

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Ensaio de um método de análise de microcistinas
por LC-ESI-MS/MS**

*Aplicação ao estudo de fatores biológicos condicionantes
da sua produção e libertação em cultura*

Maria Antónia Afonso Rodrigues

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Faro, Março de 2012

Maria Antónia Afonso Rodrigues

(Licenciada em Bioquímica)

Tese submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade do Algarve para obtenção do grau de
Mestre em Biologia Molecular e Microbiana



Tese do Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana orientada por:

☉ **Prof.^a Doutora M. Conceição Mateus**

CIQA – Centro de Investigação em Química do Algarve
Laboratório de Cromatografia

☉ **Prof.^a Doutora Margarida P. Reis**

CIMA – Centro de Investigação Marinha e Ambiental
Laboratório de Ecologia Molecular e Microbiana

Declaração:

Esta dissertação é de inteira e exclusiva responsabilidade de:

(Maria Antónia Afonso Rodrigues)

“Nasce o ideal da nossa consciência da imperfeição da vida. Tantos, portanto, serão os ideais possíveis, quantos forem os modos por que é possível ter a vida por imperfeita”.

Fernando Pessoa, in “Textos de crítica e de intervenção”

Agradecimentos

... Chegou ao fim mais uma etapa da minha vida a que me propus. Ao longo dos últimos anos quantos foram os que contribuíram direta ou indiretamente para que este momento fosse possível, aos quais tenho que prestar os meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar, queria agradecer à Prof.^a Doutora Conceição Mateus e à Prof.^a Doutora Margarida Reis por terem aceite o meu convite para orientarem a minha tese de mestrado e por todos os conhecimentos que me transmitiram para a realização do trabalho experimental. Agradeço também todos os comentários, sugestões e sobretudo por toda a força e incentivo que me passaram ao longo desta dissertação. O meu muito obrigado.

A todas as minhas colegas de laboratório, particularmente, à Sandra Mesquita, à Sandra Caetano e à Cristina Costa por todos os ensinamentos concedidos;

Aos Doutores José Paulo Silva e Hélio Martins e à Maria José Vito pela amabilidade e colaboração prestada sempre que solicitada;

A todos os professores que me instruíram;

À Telma e à Celinha por toda a amizade, apoio e motivação que me deram ao longo do mestrado. Obrigado por estarem sempre presentes. Sem vocês esta caminhada teria sido mais difícil;

Ao meu namorado, Zezinho, por toda paciência, compreensão, apoio e encorajamento;

Por fim, mas não menos importante, queria agradecer aos meus pais por toda a compreensão, dedicação, incentivo prestado ao longo destes anos. Obrigado pais, sem vocês não teria chegado até aqui e não seria a pessoa que sou hoje.

A todos agradeço com sincero sentimento.

Resumo

As microcistinas (MCT) são cianotoxinas produzidas por cianobactérias, que permanecem no interior das células até que estas lisem. As MCT têm sido repetidamente detetadas em águas naturais e responsabilizadas por eventos de toxicidade hepática em humanos e animais. A lise induzida por cianófagos, vírus específicos de cianobactérias, poderá ser um fator relevante na produção e libertação de MCT. Estes vírus só recentemente foram isolados, pelo que a sua importância em eventos de toxicidade permanece desconhecida.

Como contributo para a compreensão de processos subjacentes à presença de microcistinas em albufeiras, procedeu-se ao estudo em laboratório da produção e libertação de microcistinas por duas estirpes de *Microcystis aeruginosa*, PCC7820 (estirpe produtora de toxinas) e PCC7005 (estirpe não produtora de toxinas), antes e depois da sua infeção por cianófagos Ma-LEZ01. Ensaiou-se previamente um método da deteção de microcistinas LR, RR e YR por LC-ESI-MS/MS, que foi posteriormente utilizado na monitorização da infeção viral. Os resultados obtidos revelaram a deteção da variante LR ao longo dos 139 dias de crescimento das culturas de PCC7820 e PCC7005. Embora a quantidade desta variante detetada em PCC7005 seja muito menor que a detetada em PCC7820, regista-se a sua presença, uma vez que esta estirpe é considerada como sendo uma estirpe de *M. aeruginosa* não produtora de toxinas. A deteção da produção e libertação de MCT-LR nesta cultura foi também verificada na presença de cianófagos Ma-LEZ01, sendo libertada em maiores quantidades do que na sua ausência. As experiências com o cianófago Ma-LEZ01 em culturas de PCC7820 sugerem ser este cianófago lisogénico ou pseudolisogénico para esta estirpe, sem contudo afetar significativamente a quantidade de MCT_LR produzida e libertada. A análise em LC-ESI-MS/MS revelou-se uma ferramenta analítica útil na deteção, identificação e quantificação de variantes de microcistinas, podendo vir a ser aplicada ao estudo de subprodutos da sua degradação.

Palavras chave: LC-ESI-MS/MS, SPE, cianobactérias, cianófagos, microcistinas, cianotoxinas

Abstract

Microcystins (MCT) are cyanotoxins produced by cyanobacteria, known to be intracellular and only released upon cell lysis. MCT have been repeatedly detected in natural waters and blamed for liver toxicity events in humans and animals. Cell lysis induced by cyanophage infection of cyanobacteria might play a major role in toxin production and release. Cyanophages are viruses specific to cyanobacteria, only recently isolated and their role on toxicity events is still unknown.

In order to contribute to the understanding of processes underlying the presence of MCT in natural waters, production and release of MCT was studied in laboratory cultures of two strains of the species *Microcystis aeruginosa*. Namely cultures of the MCT producing strain, PCC 7820 and of the non-producing strain, PCC 7005, where monitored before and after their infection by cyanophage Ma-LEZ01. This study started with the implementation of a LC-ESI-MS/MS method for the detection of the variants MCT_LR, RR and YR, in order to be used in the monitoring of viral infection impact. The results showed the presence of MCT-LR over the 139 days of growth of *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7005. Although the amount of MCT-LR detected in PCC 7005 is much lower than the registered for PCC 7820, it was noticeable since this strain is considered as a non-producing strain. The production of MCT-LR in this culture was also observed in the presence of cyanophages Ma-LEZ01, but only the release was enhanced by phage infection. Results suggest that phage Ma-LEZ01 is lysogenic or pseudolysogenic to *M. aeruginosa* PCC 7820, without significant influence on the amount of MCT-LR produced and released. LC-ESI-MS/MS was proven as a useful analytical tool for the detection, identification and quantification of MCT variants, with the possibility of being used in future studies for the identification of MCT degradation subproducts.

Keywords: LC-ESI-MS/MS, SPE, cyanobacteria, cyanophage, microcystins, cyanotoxins

Lista de abreviaturas

a.a : aminoácidos

ADDA: ácido 2S,3S,8S,9S-3-amino9-metoxi2,6,8-trimetil10-fenildeca4E,6E-dienoico

APCI: Ionização química a pressão atmosférica (Atmospheric-pressure chemical ionization)

C18: Cadeias de alquil silanos

C8: Cadeias de octil sílica

CH₂CN: Acetonitrilo

CH₂O₂: Ácido fórmico

CH₃OH: Metanol

CIMA: Centro de Investigação Marinha e Ambiental

CRM: Modelo da carga residual (Charged Residual Model)

d.c.: Densidade celular

d.o.: Densidade ótica

Da: Daltons

DAD: Detetores de matriz de fotodíodos (Diode-Array Detectors)

D_M: Coeficiente de difusão na fase móvel

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EFM: Microscopia de epifluorescência (Epi-fluorescence Microscope)

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ESI: Ionização por *electrospray* (Electrospray Source Ionization)

FC: Citometria de fluxo (Flow Cytometry)

FR: Radiofrequência

H: Altura equivalente a um prato teórico

HPLC: Cromatografia líquida de alta pressão (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta pressão com detecção de diodos (High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector)

HPLC-UV: Cromatografia líquida de alta pressão com detecção UV (High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet)

ICTV: Comité internacional em taxonomia de vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses)

IDM: Modelo de dessorção de iões (Ion-Desorption Model)

IT: Armadilha de iões (Ion trap)

K': Fator de capacidade

K_D: Constante de distribuição de Nernst

L: Comprimento da coluna

L: Leucina

LC-ESI-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em modo MS/MS com fonte de ionização por *electrospray*

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em modo MS/MS (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

LD: limite de deteção

MALDI: Dessorção/ionização com laser auxiliada por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MCT: Microcistinas

MCT-LR: Microcistina LR

MCT-MIX: Mistura das variantes LR, YR e RR de microcistinas

MCT-RR: Microcistina RR

MCT-YR: Microcistina YR

MMPB: ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutirico (2-Methyl-3-Methoxy-4-Phenylbutyric acid)

MOI: Mutiplicidade de infeção (Multiplicity of infection)

MRM: Monitorização de múltiplas reações (Multiple Reaction Monitoring)

MS/MS: Espectrometria de massa em modo massa/massa (*tandem* Mass Spectrometry)

MS: Espectrometria de massa (Mass Spectrometry)

N: Pratos teóricos

NMR: Ressonância magnética nuclear (Nuclear Resonance Magnetic)

NRPS: Péptidos sintetases não ribossomais (Non-Ribosomal Peptide Synthetases)

PCC: Coleção de culturas Pasteur (Pasteure Culture Collection)

PFU: Unidades formadoras de placas (Plaque-Forming Unit)

PKS: policetos sintetases (Polyketide Synthases)

PP1: Proteínas fosfatase 1

PP2: Proteínas fosfatase 2

R: Arginina

RP: Fase reversa (Reverse Phase)

R_S: Resolução

SIM: Monitorização de ião simples (Single Ion Monitoring);

SPE: Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction)

T'_R: Tempo de retenção ajustado

TEM: Microscopia de transmissão electrónica (Transmission Electron Microscopy)

TFA: Ácido trifluoroacético (Trifluoracetic Acid)

TIC: Corrente total de iões (Total Ion Current)

TLC: Cromatografia em camada fina (Thin Layer Chromatography)

T_M: Tempo morto

T_R: Tempo de retenção

u.m.a: Unidades de massa atómica

Uv: Ultravioleta

Vis: Visível

VLP: Partículas semelhantes a vírus (Virus Like Particles)

W: Largura da banda

W_{1/2}: Largura da banda à meia altura

Y: Tirosina

Lista de figuras

Capítulo II

Figura 2.1 – Formação de escumas à superfície da água na albufeira do Funcho, Algarve, Portugal (**Reis, M., 2005**);

Figura 2.2 – Estrutura geral de uma microcistina (imagem adaptada de **Ferrati, P. et al, 2009**);

Figura 2.3 – Modelo proposto para a organização do conjunto de genes da microcistina sintetase, *mcyABCDEFGHIJ*;

Figura 2.4 - Esquematização da extração em fase sólida (imagem adaptada de **Sigma-Aldrich Co.**);

Figura 2.5 – Seletividade e sensibilidade de alguns dos métodos de deteção das microcistinas (Imagem adaptada de **Msagati, T., et al, 2006**).

Capítulo III

Figura 3.1 – Tipos de ciclo de replicação dos cianófagos (imagem adaptada de **Weinbauer, M., 2004**);

Figura 3.2 – Esquema explicativo das vias de regulação da lisogenia em bacteriófagos temperados.

