um novo composto e concomitantemente, ele perde perfil cromatográfico, gerando um pico com “ombro” e disforme (Figura 33B). Desta forma, chegamos à conclusão de que este composto, aciclovir, não era adequado para ser

utilizado como padrão interno, porque ele reagia com os tratamentos que a amostra sofria e perdia resolução cromatográfica.

Figura 33. Cromatograma da amostra normal e reduzida (A) sobrepostos contendo os picos de aciclovir (2,6 min - azul e roxo), espumigina (3,6 min - laranja) e namalídeo (6,8 min - azul) e espectro de massas do aciclovir no cromatograma (B).



(a)

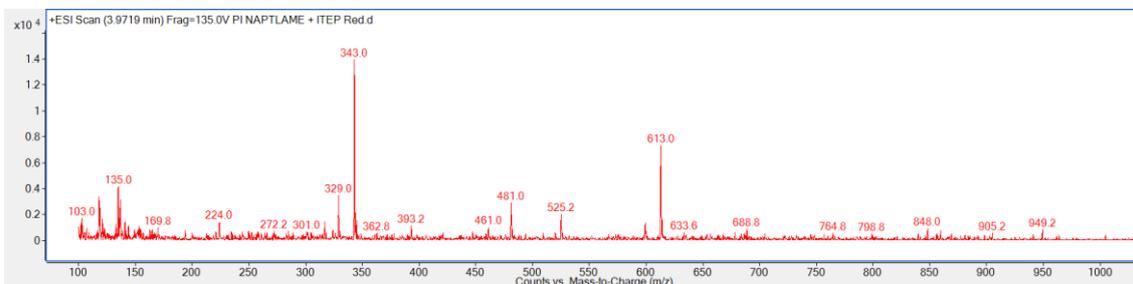
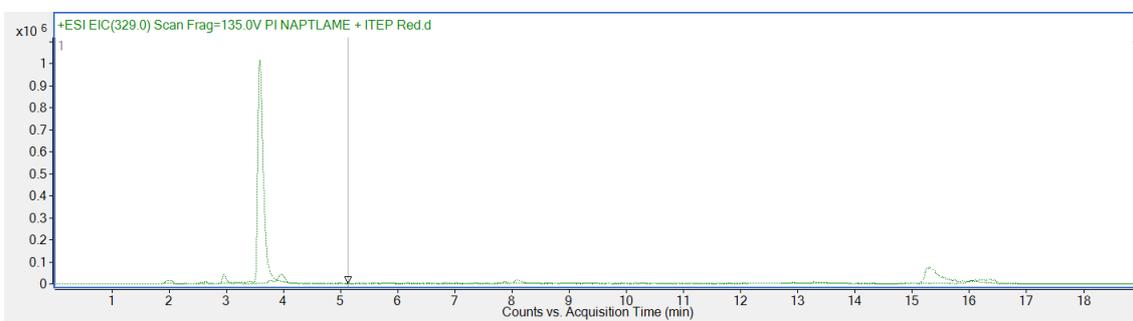
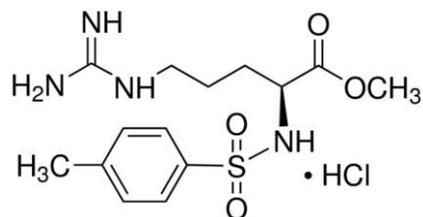


(b)

5.6.4 N-alfa-para-tosyl-L-arginina metil ester (NAPTLAME)

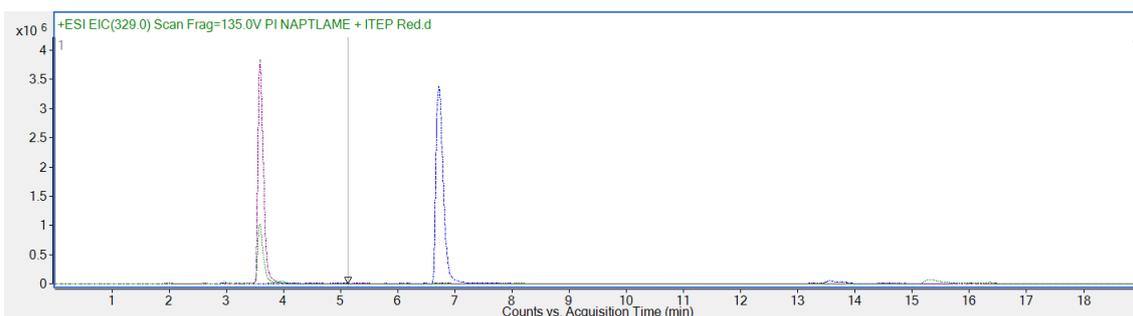
Outro composto utilizado como padrão interno foi o NAPTLAME, que apresenta grupos químicos de interesse e parecia ser promissor, uma vez que possui características de peptídeos, como pode ser observado na Figura 34A. Ele apresentou um perfil cromatográfico bom relacionado ao método. Apresentou um pico de m/z 343 e com TR de aproximadamente 3,5 min (Figura 34B-C).