Capítulo IV

Figura 4.1 – Representação esquemática de uma separação cromatográfica de dois componentes, A e B, de uma mistura (imagem adaptada de **Harris, D., 2005**);

Figura 4.2 – Representação gráfica do sinal do detetor em função da concentração de analíto detetada ao longo do tempo (imagem adaptada de **Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**);

Figura 4.3 – Representação gráfica do sinal do detetor em função do tempo de eluição de dois compostos de uma mistura e alguns parâmetros cromatográficos que influenciam a separação, nomeadamente, tempo morto (t_M), tempo de retenção (t_R), tempo de retenção ajustado (t'_R), largura do pico (w) e a largura do pico à meia altura ($W_{1/2}$) (imagem adaptada de **Meyer, V., 2004**);

Figura 4.4 – Fatores de resolução em função da sobreposição de bandas cromatográficas. A) Péssimo R_s em virtude da sobreposição total de duas bandas, B) Bom R_s em virtude da não sobreposição das duas bandas (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**);

Figura 4.5 – Representação esquemática de um equipamento de HPLC (imagem adaptada de **Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000; Degani, A., et al, 1998**);

Figura 4.6 - Esquematização da estrutura geral química de uma fase estacionária de matriz siliciosa (imagem adaptada de **Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**);

Figura 4.7 – Exemplificação de um espectro de UV 3D, em que o perfil cromatográfico para cada componente da amostra varia de acordo com a absorvância, tempo de eluição e com os comprimentos de onda monitorizados (imagem adaptada de **Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**);

Figura 4.8 – Esquematização dos constituintes básicos de um espectrômetro de massa;

Figura 4.9 – Sessão transversal de um dispositivo de ionização por *electrospray* (imagem adaptada de **Dass, H., 2007**);

Figura 4.10 - Modelo de ionização por *electrospray*. A) Modelo do resíduo carregado, CRM e B) Modelo da dessorção de iões, IDM (**Souza, L., 2008**);

Figura 4.11 – Sessão transversal de um analisador *Ion Trap* (imagem adaptada de **March, R., 1997**);

Figura 4.12 – Representação esquemática de díodos contínuos (imagem adaptada de **Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007**);

Figura 4.13 – Esquematização da formação de um espectro de MS/MS de um ião-fragmentado a partir do seu ião precursor (imagem adaptada de **Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007**);

Figura 4.14 – Sessão transversal de um espectrômetro de massa *tandem* com analisador *ion trap* (imagem adaptada de **Bruker Daltonics, 2004**);

Figura 4.15 – Esquematização da formação de um ião-fragmentado a partir do seu ião precursor por um *ion trap*-MS/MS (imagem adaptada de **Bruker Daltonics, 2004**).

Capítulo V

Figura 5.1 - Sistema de HPLC *Agilent Technologies* modelo 1200, acoplado ao espectrômetro de massa *Bruker Daltonics HCT ultra*;

Figura 5.2 – Espectros de MS em *full scan* da solução padrão de trabalho de MCT_MIX de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B);

Figura 5.3 – Espectros de MS em *full scan* da mistura metanol:água (70:30, v/v) obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B);

Figura 5.4 – Espectros de MS/MS da solução padrão de trabalho de MCT_LR de 600 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B);

Figura 5.5 – Espectros de MS/MS da solução padrão de trabalho de MCT_YR de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B);

Figura 5.6 – Espetros de MS/MS da solução padrão de trabalho de MCT_RR de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B);

Figura 5.7 – Cromatograma (A) e espectro de MS/MS (B) obtidos por injeção *on-line* no sistema de HPLC de 5 µL de solução padrão de trabalho de MCT_LR de 600 µg/L em modo de ionização ESI negativo;

Figura 5.8 – Cromatograma (A) e espectros de MS (B) obtidos por injeção *on-line* no sistema de HPLC de 10 µL de solução padrão de trabalho de MCT_MIX de 500 µg/L em modo de ionização ESI negativo;

Figura 5.9 – Cromatograma modo de deteção MRM (A) e espectro de MS/MS (B) obtidos por injeção *on-line* no sistema de HPLC de 10 µL de solução padrão de trabalho de MCT_MIX de 500 µg/L, com modo de ionização ESI negativo;

Figura 5.10 – Esquematização do procedimento de extração de microcistinas LR a partir de amostras de águas efetuado de acordo com o método Lawton, L. *et al*, 1994;

Figura 5.11 – Esquematização do procedimento de extração de microcistinas LR a partir de amostras de águas efetuado de acordo com o método Mekebri, A. *et al*, 2009;

Figura 5.12 – Esquematização do procedimento de extração de microcistinas LR a partir de amostras de águas efetuado de acordo com o método Ferranti, P. *et al*, 2009.

Capítulo VI

Figura 6.1 – Culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 em crescimento em balões Erlenmeyer de 1 L (A) e em frascos de cultura de poliestireno de 1L (B) no fitoclima;

Figura 6.2 – Delineamento experimental para a monitorização do crescimento e da produção e libertação de microcistinas de culturas de *M. aeruginosa*, PCC 7820 e PCC 7005;

Figura 6.3 – Delineamento experimental para a monitorização do crescimento e da produção e libertação de microcistinas de culturas de *M. aeruginosa*, PCC 7820 e PCC 7005 após infeção viral com cianófagos Ma-LEZ01;

Figura 6.4 – Espectro de absorção traçado de 10 em 10 nm, entre os 350 nm e os 800 nm, para um dos triplicados biológicos de *M. aeruginosa* PCC 7820. As setas a preto indicam os picos referentes à absorção de clorofila *a* e a seta cinzenta o pico referentes à deteção de outro pigmento fotossintético;

Figura 6.5 – Espectro de absorção contínuo traçado de 10 em 10 nm, entre os 350 nm e os 800 nm, obtido para um dos triplicados biológicos de *M. aeruginosa* PCC 7005. As setas a preto indicam os picos referentes à absorção de clorofila;

Figura 6.6 – Monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7820 (A1 e A2) e de *M. aeruginosa* PCC 7005 (B1 e B2) a 680 nm (A1 e B1) e a 730 nm (A2 e B2), com representação dos valores médios ($n = 3$) e dos respetivos erros padrão. Verifica-se em algumas situações a omissão dos erros padrão, por serem ínfimos;

Figura 6.7 – Evolução da densidade celular (número de células/L) e do biovolume (mm^3/L) das culturas *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) e PCC 7005 (B) ao longo de 70 dias, com representação dos valores médios ($n=3$) e dos respectivos erros padrão. Verifica-se em algumas situações a omissão dos erros padrão, por serem ínfimos;

Figura 6.8 – Fotografias em microscopia de epifluorescência de amostras de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005, recolhidas ao 7º dia (A) e ao 70º dia (B) de cultivo, observadas com uma ampliação de 787.5x e visualizadas com filtro verde;

Figura 6.9 – Regressão linear obtida entre os valores de d.o. e de d.c (A) e entre os valores de d.o. e biovolume (B) obtidos para *M. aeruginosa* PCC 7820 quando esta se encontrava em crescimento equilibrado;

Figura 6.10– Intensidade do sinal do branco da amostra (A), de cada variante de MCT detetada no sobrenadante (B) e no *pellet* (C) de um replicado biológico de *M. aeruginosa* PCC 7820 ao 7º dia de cultivo e dos padrões de MCT-MIX, 50 $\mu\text{g/L}$ (D) e de 500 $\mu\text{g/L}$ (E);

Figura 6.11– Intensidade do sinal do branco da amostra (A), de cada variante de MCT detetada no sobrenadante (B) e no *pellet* (C) de um replicado biológico de *M. aeruginosa* PCC 7005 ao 7º dia de cultivo e dos padrões de MCT-MIX, 50 $\mu\text{g/L}$ (D) e de 500 $\mu\text{g/L}$ (E);

Figura 6.12 – Estabilidade do sistema de LC-ESI-MS/MS ao longo da análise de todas as amostras, determinada através da intensidade do sinal registada em função da concentração de cada uma das variantes de microcistinas detetadas numa solução padrão de MCT-MIX de 50 $\mu\text{g/L}$ (A) e de MCT-MIX de 500 $\mu\text{g/L}$ (B) ao longo dos seis pontos de amostragem;

Figura 6.13 – Quantidade de MCT-LR total produzida e libertada por *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) e por *M. aeruginosa* PCC 7005 (B) ao longo de 70 dias de cultivo. e Quantidade de MCT-LR determinada no sobrenadante e no *pellet* (A1 e B1). Para comparação, apresenta-se também a d.c. estimada ao longo dos 70 dias de cultivo;

Figura 6.14 – Monitorização do crescimento a 680 nm de *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) e *M. aeruginosa* PCC 7005 (B) na presença e na ausência de cianófagos Ma-LEZ01;

Figura 6.15 – Quantidade de MCT-LR presente no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 na ausência e na presença de cianófagos. A infeção viral foi monitorizada antes da infeção e 31 dias depois da infeção;

Figura 6.16 – Quantidade de MCT-LR presente no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 na ausência e na presença de cianófagos. A infeção viral foi monitorizada antes da infeção e 31 dias depois da infeção.

Lista de tabelas

Capítulo II

Tabela 2.1 – Classificação das cianotoxinas de acordo com a sua função e mecanismo de ação (adaptado de **Mankiewicz, J., et al, 2003**);

Tabela 2.2 – Classificação de algumas cianotoxinas de acordo com a sua estrutura química (**Sivonen, K., & Jones, G., 1999; Rastogi, R. & Rajeshwar, S., 2009**).

Capítulo IV

Tabela 4.1 – Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com critérios analíticos composta a partir de **Harris, D., 2005; Rouessac, F. & Rouessac, A. 2000; Scott, R., 2003**;

Tabela 4.2 – Força eluente dos solventes usados como fases estacionárias de uma cromatografia de fase normal ou de fase reversa (tabela adaptado de **Rouessac & F., Rouessac, A., 2000**);

Tabela 4.3 - Fontes de ionização e os respetivos agentes de ionização atualmente utilizadas em LC-MS (Tabela adaptada de **Skoog, D., et al 2001**);

Tabela 4.4 – Iões típicos produzidos por ionização *electrospray* (**Waters Marketing**);

Tabela 4.5 – Analisadores de massa atualmente utilizados na espetrometria de massa (Tabela adaptada de **Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007**);

Tabela 4.6 – Detetores de massa atualmente utilizados na espetrometria de massa (Tabela adaptada de **Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007**).

Capítulo V

Tabela 5.1 – Parâmetros de MS/MS otimizados para as variantes LR, RR e YR de microcistinas;

Tabela 5.2 – Gradiente de eluição otimizado para a análise cromatográfica de MCT_LR, de acordo com Mekebri A. *et al*, 2009;

Tabela 5.3 - Gradiente de eluição ajustado para a análise de LC-ESI-MS/MS de uma mistura de 3 microcistinas, nomeadamente MCT_LR, YR e RR;

Tabela 5.4 – Parâmetros de MS e MS/MS ajustados para para a análise de LC-ESI-MS/MS de uma mistura de 3 microcistinas, nomeadamente MCT_LR, YR e RR;

Tabela 5.5 – Percentagens de recuperação (%) obtidas em função do método de extração de MCT_LR testado;

Figura 5.6 - Percentagens de recuperação (%) obtidas em função da fase estacionária cartuchos de SPE testados.

Capítulo VI

Tabela 6.1 – Dimensões celulares das estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* ao longo dos 70 dias de cultivo;

Tabela 6.2 – Taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação de *M. aeruginosa* PCC 7820 calculados com base nos valores de d.o., d.c. e biovolume;

Tabela 6.3 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7820 (1:10, v/v) obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo;

Tabela 6.4 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo;

Tabela 6.5 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005 obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo.

Tabela 6.6 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo;

Tabela 6.7 – Taxas de crescimento celular e tempos de duplicação de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005 na ausência e na presença de cianófagos Ma-LEZ01;

Tabela 6.8 – Teste *t student* de hipóteses aplicado a dados emparelhados relativos aos tempos de duplicação calculados para *M. aeruginosa* PCC 7820 e para *M. aeruginosa* PCC 7005 na ausência e na presença de cianófagos Ma-LEZ01;

Tabela 6.9 – Interpolação dos valores de d.c. de *M. aeruginosa* PCC 7820 na ausência e na presença de cianófagos Ma-LEZ01 ao longo da infecção;

Tabela 6.10 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7820 (diluído de 1:10, v/v) antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos.

Tabela 6.11 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos;

Tabela 6.12 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005 antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos;

Tabela 6.13 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos;

Tabela 6.14 – Teste de hipóteses *t student* aplicado à quantidade de MCT-LR total produzida e libertada, no fim da monitorização, por *M. aeruginosa* PCC 7820 e por *M. aeruginosa* PCC 7005 quer na ausência quer na presença de cianófagos Ma-LEZ01.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Lista de Abreviaturas	IV
Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas	VIII
Índice	X
Capítulo I. Enquadramento geral e objetivos	1
1.1 Breve descrição da problemática em estudo.....	1
1.2 Objetivo geral e objetivos específicos	3
Capítulo II. Cianobactérias e as suas toxinas	5
2.1 Cianobactérias	5
2.1.1 Florescências de cianobactérias	6
2.1.2 Cianotoxinas	8
2.2. Microcistinas	11
2.3. Métodos de análise de microcistinas	14
2.3.1 Preparação das amostras para a deteção de microcistinas.....	14
2.3.1.1 Extração	14
2.3.1.2 Concentração.....	15
2.3.2 Deteção e quantificação de microcistinas	16
2.3.2.1 Métodos biológicos	17
2.3.2.2 Métodos bioquímicos	17
2.3.2.3 Métodos analíticos.....	18
Capítulo III. Os cianófagos como fatores biológicos condicionantes da produção de microcistinas em cultura.....	20
3.1 Cianófagos	20
3.1.1 Características gerais	21
3.1.2 Ciclo de replicação	23
3.2 Considerações ecológicas – Interações entre cianófagos, cianobactérias e cianotoxinas	26
Capítulo IV. LC-MS/MS – Estado da arte.....	29
4.1 Cromatografia	30
4.1.1 Classificação dos métodos cromatográficos	31
4.1.2 Cromatograma	31
4.1.3 Fatores que influenciam a separação cromatográfica	32
4.2 Cromatografia de alta eficiência	37
4.2.1 Esquematização geral de um sistema de HPLC	37
4.2.2 Fase estacionária	38
4.2.3 Colunas	39
4.2.4 Fase móvel	40
4.2.5 Processo de eluição	40
4.2.6 Bombas.....	41
4.2.7 Injetores	42
4.2.8 Detetores	42
4.2.8.1 Detetores espectrofotométricos	43
4.2.8.2 Deteção por espectrometria de massa	44
4.3 Espectrometria de massa	45
4.3.1 Fundamentos teóricos	45
4.3.2 Esquematização geral de um sistema de espectrometria de massa associado à cromatografia líquida	45

4.3.2.1 Fonte de ionização	46
4.3.2.1.1 Ionização por <i>electrospray</i>	47
4.3.2.2 Analisadores de massa	49
4.3.2.2.1 Analisadores quadrupolares de captura de íons – Ion trap	50
4.3.2.3 Detetores	51
4.3.2.3.1 Detetor multiplicador de eletrões	52
4.4 Espetrometria por análise MS/MS	53
4.5 LC-MS/MS	55
Capítulo V. Ensaio de um método de análise de microcistinas por LC-ESI-MS/MS	57
5.1 Materiais.....	57
5.1.1 Reagentes e soluções padrão	57
5.1.2 Consumíveis analíticos.....	58
5.2 Equipamentos	58
5.3 Métodos.....	59
5.3.1 Otimização de um método de análise de microcistinas por LC-ESI-MS/MS	59
5.3.1.1 Preparação das soluções padrão de trabalho	60
5.3.1.2 Otimização dos parâmetros de MS e MS/MS	60
5.3.1.3 Otimização das condições cromatográficas	67
5.3.1.4 Otimização do método de LC-ESI-MS/MS	68
5.3.2 Seleção e otimização do método de extração	71
5.3.3 Estabelecimento do método de extração	76
Capítulo VI. Estudo de fatores biológicos eventualmente condicionantes da produção de microcistinas em cultura.....	78
6.1 Introdução	78
6.2 Materiais e Métodos	78
6.2.1 Culturas de cianobactérias e cianófagos	78
6.2.2 Cultivo e manutenção das culturas	79
6.2.3 Desenho experimental	81
6.2.3.1 Monitorização do crescimento e libertação de cianotoxinas em cultura	81
6.2.3.2 Monitorização da produção e libertação de microcistinas após infeção viral com cianófagos	84
6.3 Tratamento de dados	86
6.4 Resultados	86
6.4.1 Monitorização do crescimento e libertação de microcistinas em cultura.....	86
6.4.1.1 Espectros de absorção.....	86
6.4.1.2 Monitorização do desenvolvimento de <i>M. aeruginosa</i>	88
6.4.1.2.1 Densidade ótica	88
6.4.1.2.2 Densidade celular e biovolume	89
6.4.1.2.3 Taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação	92
6.4.1.3 Produção e libertação de microcistinas	94
6.4.2 Monitorização da produção e libertação de microcistinas após infeção viral com cianófagos	108
6.4.2.1 Monitorização do desenvolvimento de <i>M. aeruginosa</i>	108
6.4.2.2 Produção e libertação de microcistinas	112
6.5 Discussão	119
6.5.1 Monitorização do crescimento das culturas de PCC 7820 e PCC 7005	119
6.5.2 Monitorização da produção de microcistinas em cultura	123
6.5.3 Impacto da infeção por cianófagos na produção e libertação de microcistinas	125
Capítulo VII. Considerações finais.....	128
Capítulo VIII. Referências bibliográficas	131
Anexo I	I-1

Capítulo I

Enquadramento geral e objetivos

1.1 Breve descrição da problemática em estudo

Os recursos hídricos são um bem essencial a todas as formas de vida na Terra, no entanto, tendem a constituir-se como um bem escasso. As múltiplas atividades humanas, quer seja a produção de energia hidroelétrica, o uso industrial, recreativo e rega, ou até mesmo a produção de água de consumo, introduzem condicionantes na quantidade de água disponível assim como na sua qualidade (**Sobrino C. et al, 2004; Codd G., 2000; Rosenberg. D., 2000**).

A qualidade das águas superficiais é condicionada por diversos fatores ambientais abióticos e biológicos sujeitos a variação espacial e temporal. Nomeadamente, a ocorrência de processos de eutrofização resulta da aceleração descontrolada do processo natural de produção biológica desencadeada pelo aumento dos níveis de nutrientes (**Mur, L., et al 1999**). Compostos azotados e fosfatados, quer os drenados por escorrências difusas a partir de terrenos agrícolas em meio rural, quer os libertados em descargas de esgotos domésticos e industriais, têm sido identificados como principais fontes de eutrofização que afetam a qualidade das águas superficiais e em particular a das albufeiras. Estas, de acordo com a classificação prevista na Diretiva Quadro da Água, constituem massas de água fortemente modificadas por resultarem do represamento artificial de águas fluviais (**DC 2000/60/CE**). A presença de nutrientes associados a boas condições de luz e temperatura, têm sido relacionadas com a ocorrência de florescências de cianobactérias em albufeiras e escumas à superfície da água (**Briand, J. et al, 2003**).

Na realidade, o desenvolvimento de florescências de cianobactérias nestes lagos artificiais resulta de desequilíbrios nas suas comunidades fitoplantónicas, que permitem o rápido crescimento celular de uma ou outra espécie. As espécies de cianobactérias produtoras de toxinas ou de outros metabolitos secundários não parecem apresentar uma clara vantagem competitiva em relação às espécies não produtoras,

ainda que a predação de cianobactérias tóxicas por larvas de peixes, moluscos e microcrustáceos possa ser inibida (**Ibelings, B. & Chorus, I., 2007**).

O predomínio de espécies produtoras de toxinas, em massas de água fortemente modificadas, desencadeia impactos negativos ao nível das características organolépticas da água, das qualidades paisagísticas, da biodiversidade aquática e terrestre, incluindo morte extensiva de peixes, aves, animais domésticos e peridomésticos. Estes impactos negativos têm posteriormente repercussões significativas em termos agrícolas, recreativos, económicos e de forma mais preocupante em termos de saúde pública (**Ibelings, B. & Chorus, I., 2007**).

Tratando-se de endotoxinas, a libertação de cianotoxinas resulta sobretudo da lise celular durante o processo de senescência da florescência (**Chorus, I. & Bartram, J., 1999**). A presença de cianotoxinas nas massas de água para consumo humano pode causar graves problemas de saúde pública, tanto pela ingestão de água contaminada como pelo contacto direto em atividades de carácter recreativo ou até mesmo pelo consumo de peixe contaminado (**Mur L. et al, 1999**).

As cianotoxinas são quimicamente variáveis, com mecanismos de toxicidade muito específicos. De acordo com os efeitos adversos que provocam, podem ser classificadas como *irritantes ao contacto*, quando causam irritabilidade cutânea, *neurotoxinas*, quando afetam o sistema nervoso central e como *hepatotoxinas*, quando atuam a nível hepático (**Sivonen K. & Jones G., 1999**). Para além destes efeitos nocivos, as cianotoxinas têm sido reportadas na literatura como responsáveis por intoxicações gastrointestinais, hepatites, promoção tumoral e até mesmo morte de várias pessoas após tratamentos de hemodiálise com recurso a águas contaminadas (**Svircev, Z., et al, 2009; Pouria, S., et al, 1998**).

Entre as hepatotoxinas, as microcistinas (MCT), produzidas por diversos géneros de cianobactérias, têm sido frequentemente associadas a graves efeitos na saúde pública como os acima descritos, uma vez que são frequentemente detetadas em massas de água fortemente modificadas (**Sivonen K. & Jones G., 1999**).

A deteção de microcistinas em massas de água fortemente modificadas, é frequentemente efetuada de forma rápida com recurso a métodos imunológicos, nomeadamente por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Métodos analíticos, como a cromatografia líquida de alta resolução com deteção UV (HPLC-UV) e mais recentemente a cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa em modo

MS/MS (LC-MS/MS) também têm vindo a ser empregues na sua quantificação (**Barco, M., et al, 2005; Sangolkar L. et al, 2006**).

A presença de microcistinas em albufeiras parece resultar de fenómenos complexos e pouco compreendidos e não de um simples processo artificial de eutrofização antrópica dessas massas de água (**Reis, M., 2005**). O enriquecimento em nutrientes pode condicionar fortemente o desenvolvimento de florescências fitoplanctónicas favorecendo as cianobactérias, mas também foram detetadas cianotoxinas em sistemas lagunares sem qualquer tipo de influência de atividades antrópicas (**Mez, K. et al, 1997**). Desta forma, as florescências tóxicas de cianobactérias parecem ser também condicionadas por outras variáveis ecofisiológicas, ainda mal compreendidas (**Mesquita, S. et al, 2002; Galvão, H. et al, 2008**). Desconhece-se por exemplo o papel da infeção por vírus específicos de cianobactérias (cianófagos), que ao lisarem as células poderão contribuir para a libertação deste tipo de endotoxinas.

De modo a contribuir para a compreensão do papel de variáveis biológicas eventualmente condicionantes da presença de microcistinas em massas de água fortemente modificadas, procedeu-se ao estudo em laboratório da produção e libertação de microcistinas por culturas de *Microcystis aeruginosa*, antes e após a sua infeção por cianófagos. Para que este estudo fosse efetuado, foi necessário implementar primeiramente um método de deteção de microcistinas por LC-ESI-MS/MS, que foi posteriormente utilizado na monitorização desta infeção viral.

1.2 Objetivo geral e objetivos específicos

O trabalho experimental conducente à presente dissertação visa, pois, contribuir para a compreensão dos processos subjacentes ao desenvolvimento de florescências tóxicas de cianobactérias, através do estudo do papel da infeção viral de culturas de *Microcystis aeruginosa* na produção e libertação de microcistinas.