Figura 34: Estrutura química do NAPTLAME (A); cromatograma do NAPTLAME utilizado para teste de padrão interno (B) e espectro de massas do NAPTLAME do cromatograma (C).



Tendo analisado isso, fez-se a contaminação da ITEP-024 reduzida com este composto gerando os picos descritos na Figura 35.

Figura 35: Cromatograma com os picos de NAPTLAME (3,6 min - verde), espumigina (3,6 min - roxo) e namalídeo (6,8 min - azul).

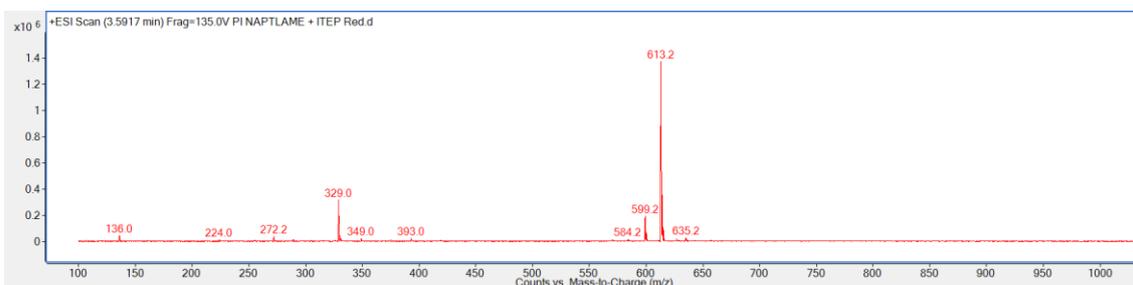


Ao analisar este cromatograma, vemos um problema, porque o pico da espumigina e do PI saem no mesmo tempo de retenção, o que não é o ideal de um perfil cromatográfico. Além disso, ao analisar o espectro de massas do candidato a PI, vemos que ele reage com o borohidreto de sódio, gerando um composto com m/z 329, novamente incorrendo no problema com o PI anterior.

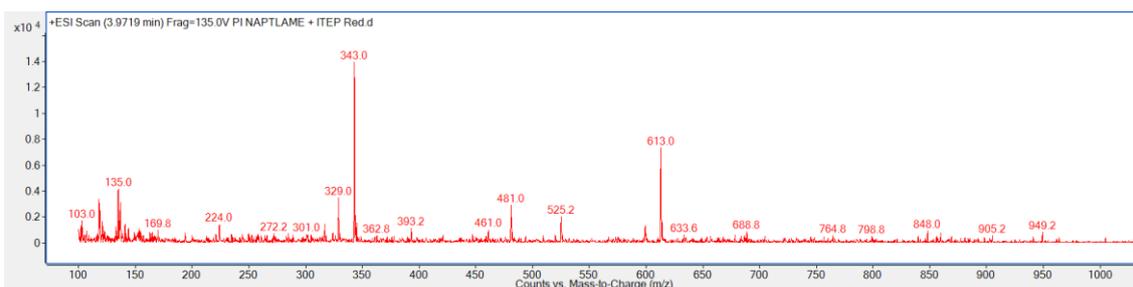
A mais, pelo o pico da espumigina e do PI se sobreporem, acaba atrapalhando a detecção da espectrometria de massas, pois ambos os picos contaminam o espectro um do outro. Com isto, este padrão foi descartado também como possível PI.

Na Figura 36 são observados os espectros de massas do pico da espumigina e do NAPTLAME, mostrando que um pico contamina o espectro do outro pico pela sobreposição dos picos no cromatograma.

Figura 36: Espectros de massas do pico da espumigina (A) e do NAPTLAME (B).



(a)

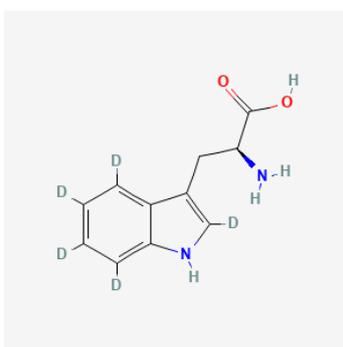


(b)