Para tal foram delineados dois objetivos principais: (i) Ensaio de um método de análise de algumas variantes de microcistinas por LC-ESI-MS/MS, de modo a identificá-las em culturas; (ii) monitorização da produção e da libertação de microcistinas ao longo do crescimento de culturas de *M. aeruginosa* antes e depois da infeção por cianófagos.

De forma a atingir estes objetivos estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos a alcançar:

- Otimizar os parâmetros de aquisição MS/MS através de injeção direta de concentrações conhecidas do padrão de MCT_LR;
- Otimizar os parâmetros de aquisição de cromatografia líquida através da realização de análises cromatográficas de concentrações conhecidas do padrão certificado de MCT_LR;
- Otimizar o método de análise por LC-ESI-MS/MS através de injeções *on-line* de uma mistura de padrões certificados de MCT de concentrações conhecidas, utilizando os parâmetros anteriormente ajustados;
- Definir o método de extração de microcistinas através da realização de testes preliminares conducentes à escolha dos solventes e matriz de extração em fase sólida;
- Aplicar o método ao estudo de fatores biológicos potencialmente condicionantes da produção e libertação de microcistinas em cultura, nomeadamente à infeção por cianófagos;
- Avaliar quantitativamente o crescimento celular de *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e *Microcystis aeruginosa* PCC 7005, na presença e ausência de cianófagos, através da densidade ótica, da densidade celular e do seu biovolume;
- Detetar, por LC-ESI-MS/MS, as variantes de MCT produzidas e libertadas por *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e *Microcystis aeruginosa* PCC 7005 na presença e ausência de cianófagos;
- Estimar a quantidade de MCT produzidas e libertadas por *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 na presença e ausência de cianófagos.

Capítulo II

Cianobactérias e suas toxinas

A qualidade das águas superficiais pode ser condicionada por fatores ambientais e biológicos que variam de diferentes formas ao longo do tempo (Mur, L. & *et al* 1999). Nestas massas de água, os compostos azotados e fosfatados, associados a boas condições de radiação e temperatura parecem promover o desenvolvimento de florescências tóxicas de cianobactérias em albufeiras por vezes com formação de escumas à superfície da água (Mur, L. & *et al* 1999; Briand, J. *et al*, 2003). Neste sentido, o presente capítulo pretende dar a conhecer as cianobactérias assim como as microcistinas a fim de se compreender a relação com os fatores ambientais e biológicos que as afetam.

2.1. Cianobactérias

As cianobactérias, vulgarmente conhecidas por algas verde-azuis, existem na Terra há cerca de 3,5 biliões de anos. Registos fósseis evidenciam que microrganismos procariontes e fotoautotróficos oxigénicos, existentes principalmente em meios aquáticos, tiveram um papel determinante na evolução da atmosfera oxidante do nosso planeta (Schopf, J.,1993; Mur, L. *et al*, 1999). Durante muito tempo as cianobactérias foram incluídas na Sistemática e Taxonomia Botânica e classificadas como pertencentes à classe *Cyanophyceae*. Esta classificação surgiu em virtude deste grupo de microrganismos apresentar como pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, β -caroteno e ficobilinas, nomeadamente *c*-ficocianina, alloficocianina e *c*-ficoeritrina (Briand, J. *et al*, 2003; Mehra, S. *et al*, 2009). Hoje em dia, apesar de se reconhecer que as cianobactérias são bactérias Gram-negativas que pertencem à classe *Cyanobacteria*, os ficologistas e os investigadores, por razões práticas, ainda as identificam com recurso à Sistemática Botânica (Mur, L. *et al*, 1999).

Durante a fotossíntese as cianobactérias libertam oxigénio através de duas reações fotoquímicas reguladas pelo fotossistema I (PSI) e pelo fotossistema II (PSII). Os pigmentos fotossintéticos, com exceção das ficobilinas, estão localizados nas

membranas que podem formar, como nos cloroplastos, lamelas e tilacoides (**Wolk, C., 1973**).

Em termos morfológicos, as cianobactérias são altamente diversificadas. Podem assumir formas unicelulares ou coloniais filamentosas ou não (**Briand, J. et al, 2003**). Alguns géneros filamentosos de cianobactérias apresentam células vegetativas diferenciadas, os heterocistos. Estes permitem uma maior atividade do enzima nitrogenase e a fixação de azoto molecular. Na maioria das cianobactérias filamentosas também se observa a presença de acinetos, estruturas de resistência. Estas estruturas são especializadas no armazenamento de reservas alimentares. A formação de vesículas gasosas - aerótopos – em inclusões citoplasmáticas cilíndricas, proporciona a regulação da flutuação de algumas espécies na coluna de água (**Mur, L. et al, 1999**). A presença de uma substância gelatinosa que recobre totalmente ou parcialmente as cianobactérias, designada por bainha de mucilagem, evita a dissecação das células (**Wolk, C., 1973**).

2.1.1. Florescências de cianobactérias

As cianobactérias são consideradas um grupo de microrganismos cosmopolita, uma vez que a nível geográfico estão bem distribuídas. Desde o polo norte ao polo sul, expandem-se por diversos tipos de ambientes aquáticos e terrestres, quer na forma livre quer em associação com fungos, protozoários ou plantas (**Mankiewicz, J. et al, 2003**). Nos meios aquáticos, especialmente nos de água doce, as cianobactérias pertencem ao fitoplâncton, atuando como produtores primários (**Briand, J. et al, 2003**). Quando estes ecossistemas apresentam temperaturas entre 15 e 30 °C, pH compreendido entre 6 e 9, adequada intensidade de radiação e eutrofização, o aumento da densidade celular de cianobactérias é favorecido. Devido ao seu metabolismo versátil e à sua capacidade de adaptação estrutural e enzimática, as cianobactérias conseguem estar em vantagem competitiva e formar florescências ou *blooms* (**Fernandes, V. et al, 2009**). Fluxos de água com elevada turbulência podem ser evidentemente desfavoráveis ao crescimento de cianobactérias, por condicionarem a sua posição na coluna de água e impedirem a sua concentração. Pelo contrário, grandes tempestades podem causar a lixiviação dos terrenos com escorrências superficiais carregadas de nutrientes que favorecem a formação de florescências de cianobactérias (**WHO, 1998**).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) os *blooms* de cianobactérias ocorrem normalmente no final do verão ou no início do outono e são mais frequentes em sistemas de águas eutróficos ou hipertróficos (WHO, 1998). Contudo, nas albufeiras do Algarve os *blooms* de cianobactérias ocorrem preferencialmente na estação seca ou seja no final da primavera, no verão e no início do outono (Reis, M., 2005; Galvão, H., et al., 2008). Na verdade, o desenvolvimento de florescências de cianobactérias de um género em particular varia de região para região por diferenças na composição química dos sistemas lânticos assim como nas condições climáticas. Cianobactérias do género *Cylindrospermopsis* são normalmente detetadas em águas tropicais, enquanto cianobactérias dos géneros *Microcystis* e *Anabaena* são frequentemente detetadas em regiões temperadas (WHO, 1998). Em Portugal, ao longo dos tempos têm sido reportados na literatura episódios de desenvolvimento de florescências causados por *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, e *A. scheremetievi* (Vasconcelos, V., 1999b; Sobrino, C. et al, 2004; Reis, M., 2005; Galvão, H. et al., 2008; Galvão, H. et al., 2012). Para além destes géneros também têm sido detetadas algumas espécies de cianobactérias dos géneros *Oscillatoria*, *Planktothrix*, e *Coelosporium* (van Apeldoorn, M., et al, 2007, Galvão, H. et al., 2012). A maioria destes géneros de cianobactérias é produtora de cianotoxinas. De forma geral 50-70 % dos *blooms* de cianobactérias detetados são *blooms* potencialmente tóxicos, nos quais podem estar envolvidos vários tipos e variantes de cianotoxinas (Vasconcelos, V., 1999b). O nível de toxicidade de um *bloom* de cianobactérias é imprevisível, porque depende das espécies que o constituem assim como da concentração das cianotoxinas libertadas ao longo do espaço e do tempo. A imprevisibilidade do grau de toxicidade de qualquer *bloom* de cianobactérias torna-o potencialmente perigoso e suspeito em todos os momentos (WHO, 1998). Para além da produção de toxinas, florescências de cianobactérias podem formar escumas com diversas colorações consoante o estado de degradação dos seus pigmentos fotossintéticos, como aconteceu no início de 2002 na albufeira do Funcho, Portugal, figura 2.1 (Briand, J. et al, 2003; Reis, M., 2005). Estas florescências tóxicas de cianobactérias podem causar graves alterações nas cadeias alimentares com morte de peixes, moluscos e outros animais, comprometendo, assim, a qualidade da água quer para abastecimento público, quer para fins recreativos (Sivonen, K. & Jones, G., 1999). A gestão dos impactos negativos das florescências tóxicas de cianobactérias albufeiras pode passar pela adoção de medidas de prevenção e de mitigação, que contribuem para

a redução dos nutrientes disponíveis na água, como a gestão integrada de toda a bacia hidrográfica (WHO, 1998; Galvão, H. *et al*, 2012). Em qualquer caso a monitorização do fitoplâncton e das suas biotoxinas é essencial.



Figura 2.1 – Formação de escumas à superfície da água na albufeira do Funcho, Algarve, Portugal (Reis, M., 2005).

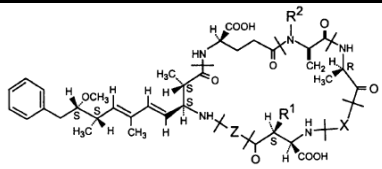
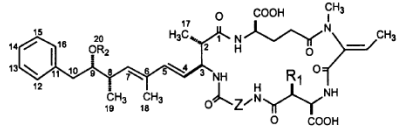
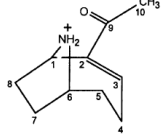
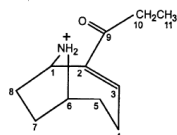
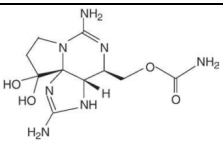
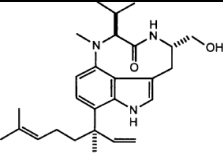
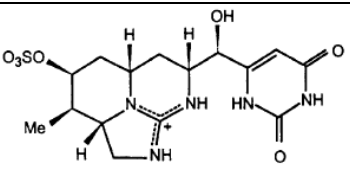
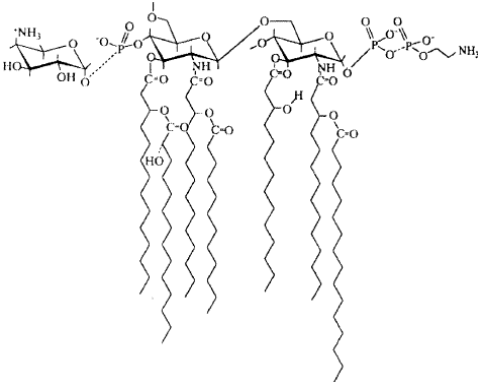
2.1.2. Cianotoxinas

As cianotoxinas são toxinas que são libertadas nas massas de água em consequência da lise celular de alguns géneros de cianobactérias (Sivonen, K. & Jones, G., 1999). Estes metabolitos secundários classificados (cf. Capítulo I) de acordo com os seus alvos biológicos em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (Mankiewicz, J., *et al*, 2003) podem também classificar-se de acordo com a sua estrutura química e os grupos funcionais que os constituem (Sivonen, K. & Jones, G., 1999), já que estes são indispensáveis à compreensão dos seus efeitos toxicológicos. Nas tabelas 2.1 e 2.2 apresentam-se as cianotoxinas classificadas de acordo com o seu efeito biológico e de acordo com a estrutura química, respetivamente. Neste trabalho abordam-se de forma mais desenvolvida as microcistinas.

Tabela 2.1 – Classificação das cianotoxinas de acordo com a sua função e mecanismo de ação (adaptado de **Mankiewicz, J., et al, 2003**).

Efeitos biológicos	Cianotoxinas	Géneros produtores	Órgãos alvo	Mecanismos de toxicidade
Hepatotoxinas	Microcistinas	<i>Microcystis, Oscillatoria, Planktothrix, Nostoc, Anabaena</i>	Fígado	Inibição da atividade da proteína fosfatase e hemorragias hepáticas
	Nodularinas	<i>Nodularia</i>	Fígado	
	Cilindrospermopsinas	<i>Cylindrospermopsis, Umezakia</i>	Fígado, Rins, Baço, Intestino, Coração, Timo	Inibição da proteína sintetase
Neurotoxinas	Anatoxina- <i>a</i>	<i>Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon</i>	Sinapse nervosa	Bloqueio da despolarização pós-sináptica
	Anatoxina – <i>a</i> (s)	<i>Anabaena</i>	Sinapse nervosa	Bloqueio da acetilcolinesterase
	Saxitoxinas	<i>Aphanizomenon, Anabaena</i>	Axónios	Bloqueio dos canais de sódio
Dermatotoxinas e Irritantes ao contacto	Lingbiatoxinas- <i>a</i>	<i>Lyngbya</i>	Pele	Ativadores da proteína quinase C e atividade inflamatória
	Lipopolissacarídeos	Todos os géneros	Todos os tecidos expostos	Irritação cutânea e alergia

Tabela 2.2 – Classificação de algumas cianotoxinas de acordo com a sua estrutura química (Sivonen, K., & Jones, G., 1999; Rastogi, R. & Rajeshwar, S., 2009).

Grupo toxico	Cianotoxinas	Estrutura química
Peptidos cíclicos	Microcistinas	
	Nodularinas	
Alcalóides	Anatoxina-a	
	Anatoxina-a (s)	
	Saxitoxinas	
	Lingbiatoxinas-a	
	Cilindrospermopsinas	
Lipopolissacarídeos	Lipopolissacarídeos	

2.2. Microcistinas

As microcistinas são cianotoxinas produzidas por cianobactérias dos géneros *Anabaena*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* e *Microcystis* (Dawson, R. 1998; Rajesh, P. *et al*, 2009). Estes metabolitos secundários, são estruturalmente heptapeptídeos de estrutura geral ciclo (-D-Alanina-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glutamato-Mdha-), em que X e Z são aminoácidos (a.a) altamente variáveis em configuração L, MeAsp é um ácido aspártico metilado em configuração D, Mdha um a.a pouco vulgar, o N-metildehidrolanina e ADDA outro a.a pouco vulgar, o ácido 2S,3S,8S,9S-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4E,6E-dienoico, como mostra a figura 2.2 (Ferrati, P. *et al*, 2009).

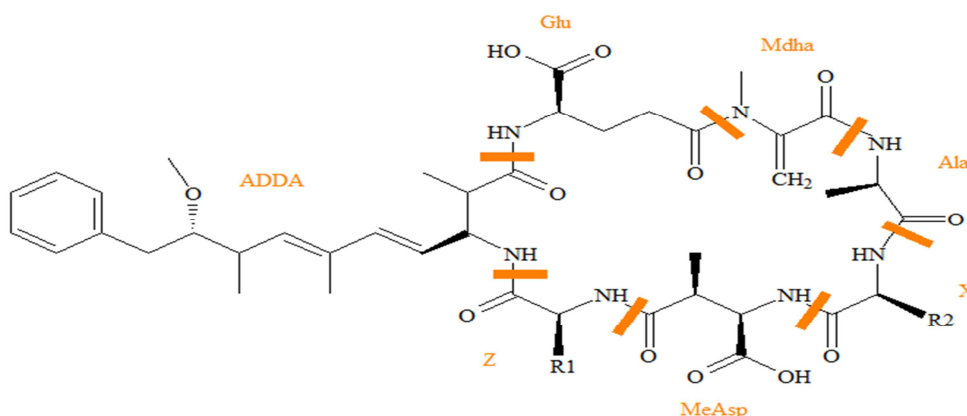


Figura 2.2 – Estrutura geral de uma microcistina (imagem adaptada de Ferrati, P. *et al*, 2009). *Ala* representa a.a alanina, *X* e *Z* a.a de posição variável com dois radicais substituíveis, *R1* e *R2*, *MeAsp* ácido aspártico metilado, *Mdha* a.a N-metildehidrolanina e *ADDA* a.a ácido 2S,3S,8S,9S-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4E,6E-dienoico.

Hoje em dia, conhecem-se mais de 90 variantes estruturais de microcistinas, que incluem variações e modificações de a.a (Mekebri, A. *et al*, 2009; Genuário, D., *et al*, 2010). Estas variações ocorrem frequentemente nos a.a das posições X e Z. Diferentes combinações dos a.a leucina (L), arginina (R) e tirosina (Y), tornam MCT_LR, MCT_YR e MCT_RR as variantes mais comuns (Dawson, R., 1998). A variante MCT_LR é claramente a variante mais estudada em termos de abundância e toxicidade (Sivonen, K. & Jones, G., 1999). A presença de um hidrocarboneto aromático na estrutura do a.a ADDA que absorve a 238 nm, torna o a.a ADDA o

principal agente de toxicidade das microcistinas (Wiegand, C. & Pflugmacher, S., 2005; Svirčev, Z. et al, 2010).

As microcistinas são heptapéptidos cuja massa molar relativa varia entre 500 e 4000 Daltons (Da), podendo em certas situações variar entre 900 a 1100 Da (van Apeldoorn, M., et al, 2007). A sua síntese não ribossomal ocorre num complexo enzimático, tal como a maioria dos outros péptidos produzidos pelas cianobactérias e requer a intervenção de vários enzimas, como péptido-sintetases não ribossomais (NRPS - *Non-Ribosomal Peptide Synthetases*), policeto-sintetases (PKS - *Polyketide Synthases*), enzimas NRPS-PKS híbridos e enzimas de modificação adicional (Kaebernick, M. & Neilan, B., 2001; Welker, M. & von Döhren, H., 2006). Estes enzimas são codificados por dois operões policistrônicos, de transcrição bidirecional, com os genes *mcy* (*myc ABC* e *mycDEFGHIJ*). Os genes promotores estão localizados entre os genes *mcyD* *mycA*, como mostra a figura 2.3.

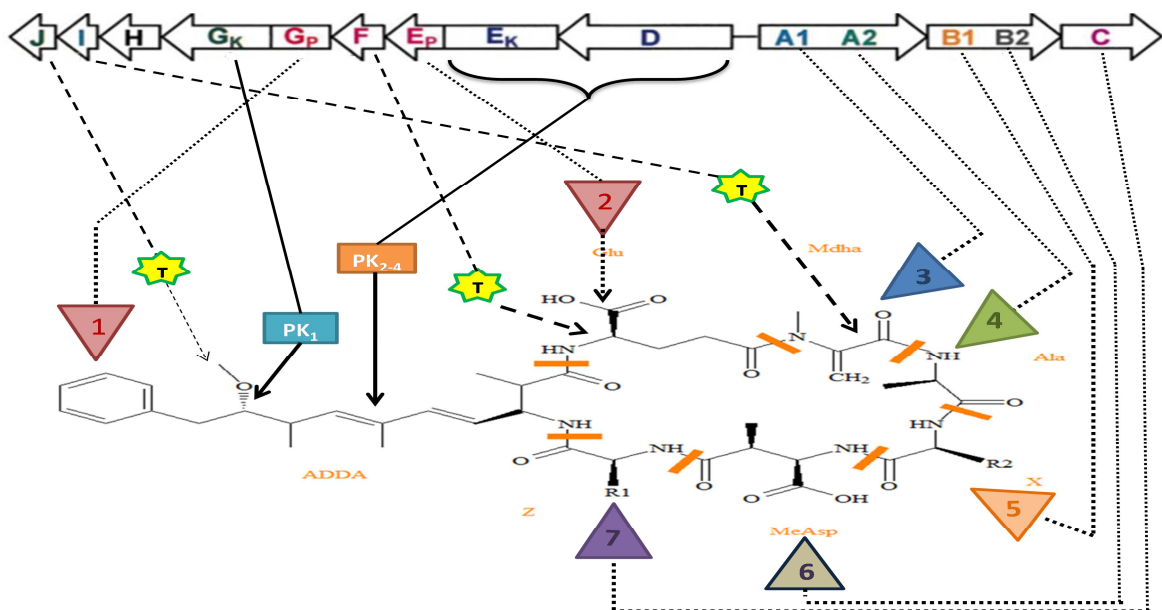


Figura 2.3 – Modelo proposto para a organização do conjunto de genes da microcistina sintetase, *mcyABCDEFGHIJ*. Os números nos triângulos indicam a ordem pela qual os a.a são incorporados de modo a proporcionar o crescimento da cadeia peptídica pelos genes (*myc A,B,C, Ep e Gp*). Os genes *mycA* e *mycB* contêm dois módulos, nomeadamente A1/A2 e B1/B2, respetivamente, em que o módulo A1 também codifica para o domínio N-metiltransferase, e são responsáveis pela incorporação dos dois a.a variáveis que formam as mais variadas variantes de MCT. O gene *mycC* é responsável pelo fecho da cadeia peptídica, de forma a formar uma estrutura cíclica. Os números nos retângulos definem a ordem pela qual ocorre a formação do a.a ADDA (*mycG_k, E_k, D*) por ação de enzimas policetos sintetases. Este *cluster* de genes tem um comprimento de 55 kb (Esquema baseado em Kaebernick, M. & Neilan, B., 2001).

As microcistinas ingeridas e assimiladas ligam-se no fígado às proteínas fosfatase 1 e 2 (PP1 e PP2A), inibindo-as o que provoca a hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto, culminando na deformação da estrutura dos hepatócitos. Esta desorganização estrutural e funcional dos hepatócitos pode desencadear uma falha hepática e em último caso a morte. No Brasil, várias pessoas morreram em resultado de tratamentos de hemodiálise que utilizaram água contaminada com MCT_LR (**van Apeldoorn, M., et al, 2007; Mankiewicz, J., et al, 2003**). De acordo com a OMS, o valor máximo de MCT permitido em águas para consumo humano é de 1,0 µg/L.

A importância biológica das microcistinas nos ecossistemas aquáticos, ainda não está bem compreendida (**Becker, S., 2010**), ainda que **Kurmayer, R. & Jüttner, F. (1999)** defendam que estas atuam como fator de defesa contra predadores. Considerando que a seleção é exercida ao nível do indivíduo e não da população, tal suposição não parece fazer sentido. Além disso, de acordo com as análises filogenéticas realizadas por **Rantala et al, 2004**, os genes *myc* têm vindo a perder-se ao longo das linhagens evolutivas das cianobactérias, pelo que os autores consideram também improvável que as microcistinas sejam um fator de defesa contra a predação de cianobactérias (**Becker, S., 2010**).

Os fatores que afetam produção de MCT, também não estão ainda bem entendidos (**Becker, S., 2010**). Fatores ambientais, como por exemplo a intensidade da luz, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, parecem influenciar a produção e libertação de microcistinas (**van Apeldoorn, M. et al, 2007**), assim como o estado fisiológico das populações de cianobactérias (**Reis, M. 2005**). A presença de outros fatores biológicos, como por exemplo, actinomicetos (**Hee-ji, C., et al, 2005**), zooplâncton (**Becker, S., 2010**) e vírus (**Padan, E., et al, 1971; Jezberova, J. & J. Komarkova, 2007**) foram também apontados como determinantes na produção e libertação de microcistinas.

São, portanto, necessários mais estudos científicos que permitam compreender o papel ecológico das microcistinas, assim como a sua produção e libertação na presença de fatores biológicos, como por exemplos cianófagos.