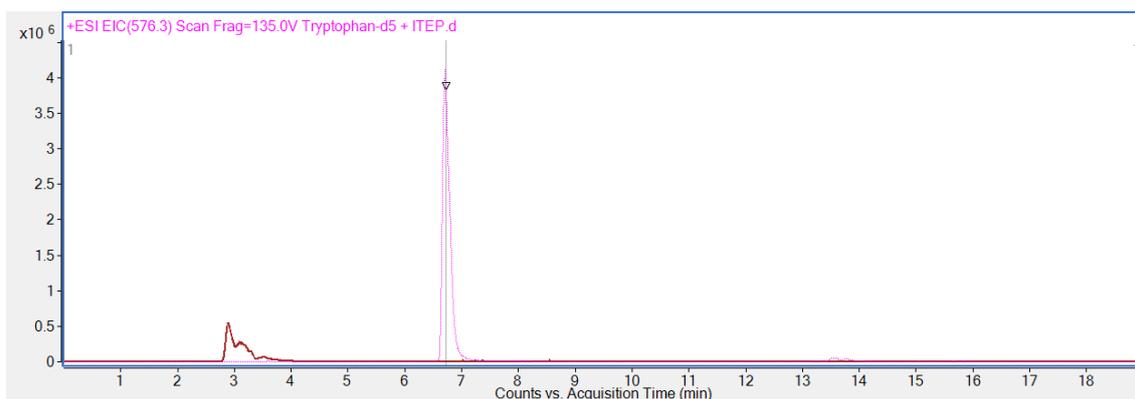
5.6.5 Tryptophan-d5

Outro candidato para PI testado foi o triptofano deuterado (Figura 37A). Por ser um padrão deuterado, apresenta uma característica m/z que poderia facilitar as análises. Sua m/z é de 210 e o TR de aproximadamente 2,9 min. Contudo, quando foi analisada a contaminação da ITEP-024 com esse PI, o pico do triptofano não apresentou um bom pico cromatográfico, como mostra a Figura 37B. Com isso, este padrão interno também não se mostrou adequado para o método e foi descartado.

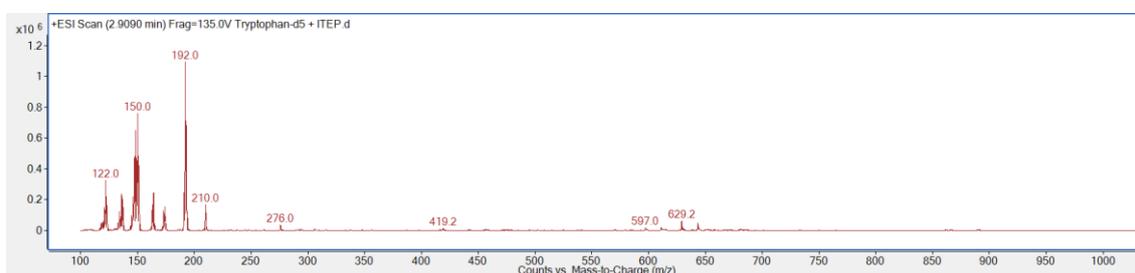
Figura 37: Estrutura química do Tryptophan-d5 (A); cromatograma do Tryptophan-d5 utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do Tryptophan-d5 (2,9 min - vermelho) e namalídeo (6,8 min - roxo) (B), e espectro de massas do Tryptophan-d5 do cromatograma (C).



(a)



(b)

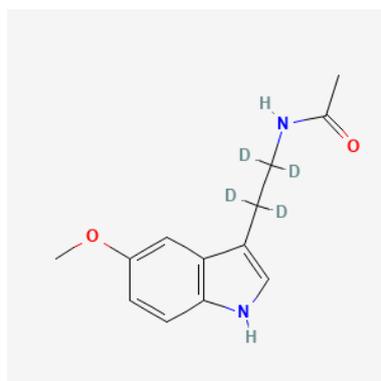


(c)

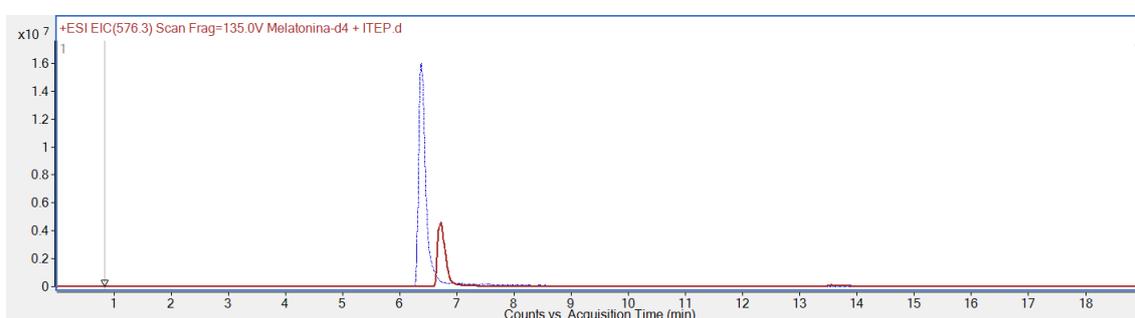
5.6.6 Melatonin-d4

Outro padrão deuterado testado foi a melatonin-d4 (Figura 38A), pelos mesmos motivos anteriores. Este pico apresenta uma m/z de 237 e TR de aproximadamente 6,4 min (Figura 38BC). Cromatograficamente falando, este pico se adequou perfeitamente ao método em uso, apresentando um bom perfil cromatográfico.