2.3. Métodos de análise de microcistinas

Na literatura estão reportados vários métodos laboratoriais usados na análise de amostras de água e células de cianobactérias para detecção de microcistinas. Estes métodos mostram variações em termos de grau de sofisticação e de tipo de informação que transmitem (**Harada, K., et al, 1999**). Métodos relativamente simples, como por exemplo a observação microscópica, normalmente, são os escolhidos para uma avaliação rápida do risco potencial das microcistinas por serem mais vantajosos em termos de custos e tempos de execução. Métodos que primam pela sofisticação, como o caso dos métodos analíticos, são também utilizados na análise destas cianotoxinas dado o grau de precisão que detêm em termos de identificação e quantificação. Na verdade, a escolha do método a seguir, depende sem dúvida da logística envolvente em torno da aplicabilidade desse método (**van Apeldoorn, M., et al 2007**). No entanto, é primordial que essa escolha seja sempre efetuada tendo em conta o tipo de amostra e o tipo de informação que se pretende obter associados à sensibilidade e especificidade do método de análise (**Harada, K., et al, 1999**).

Para que uma análise de amostras biológicas resulte na detecção de microcistinas e posteriormente na sua quantificação precisa, é necessário que essas amostras sejam primeiramente preparadas e que, durante esse processo de detecção, a sua manipulação seja conduzida de forma adequada e cuidadosa (**Harada, K., et al, 1999**).

2.3.1. Preparação das amostras para detecção de microcistinas

2.3.1.1. Extração

Dado que as microcistinas são endotoxinas de cianobactérias, para que sejam detetadas em células de cianobactérias ou amostras de água, é necessário que primeiramente ocorra a sua extração. Existem vários processos de extração física e química que por lise da parede celular causam a libertação destas cianotoxinas (**Msagati, T., et al, 2006**). Congelamento-descongelamento, centrifugação, liofilização, secagem a 95°C, sonicação e homogeneização em agitador de vórtice têm sido processos utilizados para este fim, muitos dos quais como complemento uns dos outros

(Meriluoto, J., 1997; Mekebri, A., *et al*, 2009; Wu, L., *et al*, 2010; Ferranti, P. *et al*, 2009; Triantis, T., *et al*, 2010; Yen, H., *et al*, 2011; Neffling, M. *et al*, 2010).

Depois da lise celular das microcistinas, o processo de rebentação das células pode ser complementado por extração líquido-líquido por adição repetida de um único solvente ou com adição de vários solventes combinados. Ácido acético a 5%, metanol, metanol acidificado com ácido trifluoroacético (TFA), misturas de ácido acético/água, misturas de acetonitrilo/água acidificada com ácido fórmico a 0,1% (80:20) ou misturas de metanol/água, são usados como agentes de extração (Sangolkar, L. *et al*, 2006).

O metanol é normalmente o solvente eleito na extração química de microcistinas por mostrar boa eficiência de extração e por permitir facilmente a concentração rápida da amostra por evaporação (Msagati, T., *et al*, 2006). Contudo, a escolha do solvente de extração deverá ser efetuada tendo em conta o tipo de amostra biológica e as propriedades físico-químicas das diferentes variantes de microcistinas que se esperam detetar (Harada, K., *et al*, 1999). Microcistinas hidrofóbicas são eficazmente extraídas com ácido acético a 5% seguido por metanol a 100%, enquanto, as de carácter polar são extraídas com misturas de metanol/água (Lawton, L., *et al*, 1994; Sangolkar, L. *et al*, 2006). De uma forma geral, misturas de metanol/água (70:30, v/v) parecem ser adequadas na extração de microcistinas mostrando boa eficiência de extração (Lawton, L., *et al*, 1994; Lawton, L. & Edwards, C., 2001).

2.3.1.2. Concentração

Antes da deteção e quantificação das microcistinas, as amostras deverão ser previamente limpas, de modo a remover tanto quanto possível as substâncias interferentes e a concentrar o (s) analíto (s) alvo na amostra. O método mais comum de limpeza e concentração de microcistinas é a extração em fase sólida (SPE- *Solid Phase Extraction*), geralmente complementada com evaporação a 40°C do eluato. Promove-se, assim, a redução do volume da amostra por redução do volume de solvente (Msagati, T., *et al*, 2006; Lawton, L. & Edwards, C., 2001). No processo de concentração de microcistinas, a fase estacionária frequentemente utilizada é de fase reversa (RP-*reverse phase*), cuja matriz é de carácter não polar, como por exemplo, RP-18. Esta extração em fase sólida inicia-se com o processo de condicionamento do cartucho de

extração. Normalmente, o metanol é o solvente escolhido para este fim. Uma vez condicionado, o adsorvente deverá ser corretamente ativado com um solvente polar, como por exemplo água. Após este procedimento, a amostra é transferida por vácuo para o cartucho, onde por interações intermoleculares o analíto de interesse adere à fase estacionária assim como diversas impurezas (Harris, D., 2005). Uma vez passada toda a amostra, os cartuchos são lavados com um solvente com baixa força eluente, como por exemplo a água em RP, de forma a remover as impurezas. Posteriormente os cartuchos são secos sob vácuo. Por fim, são eluídos os analítos de interesse por adição de um solvente de extração com força eluente suficientemente forte para arrastar o analíto (Harris, D., 2005). Todo este procedimento de extração em fase sólida está esquematizado na figura 2.4.

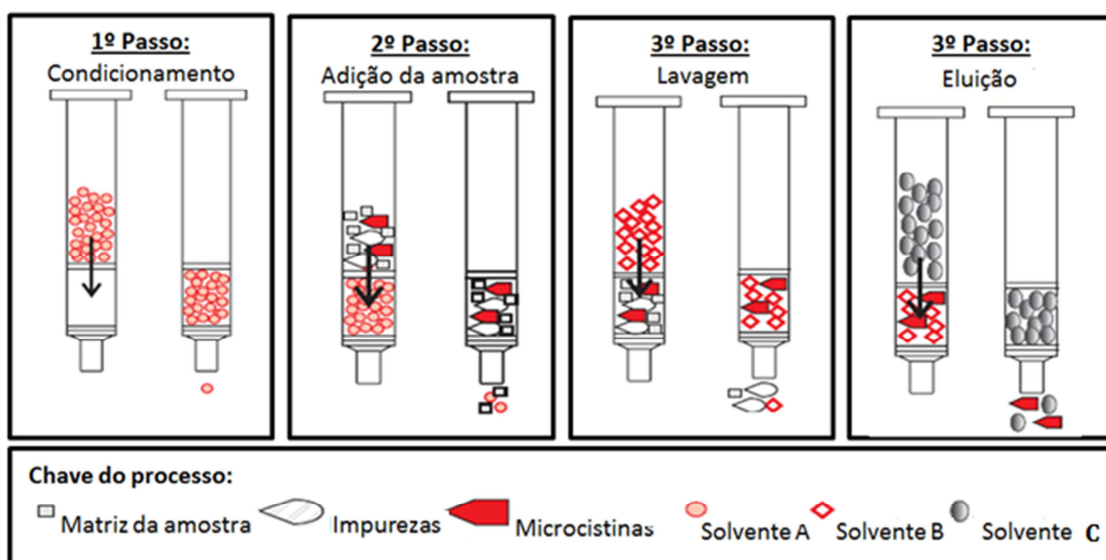


Figura 2.4- Esquematização da extração em fase sólida (imagem baseada em **Sigma-Aldrich Co.**).

2.3.2. Deteção e quantificação de microcistinas

Nos últimos tempos, foram reportados na literatura, uma variedade de métodos que foram desenvolvidos e implementados para deteção de microcistinas. Na figura 2.5 estão representados alguns dos métodos utilizados na deteção de microcistinas. Estes métodos podem ser divididos em três grupos: métodos biológicos, métodos bioquímicos e métodos analíticos.

2.3.2.1. Métodos biológicos

Os métodos biológicos, nomeadamente, bioensaios com ratos, foram os primeiros métodos utilizados na deteção de microcistinas. A deteção destas cianotoxinas consiste na injeção intraperitoneal de extratos de cianobactérias e através de uma curva dose/resposta determina-se a quantidade mínima de cianobactérias necessárias para causar a morte a 50 % de uma população de ratos. No entanto, com este método, as microcistinas não são quantificadas com precisão. Neste sentido, surgiu a necessidade de desenvolvimento de novos métodos que permitissem a deteção e quantificação de microcistinas com mais seletividade e sensibilidade (**Vasconcelos, V., 1990a**).

2.3.2.2. Métodos bioquímicos

Os ensaios de inibição das fosfatases e de acetilcolinesterase são dois métodos bioquímicos utilizados na deteção de cianotoxinas. No entanto, os ensaios imunoquímicos como ensaios de imunoabsorção enzimática, em inglês ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), são mais utilizados na deteção e quantificação de microcistinas em amostras de água (**Harada, K., et al, 1999**). O método ELISA consiste na ligação entre microcistinas e anticorpos ligados a um suporte sólido (**Nunes, G., 2005**). Esta ligação ocorre pelo reconhecimento do aminoácido ADDA (**Harada, K., et al, 1999**). Depois da remoção das frações não ligadas, é adicionado um anticorpo secundário marcado com um composto corado, que ao reagir com as microcistinas, produz um sinal espectral inversamente proporcional à quantidade de microcistinas detetada. Hoje em dia, existem vários *kit's* de testes ELISA comerciais que possibilitam uma análise rápida de várias amostras, sem grandes custos associados, sendo por isso muito úteis na monitorização de microcistinas em águas de consumo. O método de ELISA é bastante sensível, detetando picogramas (pg) de microcistinas. Contudo apresenta algumas limitações ao nível da especificidade, já que não permite diferenciar as diversas variantes de microcistinas detetadas, podendo gerar falsos resultados por em determinadas situações sobre- ou subestimar a concentração de microcistinas (**Sangolkar, L. et al, 2006; van Apeldoorn, M., et al 2007**).

2.3.2.3. Métodos analíticos

Embora os métodos biológicos e bioquímicos sejam os mais utilizados na detecção de microcistinas, ultimamente os métodos analíticos têm vindo a ganhar mais ênfase por permitirem também a quantificação destas cianotoxinas. A cromatografia líquida de alta eficiência, em inglês HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com detecção ultravioleta (UV) foi declarada na ISO 20179:2005 como sendo o método padrão para identificação e quantificação de microcistinas em amostras de água para consumo humano (**ISO 20179:2005**). Por este método analítico, as microcistinas, são detetadas pela presença de um pico de absorção aos 238 nm, característico do principal cromóforo, um dieno, presente no resíduo ADDA (**Sangolkar, L. et al, 2006**). Posteriormente, a sua identificação e quantificação ocorre pela comparação dos tempos de retenção, área dos picos dos cromatogramas e dos espectros de absorção das amostras com os de soluções padrão. Embora este método permita identificar várias variantes de microcistinas em simultâneo, essa identificação é restringida apenas aquelas para as quais existe um padrão comercial certificado disponível (**Sangolkar, L. et al, 2006**).

Apesar de HPLC-UV ser o método padrão de detecção de microcistinas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS - *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) também tem sido utilizada com vantagem na análise qualitativa destas cianotoxinas em águas para consumo, peixes, bivalves e outras amostras biológicas (**Mekebri, A. et al, 2009**). Por este método, as moléculas de microcistinas são convertidas em iões desolvatados que posteriormente serão resolvidos de acordo com a sua massa/carga. Os espectros de MS obtidos para as diferentes variantes de microcistinas podem resultar de diferentes tipos de iões precursores, iões $[M+H]^+$ e iões $[M+2H]^{2+}$, dependendo do tipo dos aminoácidos variáveis que as constituem (**Sangolkar, L. et al, 2006**). Mais recentemente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em modo MS/MS (LC-MS/MS - *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*) tem vindo a ser utilizada na identificação de microcistinas presentes em misturas complexas. Neste método analítico, os iões precursores são fragmentados e os iões produto resultantes são detetados de acordo com a sua razão massa/carga, gerando espectros de MS/MS. Na realidade, trata-se de uma análise sequencial de massa/carga (**Sangolkar, L. et al,**

2006), que permite obter resultados bastante credíveis, dada à boa sensibilidade e especificidade deste método, LC-MS/MS, figura 2.5.