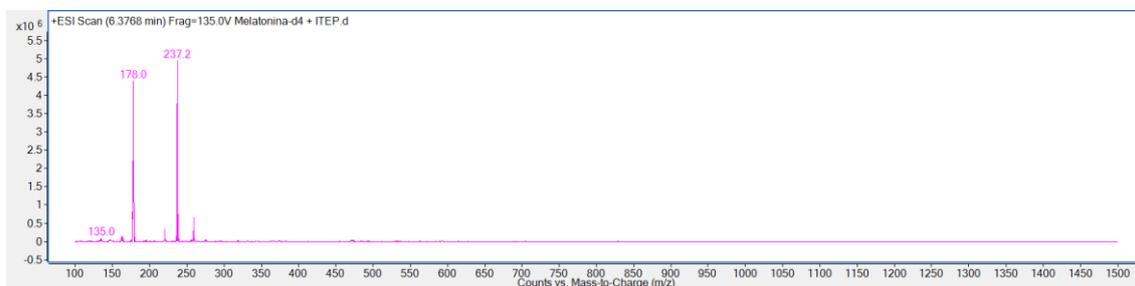
Figura 38: Estrutura química do melatonin-d4 (A); cromatograma do melatonin-d4 utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do melatonin-d4 (6,4 min - azul) e namalídeo (6,8 min - vermelho) (B), e espectro de massas do melatonin-d4 do cromatograma (C).



(a)



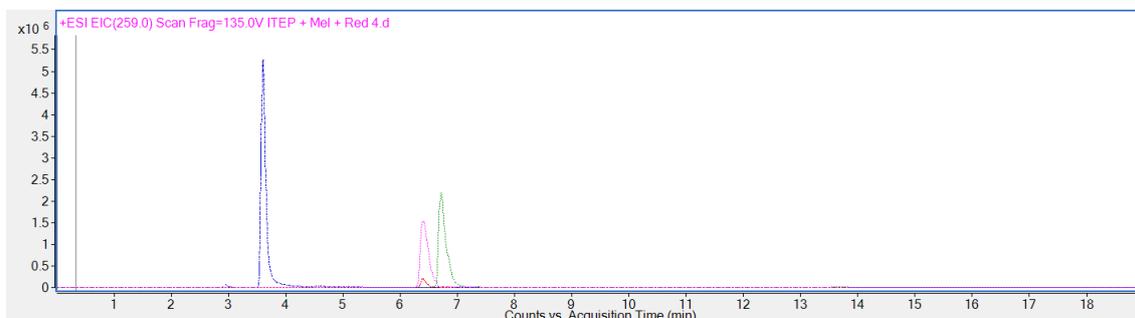
(b)



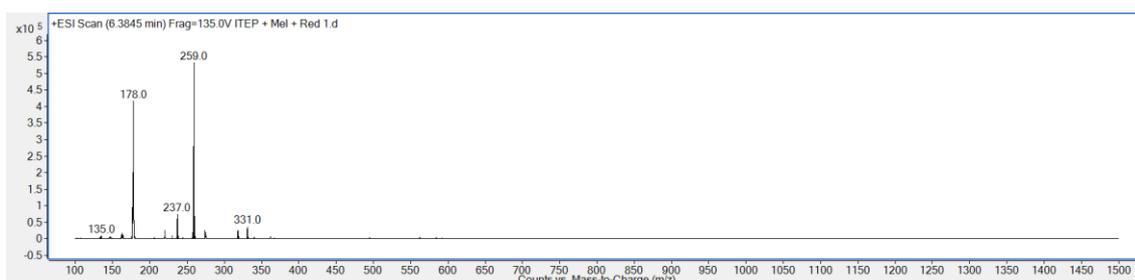
(c)

Contudo, quando se misturou este candidato a PI com o agente redutor para a ITEP-024, causou o mesmo problema que os anteriores, este composto reage com este e gera um novo fragmento de m/z de 259. Novamente temos o mesmo problema das tentativas anteriores em que o agente redutor reage com o PI e que não é uma coisa desejada no experimento, porque aumentou mais uma variante no processo e, portanto, foi eliminado (Figura 39).

Figura 39: Cromatograma contendo os picos de espumigina (3,6 min - azul), melatonin-d4 (6,4 min - 237(roxo) e 259 (vermelho) e namalídeo (6,8 min - verde) (A) e espectro de massas do melatonin-d4 mostrando a formação do pico de m/z 259 (B).



(a)

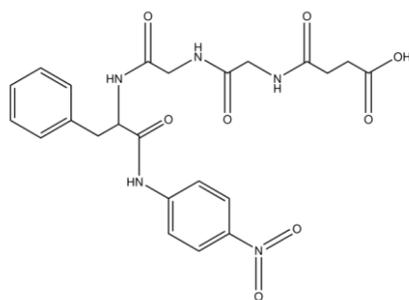


(b)

5.6.7 N-succinil-Gly-Gly-Fe-p-nitroanilida

N-succinil-Gly-Gly-Fe-p-nitroanilida (Figura 40) apresentou problemas de solubilização com o solvente utilizado (MeOH: H₂O 50:50% - v/v) e já foi descartada nesta etapa de preparação.

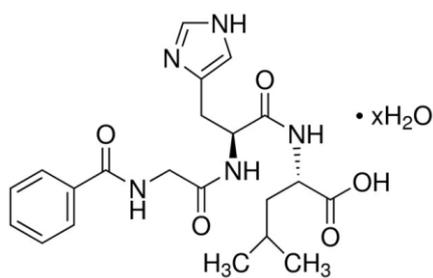
Figura 40: Estrutura molecular do N-succinil-Gly-Gly-Fe-p-nitroanilida.



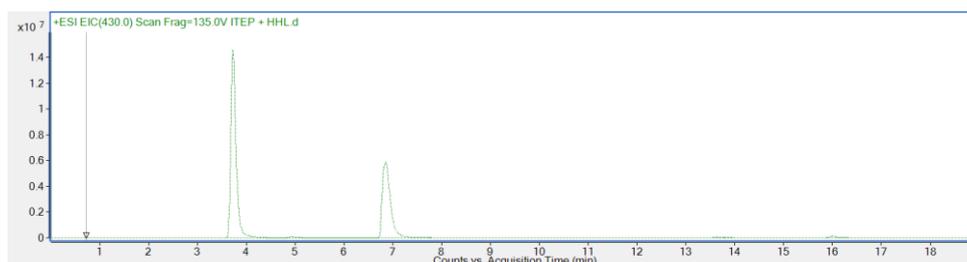
5.6.8 N-Hippuryl-His-Leu-hydratade (HHL)

Outro composto testado foi HHL (Figura 41A), que se trata de um composto com características de peptídeos e que poderia ser útil na análise. Ele apresentou uma m/z de 430 e TR de aproximadamente 3,8 min (Figura 41B-C). Nos testes iniciais, este composto mostrou-se promissor, porque apresentou bom perfil cromatográfico e resolução.

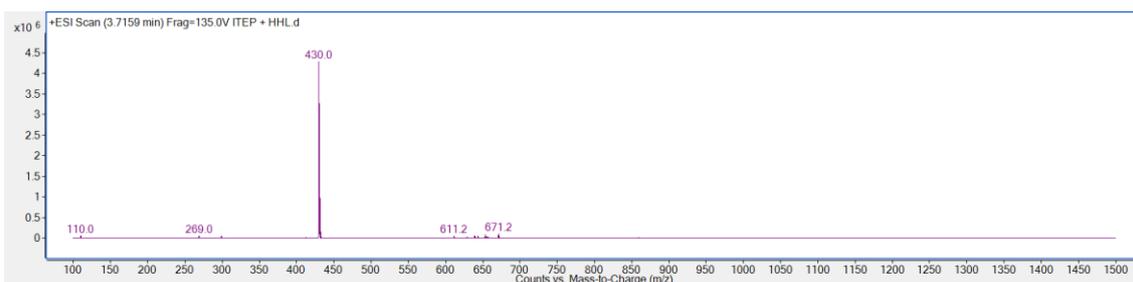
Figura 41: Estrutura química do HHL (A); cromatograma do HHL utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do HHL (3,8 min - azul) e namalídeo (6,8 min - azul) (B) e espectro de massas do HHL do cromatograma (C).



(a)



(b)

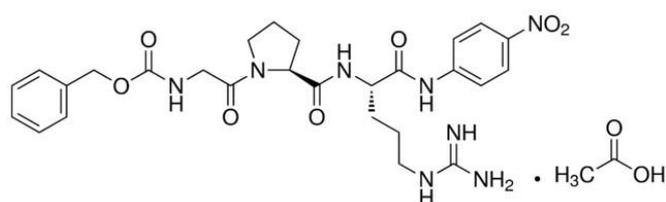


(c)

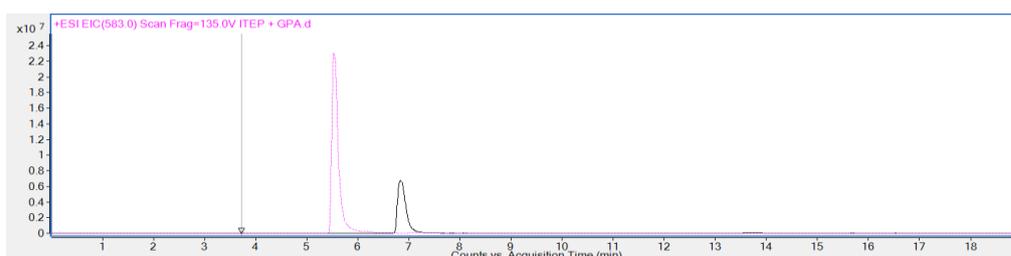
5.6.9 Z-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida acetate salt (GPA)

O GPA (Figura 42A) também foi outro composto que se mostrou promissor nos primeiros testes. Ele apresentou um m/z de 583 e com TR de aproximadamente 5,6 min (Figura 42B-C). O cromatograma apresentou uma resolução entre os picos e eles apresentam boa simetria, algo desejável.