No capítulo subsequente, explica-se detalhadamente todos estes métodos analíticos que utilizam a cromatografia líquida na deteção de microcistinas sob o ponto de vista teórico e instrumental.

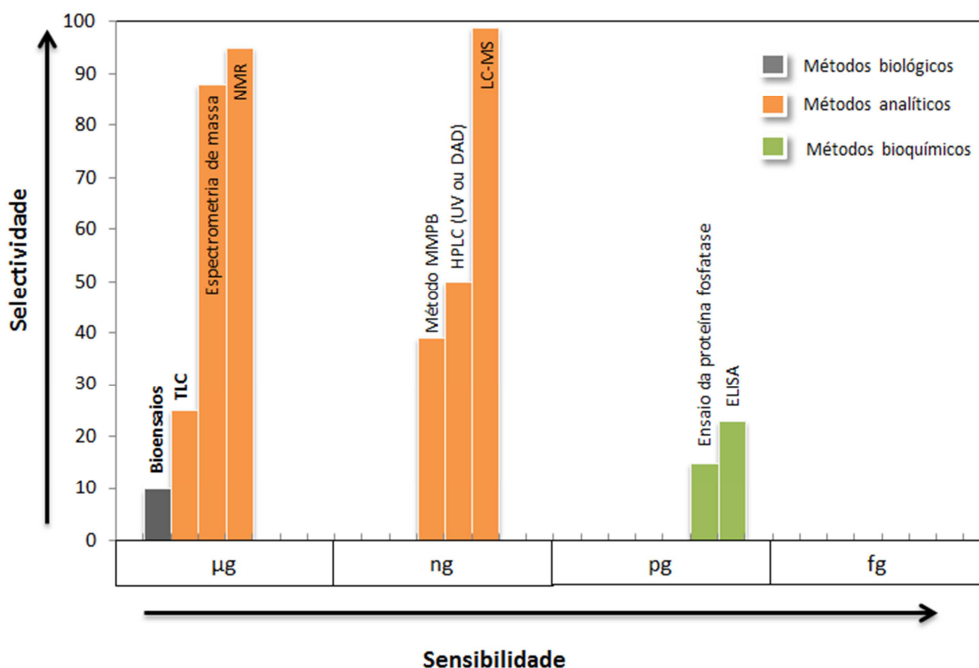


Figura 2.5 – Seletividade e sensibilidade de alguns dos métodos de deteção das microcistinas (Imagem adaptada de **Msagati, T., et al, 2006**). (TLC – Cromatografia em camada fina; NMR – Ressonância magnética nuclear; Método MMPB – Método do ácido 2-metil3-metoxi4-fenilbutirico; HPLC UV ou DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta ou detetor *Diodo array*; LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa; ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Capítulo III

Os cianófagos como fatores biológicos condicionantes da produção de microcistinas em cultura

Fatores biológicos, por exemplo, actinomicetos como *Streptomyces neyagawaensis* (Hee-jin, C., *et al*, 2005), zooplâncton como *Daphnia magna* (Becker, S., 2010), nanoflagelados mixotróficos como espécies de *Ochromonas* (Jezberova, J. & J. Komarkova, 2007) e cianófagos (Padan, E., *et al*, 1971; Suttle, C., 2000), parecem estar relacionados com a diminuição da densidade celular de cianobactérias. A eventual influência de cianófagos na dinâmica populacional de cianobactérias, assim como na sua distribuição geográfica e sazonal, bem como a sua possível utilização como agentes de controlo biológico destas algas verdes-azuis, reúne o consenso de múltiplos investigadores (Padan, E. & Shilo, M., 1973; Fuhrman & Schwalbach, 2003; Sigee, D., *et al* 1999; Suttle, C., 2000; Mesquita, S. *et al*, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre a influência destes fatores biológicos na produção de cianotoxinas. Neste sentido, o presente capítulo pretende sumarizar o estado atual do conhecimento sobre cianófagos, a fim de contribuir para a compreensão do seu eventual papel na produção e na libertação de microcistinas.

3.1. Cianófagos

Os cianófagos são vírus específicos de cianobactérias. Em 1963 Safferman e Morris isolaram os primeiros agentes virais que causavam a lise de cianobactérias filamentosas dos géneros *Lyngbya*, *Plectonema* e *Phormidium* (Safferman, R. & Morris, M., 1963). Estes agentes virais que inicialmente foram designados por ficovírus ou por vírus de algas verdes-azuis, são atualmente conhecidos como cianófagos. Esta designação surgiu por analogia com a dos restantes bacteriófagos, vírus de bactérias (Padan, E. & Shilo, M., 1973; Singh, P., *et al*, 2012).

A origem dos bacteriófagos é ainda objeto de debate, sendo apontadas várias teorias para a justificar. A teoria mais comum defende que a sua origem se deveu a uma “fuga” de material genético dos hospedeiros (Suttle C., 2000). Esta fuga genética parece ser corroborada pela presença de sequências idênticas às de genes que codificam

para proteínas essenciais para a fotossíntese, nomeadamente de cloroplastos (**Hambly, E. & Suttle, C., 2005**). De tal forma, que cada uma das 3 famílias conhecidas de cianófagos parece ser monofilética (**Suttle C., 2000**). Estes factos sustentam, assim, a ideia que o papel ecológico dos fagos sob as populações hospedeiras suporta a transferência de material genético, pelo que atuam como vetores de transferência de genes (**Hambly, E. & Suttle, C., 2005**).

Desde o seu primeiro isolamento (**Safferman, R. & Morris, M., 1963**), os cianófagos têm sido alvo de estudos para caracterização e compreensão das suas interações biológicas com os hospedeiros (**Suttle C., 2000**). Maioritariamente, estes estudos têm dado relevância à compreensão dos seus efeitos nas comunidades de cianobactérias marinhas e de estuários. Pouco se sabe sobre o papel dos cianófagos nas populações de cianobactérias de água doce (**Leff, A, et al, 1999; Baker, A., et al, 2006**).

3.1.1. Características gerais

Em termos de nomenclatura, os cianófagos começaram por ser designados de acordo com o nome do seu hospedeiro (**Padan, E. & Shilo, M., 1973**). Os cianófagos LPP isolados por Safferman e Morris em 1963 foram assim designados, porque infetavam cianobactérias dos géneros *Lyngbya*, *Plectonema* e *Phormidium* (**Safferman, R. & Morris, M., 1963**). A esta designação eram adicionados números árabes a fim de indicar os grupos serológicos a que os cianófagos pertenciam. Os cianófagos designados por LPP podem ser divididos em dois grupos serológicos distintos, nomeadamente LPP-1 e LPP-2. Apesar de pertencerem ao mesmo grupo, só os cianófagos LPP-2 induzem a lisogenia em *Plectonema boryanum* e não os LPP-1. Acredita-se que esta nomenclatura pode ser ambígua, por ter pouco significado taxonómico e evolutivo (**Padan, E. & Shilo, M., 1973**). Hoje em dia, a nomenclatura utilizada para tipificar novos cianófagos rege-se pela seguinte regra: *Xx-YYZaa*, onde *Xx* corresponde às iniciais do nome da espécie do hospedeiro de onde foi isolado, *YY* às iniciais do local onde foi isolado, *Z* à da família a que pertence e *aa* ao número de referência para o vírus isolado (**Suttle C., 2000**). Embora ainda imperfeita, esta nova nomenclatura é mais informativa por ter em conta para além da informação taxonómica do hospedeiro, o local de origem e a família a que pertence o vírus (**Suttle C., 2000**).

Até ao momento só se conhecem cianófagos com DNA como ácido nucleico, pertencendo todos à ordem Caudovirales. Esta inclui bacteriófagos com DNA de cadeia dupla (dsDNA), que têm propriedades morfológicas únicas, como a constituição de caudas. De acordo com a sua morfologia, os cianófagos conhecidos estão distribuídos por 3 famílias a saber, Myoviridae, Podoviridae e Siphoviridae (ICTV, 2011; Wang, K. & Che, F., 2004). Estas 3 famílias diferem entre si na morfologia da cápside e da cauda. De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), a família Myoviridae é constituída por 9 géneros, incluindo um deles o cianófago de *M. aeruginosa* Ma-LMM01, que foi isolado no verão de 2003 no Lago Mikata (Japão) por Yoshida, T., *et al*, 2006 durante um bloom. O nome de *Cyanomyovirus*, proposto para este género, ainda não foi oficialmente aceite (ICTV, 2011). Este género caracteriza-se por os vírus apresentarem cauda alongada (244 nm x 23nm) ou contrátil até 93 nm, cabeça icosaédrica (90 nm de diâmetro) e terem um genoma que varia entre 37 e 88 Kb. Neste grupo estão inseridos cianófagos que foram isolados de ambientes marinhos e também de água doce como, por exemplo, os cianófagos que infetam cianobactérias filamentosas do género *Anabaena* (Suttle C., 2000).

Na família Podoviridae integram-se 5 cianófagos, 2 de espécies do género *Phormidium* (Ph-WMP3 e Ph-WMP4, sem subfamília atribuída) e 3 pertencentes à subfamília Autographvirina que infetam *Prochlorococcus* sp. (P-SSP7), e *Synechococcus* sp. (P60 e syn5). Estes cianófagos são mais pequenos que os da família Myoviridae, com um genoma de aproximadamente 42 kb, sendo o diâmetro da cabeça icosaédrica de aproximado 59 nm e variando o tamanho da cauda entre 15 e 30 nm. Alguns foram isolados de ambientes marinhos e de água doce, mas outros a partir de lagoas de estabilização de tratamento de águas residuais (Suttle C., 2000). Por fim, o cianófago incluído na família Siphoviridae apresenta cauda longa e rija de 140 nm de comprimento, cabeça isométrica com 50 nm de diâmetro e as suas dimensões genómicas variam entre 40 a 90 kb (Suttle C., 2000).

Para além destas 7 espécies de cianófagos já registadas na literatura existem diversos isolados recolhidos a partir de ambientes aquáticos e que se encontram em estudo. Concretamente, no Laboratório de Biologia Microbiana do CIMA, estão em estudo (Mesquita, S. *et al*, 2009), variantes de vírus de *M. aeruginosa* isolados por Mesquita, S. *et al*. (2009) a partir de situações de florescências daquelas cianobactérias no Lago Erie (Michigan USA).

3.1.2. Ciclo de replicação

Os cianófagos, tal como os outros vírus, não possuem metabolismo próprio. Para que ocorra a replicação de um cianófago, este necessita do metabolismo e dos recursos energéticos dos seus hospedeiros, as cianobactérias. No processo de replicação dos bacteriófagos num ciclo lítico reconhecem-se várias fases, nomeadamente adsorção, penetração do material genético na célula hospedeira, expressão e replicação dos ácidos nucleicos, formação e montagem de novas partículas virais, extrusão com lise celular, libertação e transmissão dos novos vírus (**Weinbauer, M., 2004**). Este ciclo inicia-se com a fase da adsorção que pode ser dividida em duas fases. Na primeira fase ocorre o reconhecimento da superfície da célula pelo bacteriófago, que é dependente do reconhecimento de recetores específicos. Na segunda fase da absorção dá-se a ligação irreversível destes aos seus recetores na superfície da célula. Após a fase de adsorção, a parede celular da célula hospedeira é perfurada, por ação de enzimas líticas do bacteriófago, para que o seu material genético seja transferido para o interior da célula hospedeira. Aí, o seu genoma pode ou não ser integrado no genoma da célula hospedeira, de acordo com o tipo de ciclo de replicação. Só então ocorre a expressão genética, a replicação do genoma e consequentemente a formação de novas partículas virais (**Weinbauer, M., 2004; Barksdale, L. & Arden, S., 1974; Singh, P, et al, 2012**). Neste modelo de infeção podem-se distinguir três fases o período de eclipse, o período latente e o período lítico. O período de eclipse é a fase do período de latência antes da formação de fagos maduros de tal forma que termina com a formação de pelo menos uma partícula viral madura. O período latente de um fago caracteriza-se pela acumulação intracelular de vírus maduros, à qual se segue a sua libertação para o meio extracelular. A duração de cada um destes períodos pode ser variável (**Weinbauer, M., 2004**).