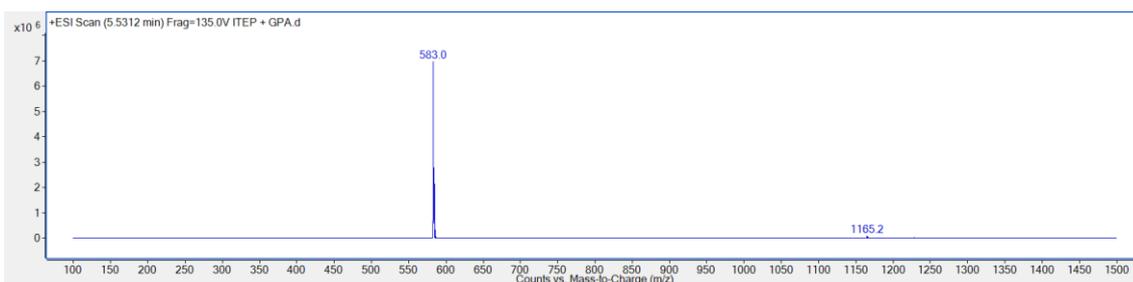
Figura 42: Estrutura química do GPA (A), cromatograma do GPA utilizado para teste de padrão interno, mostrando os picos do GPA (5,6 min - roxo) e namalídeo (6,8 min - preto) (B), e espectro de massas do GPA do cromatograma (C).



(a)



(b)



(c)

5.7 Resultados promissores

5.7.1 Extração da biomassa para liberação dos compostos de interesse

Pelo que foi apresentado até o momento, a extração direta, ou seja, apenas biomassa seca e líquido extrator foi a melhor maneira de lidar com os diversos problemas durante o desenvolvimento do método. Todas as formas de extração e purificação dos compostos de interesse acabaram causando perdas nas amostras ou problemas analíticos e/ou ambientais. Portanto, a forma mais simples acabou sendo a mais sensata. Temos problemas decorrentes disso, porque o equipamento de LC-MS precisa lidar com mais compostos ao mesmo tempo e isso pode gerar perda de resposta/sinal do que realmente importa, além de ser maiores as chances de contaminar/sujar o nebulizador e seu entorno. No fim, temos que avaliar sempre o melhor custo-benefício e a melhor decisão foi a extração direta.

5.7.2 Padrões internos promissores: HHL e GPA

Dentre os diversos candidatos de padrão interno que foram testados, dois acabaram por se mostrar mais adequados, o HHL e o GPA. Falando da estrutura química, temos compostos com massas moleculares próximas às espumiginas e namalídeos; apresentam grupos funcionais semelhantes e estrutura proteica. Apresentaram boa solubilidade no

solvente extrator e no solvente usado para ressuspender a amostra (MeOH: H₂O 50:50% - v/v). Além disso, apresentaram boa ionização no LC-MS apresentando cromatogramas com picos simétricos e proporcionais às análises.

É possível que a melhor característica que os diferenciam dos demais seja a estabilidade frente ao agente redutor. Os demais PI acabaram gerando íons resultantes da reação do borohidreto de sódio com eles, gerando outras espécies de íons, que muitas vezes não eram tão estáveis. Trabalhar com um PI que não é uma mistura de íons é desejado, porque não precisamos nos preocupar que a concentração do PI vá variar com o tempo ou outra condição da análise. Então nesta análise inicial, se mostraram os candidatos de escolha para prosseguir com os demais testes.

7. CONCLUSÕES

A ideia de utilizar compostos gerados pelas próprias cianobactérias como precursores dos padrões internos foi uma ideia muito boa, porque já é esperado que eles sejam muito parecidos quimicamente com os namalídeos e espumiginas. Mas infelizmente as tentativas que foram realizadas não foram satisfatórias. Mostrando que tem um potencial ainda grande para futuras pesquisas. Mas mesmo com estas adversidades, foram testados vários outros compostos comerciais, que apresentam algumas vantagens, como disponibilidade rápida, pureza e estabilidade. Isso ajudou principalmente nos últimos testes realizados, porque foi possível continuar os experimentos da mesma etapa que se encontrava e não precisar voltar para uma etapa anterior de reações químicas com nodularinas ou outro cianopeptídeo.

O método desenvolvido (Luna C18 (150 x 2 mm x 3µm), com fases móveis A e B (gradiente vide item 4.3.1), volume de injeção de 5 µL, fluxo de 0,25 mL/min e temperatura do forno a 40 °C mostrou-se importante, porque foi possível avaliar diversos cianopeptídeos e não apenas as nodularinas e espumiginas, e isto é bem vantajoso para um laboratório que trabalha com estes tipos de compostos, porque conseguimos fazer uma análise de multi detecção para peptídeos. As escolhas dos PI, HHL e GPA, foram importantes cromatograficamente para a metodologia. A falta de tempo não permitiu uma melhor otimização e posterior validação, mas o processo foi de aprendizado ímpar e conhecimento serão levados para o futuro. Jamais se contentar com sua realidade é uma das bases da ciências e será mantido nos planos futuros, seja pessoal ou profissional.

8. REFERÊNCIAS

Anas A. R. J., Kisugi T., Umezawa T., Matsuda F., Campitelli M. R., Quinn R. J., et al..

Thrombin inhibitors from the freshwater cyanobacterium *Anabaena compacta*. J. Nat. Prod. , 2012, 75, 1546–1552.

ANVISA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 “**Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**”.

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html.

Acesso em: 05/12/2022.

Arora, K., Gangadharappa, H.V. **AN APPROACH TO BIOANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2016; Vol. 7(6): 2291-2301.

Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. May 2018.

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Acesso em: 05/12/2022

Bober, B, Bialczyk, J. **Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin.** *J Appl Phycol.* 2017;29(3):1355-1362.

Bortoli, S.; Oliveira-Silva, D.; Krüger, T; Dörr, F.A.; Colepicolo, P.; Volmer, D.A.; pinto, E. **Growth and microcystin production of a Brazilian *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2014, 24, 389-398.

Camargo, JA, Alonso, Á. **Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment.** *Environ Int.* 2006;32(6):831-849.

Carpenter S, Caraco N, Correll D., Howarth RW, Sharpley AN, Smith VH. **Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen.** *Ecol Appl.* 1998;8(January 1998):559-568.

Carvalho, L.R., Sant'anna, C.L., Gemelgo, M.C.P., Azevedo, M.T.P. **Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography.** *Revista Brasil. Bot.*, V.30, n.1, p.141-148, jan.-mar. 2007.

Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. **Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses.** *Journal of Chromatography B*, 2007, 852, 22.

CHEN, L.; XIE, P. Mechanisms of Microcystin-induced Cytotoxicity and Apoptosis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1018-1031, 2016.

Cheruku, P., Plaza, A., Lauro, G., Keffer, J., Lloyd, J.R., Bifulco, G., Bewley, C.A. **Discovery and Synthesis of Namalide Reveals a New Anabaenopeptin Scaffold and Peptidase Inhibitor.** *J. Med. Chem.* 2012, 55, 735–742.

CHITTORA, D.; MEENA, M.; BARUPAL, T.; SWAPNIL, P.; SHARMA, K. **Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture.** *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 22, p. 100737, 2020.

Chlipala GE, Mo S, Orjala J. **Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – A Source for Drug Discovery.** *Curr Drug Targets.* 2011;12(11):1654-1673.

CHORUS, I.; WELKER, M. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**, second ed. CRC Press, 2021.

Codd GA. **Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance.** *Water Sci Technol.* 1995;32(4):149-156. doi:10.1016/0273-1223(95)00692-3

DE OLIVEIRA, A.F.R. **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA MICROCISTINAS ATRAVÉS DA DERIVATIZAÇÃO COM PROBES ÓPTICOS.** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS. DIADEMA 2016

Dörr, F. A.; Rodríguez, V.; Molica, R.; Henriksen, P.; Krock, B; Pinto, E. **Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry.** *Toxicon*, 2010, 55, 92–99.

FERNANDES, K.; FERRAZ, H.; VERAU, F.; PINTO, E. **Availability of Guanitoxin in Water Samples Containing *Sphaerospermopsis torques-reginae* Cells Submitted to Dissolution Tests.** *Pharmaceuticals*, v. 13, p. 402, 2020.

Fewer, D.P., Jokela, J., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Koskenniemi, K., Stal, L.J., Sivonen K.. **The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena***. *Molecular Microbiology* (2009) 73(5), 924–937 .

Fontes, I.C.S. **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas**. *Scientia Chromatographica*, 2010,2, 1, 13-25.

Gademann, K; Portmann, C.**Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities**. *Current Organic Chemistry*, Volume 12, Number 4, 2008, pp. 326-341(16).

Hameed, S., Lawton, L.A., Edwards, C. **Phosphate and nitrate supplementations to evaluate the effect on cell biomass, intra and extracellular nodularin and nodulopeptin 901 produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* KAC 66**. *Journal of Applied Phycology*. 2020. 32, 937–950.

Hoff-Risseti, C.; Dörr, F.A.; Schaker, P.D.C.; Pinto, E.; Werner, V.R.; Fiore, M.F.. **Cylindrospermopsin and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater**. *Plos One*, 2013, 8, 8.

Itou Y., Suzuki S., Ishida K., Murakami M. **Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595)**. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9, 1243–1246.

JACINAVICIUS, F.R.; GERALDES, V.; CRNKOVIC, C.M.; ENDREWS, D.; FIORE, M.F.; PINTO, E. **Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria**. *FEMS Microbiology and Ecology*, v. 97, p. 1-16, 2020.

Janssen, E.M. **Cyanobacterial peptides beyond microcystins - A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment.** Water Res. 2019 Mar 15;151:488-499.

Jokela, J., Heinilä, L.M.P., Shishido, T.K., Wahlsten, M., Fewer, D.P., Fiore, M.F., Wang, H., Haapaniemi, E., Permi, P., Sivonen, K. **Production of High Amounts of Hepatotoxin Nodularin and New Protease Inhibitors Pseudospumigins by the Brazilian Benthic Nostoc sp. CENA543.** Front. Microbiol, 2017, 8, 1963.

Lanças, F.M.. A. **Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?**. Scientia Chromatographica, 2009, 1, 2.

Lima, S.T., Alvarenga, D.O., Etchegaray, A., Fewer, D.P., Jokela, J., Varani, A.M., Sanz, M., Dörr, F.A., Pinto, E., Sivonen, K., Fiore, M.F.. **Genetic Organization of Anabaenopeptin and Spumigin Biosynthetic Gene Clusters in the Cyanobacterium Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP-024.** ACS Chem. Biol. 2017, 12, 769–778.

Lima, S.T.; Alvarenga, D.O.; Etchegaray, A.; Fewer, D.P.; Jokela, J.; Varani, A.M.; Sanz, M.; Dörr, F.A.; Pinto, E.; Sivonen, K.; Fiore, M.F.. **Genetic organization of anabaenopeptin and spumigin biosynthetic gene clusters in the cyanobacterium Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP-024.** ACS Chemical Biology, 2017, 12, 769–778.

Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. **Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS.** Analytical Chemistry, 2003, 75, 3019.

Meriluoto, J., Lawton, L., Harada, K. **Isolation and Detection of Microcystins and Nodularins, Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins.** Methods in Molecular Biology,

vol. 145: Bacterial Toxins: Methods and Protocols. Chapter 4. © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Miles, C.O., Sandvik, M., Haande, S., Nonga, H., and Ballot, A. **LC-MS Analysis with Thiol Derivatization to Differentiate [Dhb7]- from [Mdha7] Microcystins: Analysis of Cyanobacterial Blooms, Planktothrix Cultures and European Crayfish from Lake Steinsfjorden.** Environ. Sci. Technol. 2013, 47, 4080–4087.

Miller, A. G.; Brown, H.; Degg, T.; Allen, K.; Keevil, B. G. **Measurement of plasma 5-hydroxyindole acetic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry—Comparison with HPLC methodology.** Journal of Chromatography B 2010, 878, 695.

Moein, M.M., Beqqali, A.E., Abdel-Rehimb, M. **Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies.** Journal of Chromatography B, 1043 (2017) 3–11.

Paerl HW, Tucker CS. **Ecology of Blue-Green Algae in Aquaculture Ponds.** *J World Aquac Soc.* 1995;26(2):109-131. doi:10.1111/j.1749-7345.1995.tb00235.x

Paiva, F.C.R.; Glaucio Monteiro Ferreira, G.M.; Gustavo H. G. Trossini, G.H.G.; Pinto, E. **Identification, In Vitro Testing and Molecular Docking Studies of Microginins' Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition.** *Molecules*, 2017, 22, 1884.

Puddick, J. , Miles, C.O., Prinsep, M.R.. **Adaptation of microcystin thiol derivatization for matrix-assisted laserdesorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis.** *Toxicon*, 2016, 109, 13-17.

SANDERS, J.K., GIDLEY, M.J. **Reductive methylation of proteins with sodium cyanoborohydride - Identification, suppression and possible uses of N-cyanomethyl by-products.** *Biochem. J.* (1982) 203, 331-334.

Sanz, M.; Andreote, A.P.D.; Fiore, M.F.; Dörr, F.A.; Pinto, E. **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*, 2015, 13, 3892-3919.

Sanz, M.; Dörr, F.A.; Pinto, E. **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.** *Toxicon*, 2015, 108, 15–18.

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

Shishido, T.K., Jokela, J., David P. Fewer, D.P., Wahlsten, M., Fiore, M.F.,

Sivonen, K. **Simultaneous Production of Anabaenopeptins and Namalides by the Cyanobacterium *Nostoc* sp. CENA543.** *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 2746-2755

U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM)

Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. **Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects.** *Journal of Chromatography B*, 2009, 877, 2198.

Waters. A GUIDE TO EFFECTIVE METHOD DEVELOPMENT IN BIOANALYSIS. www.waters.com/bioanalysis. Acesso em: 05/12/2022

Welker M, Brunke M, Preussel K, Lippert I, von Döhren H. **Diversity and distribution of *Microcystis* (cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities**

studies by single-colony mass spectrometry. *Microbiology*. 2004;150(6):1785-1796.

Welker M, Von Döhren H. **Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis.** *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(4):530-563.

Whitmire, M., Ammerman J., de Lisio P., Killmer, J., Kyle, D. **LC-MS/MS Bioanalysis Method Development, Validation, and Sample Analysis: Points to Consider When Conducting Nonclinical and Clinical Studies in Accordance with Current Regulatory Guidances.** *J Anal Bioanal Techniques* S4:001. 2011. doi:10.4172/2155-9872.S4-001

Žula, A.; Będziak, I.; Kikelj, D.; Ilaš, J. **Synthesis and Evaluation of Spumigin Analogues Library with Thrombin Inhibitory Activity.** *Marine Drugs*, 2018, 16, 413.

ZWARG, J.R.R.M.; MORALES, D.A.; MASELLI, B.S.; BRACK, W.; UMBUZEIRO, G.A. **Miniaturization of the microsuspension *Salmonella*/microsome assay in agar microplates.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 59, p. 488-501, 2018. <https://doi.org/10.1002/em.22195>.

Miranda, C. T. **Variação das condições nutricionais para otimização do crescimento e produção de lipídeos por microalgas.** Rio de Janeiro, 2017. xiii, 111f.:il. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós graduação em Biotecnologia Vegetal, 2017.