Os cianófagos, como os outros bacteriófagos, deverão poder desenvolver 4 tipos de ciclos de replicação, a saber o ciclo lítico, o ciclo lisogénico, o ciclo crónico e o ciclo pseudolisogénico, como se ilustra na figura 3.1 baseada em **Weinbauer, M. (2004)**.

No ciclo lítico, os cianófagos recrutam o metabolismo energético das cianobactérias para a formação de novas partículas virais. Neste tipo de ciclo de vida, as novas partículas virais causam a lise celular pelo que são consequentemente libertas para o exterior. Num ciclo lisogénico os cianófagos não causam de imediato a lise das

cianobactérias, antes integram o seu genoma no das suas hospedeiras, de modo a que a sua replicação ocorra em conjunto com a replicação do DNA da hospedeira. Assim permanecem, até que ocorra um evento de ativação que determine a sua excisão do cromossoma bacteriano e subsequente desenvolvimento de um ciclo lítico com produção de novos fagos. Enquanto integrado no genoma da hospedeira, o genoma do cianófago designa-se por prófago, e os vírus capazes de desenvolver um ciclo lisogénico chamam-se fagos temperados. Quando o genoma do fago temperado não integra o da hospedeira como prófago, mas se mantém na célula como molécula de DNA circular extracromosomal, como um plasmídeo, pode ser perdido por parte da descendência da hospedeira portadora. Este ciclo diz-se pseudolisogénico por poder originar quer um ciclo lítico, quer um lisogénico, quer a segregação de células “curadas”, permitindo a presença simultânea de cianófagos e de cianobactérias numa cultura e dificultando a obtenção de lisados (Paul, J. & Jiang, S., 2001). Quando as novas partículas virais não causam a lise celular, mas antes vão sendo eliminadas pela célula à medida que vão sendo produzidas, o ciclo de vida do bacteriófago é considerado como sendo um ciclo crónico. (Weinbauer, M., 2004).

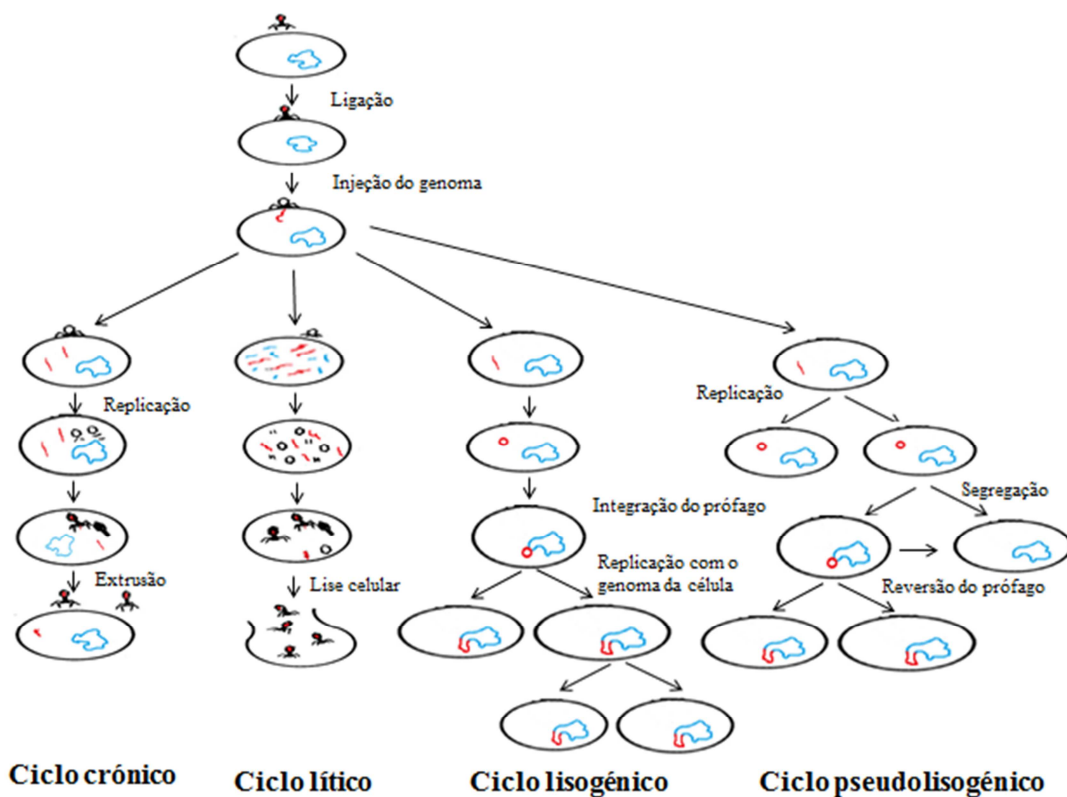


Figura 3.1 – Tipos de ciclo de replicação dos cianófagos (imagem baseada de Weinbauer, M., 2004).

A “opção” pela lisogenia só ocorre após a infecção e depende da expressão de proteínas reguladoras codificadas pelo genoma viral, bem como da sua inibição por proteases da hospedeira. De acordo com os modelos estabelecidos para o fago λ de *Escherichia coli*, os promotores P_L e P_R (veja-se ilustração na figura 3.2) são transcritos por ação da RNA polimerase da hospedeira, levando à transcrição das proteínas reguladoras **CII** e **CIII**.

A proteína **CIII** inibe proteases específicas para a proteína **CII**, permitindo que esta ative o promotor P_{RM} e a consequente transcrição da proteína repressora **CI**. Esta reprime a transcrição dos promotores P_L e P_R , em virtude da sua afinidade para **OR** (1,2 e 3) evitando a transcrição da proteína **Cro**. Assim, a proteína **CI** é responsável pela manutenção do ciclo lisogénico por impedir a transcrição da proteína **Cro** que controla a ativação do ciclo lítico. No entanto, em situação de *stress* que conduza à desativação da proteína **CII**, P_{RM} é reprimido e a lise celular é desencadeada (Singh, P. *et al.*, 2012).

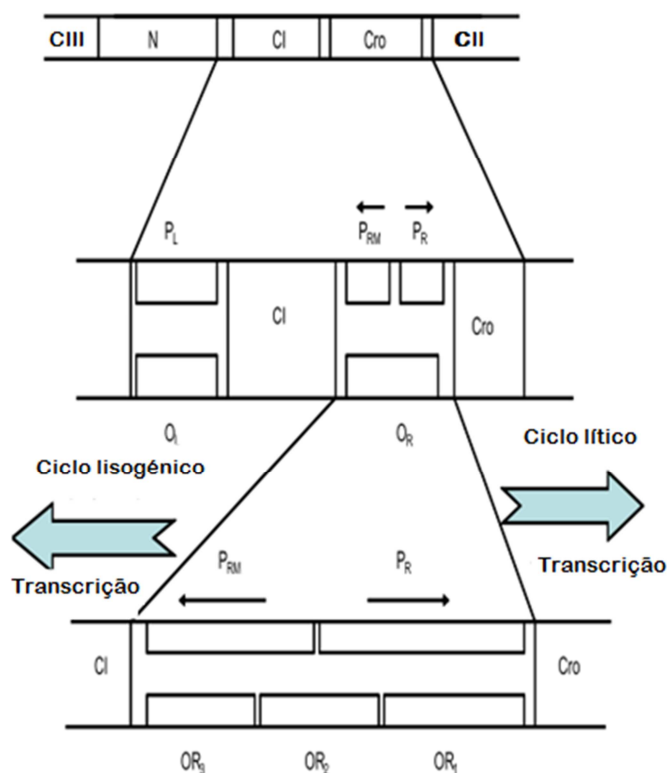


Figura 3.2 – Esquema explicativo das vias de regulação da lisogenia em bacteriófagos temperados. P_L representa o promotor de transcrição para a esquerda; P_R o promotor de transcrição para a direita; P_{RM} o promotor de transcrição da proteína repressora **CI**; **CI** a proteína repressora responsável pela manutenção do ciclo lisogénico; **CII** e **CIII** as proteínas reguladoras; **Cro** a proteína que controla o ciclo lítico e **OR** (1,2 e 3) as zonas de ligação da proteína **CI** (imagem modificada sobre esquema de Singh, P. *et al.*, 2012).

A regulação da lisogenia através da expressão das proteínas **Ci** e **Cro**, pode depender também da multiplicidade de infeção (MOI – *Multiplicity of infection*), da taxa de crescimento das hospedeiras e das condições nutricionais (Paul, J. & Jiang, S., 2001). De acordo com Scanlan, D. & Wilson, H., 1999, um microcosmo com um *bloom* de *Synechococcus* limitado em fosfatos, quando na presença de fosfatos inorgânicos, revela a presença concomitante de fagos que provocam a lise celular das populações de *Synechococcus*. Cianófagos do género *Synechococcus* parecem, então, optar pela lisogenia de acordo com a quantidade de fósforo disponível (Paul, J. & Jiang, S., 2001). A lisogenia destas populações de cianobactérias poderá eventualmente estar relacionada com a observação de elevada abundância à resistência da infeção (Paul, J. & Jiang, S., 2001).

3.2. Considerações ecológicas – Interações entre cianófagos, cianobactérias e cianotoxinas

A importância dos vírus nos sistemas aquáticos só foi reconhecida nos finais do século passado. O interesse pelo papel dos vírus na ecologia microbiana foi revitalizado, quando várias micrografias de transmissão eletrónica sugeriram que os vírus eram muito mais abundantes do que até então se pensava (Jacquet, S., *et al*, 2010). A partir dos anos 90 começou-se a dar mais importância aos vírus aquáticos, mais precisamente ao seu potencial biogeoquímico e ao papel ecológico que desempenham nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos (Jacquet, S., *et al*, 2010). As investigações desenvolvidas nos últimos tempos têm sido sobretudo no sentido de compreender o papel dos vírus na reciclagem de nutrientes e da matéria orgânica, na transferência de material genético, no crescimento celular e na eficiência fotossintética, bem como na estrutura das comunidades microbianas, na densidade celular e nas florescências de cianobactérias (Jacquet, S., *et al*, 2010; Suttle, C., 2000). Ao longo destas investigações, os vírus têm vindo a ser reconhecidos como participantes das teias alimentares, com o duplo papel de predadores e de aceleradores da reciclagem de nutrientes. Atuam, assim, como “new players in the game” sendo os principais agentes de controlo biológico. O facto de a infeção viral depender da densidade do hospedeiro contribui para que os vírus dominantes em sistemas aquáticos

sejam os vírus das espécies mais abundantes. O controlo populacional que estes vírus exercem sobre as suas hospedeiras obedece, pois, a um modelo do tipo “kill the winner” que contribui para a manutenção da biodiversidade, ao impedir que as hospedeiras excluam por completo as espécies que com elas competem (**Thingstad, T. & Lignell, R., 1993; Jacquet, S., et al, 2010**). Dá designações como “major ecosystem players”, “rulers of the waves” e “the key to survival in the seas for microorganisms”. A maior parte destas designações foram atribuídas em resultado do estudo de bacteriófagos isolados de ambientes de água salgada. Pouco se sabe do papel dos bacteriófagos nos sistemas de água doce, admitindo-se que os fagos marinhos tenham uma gama de hospedeiros maior do que os de água doce (**Leff, A. et al, 1999; Suttle, C., 2000; Pollard, P. & Young, L., 2010**).

O modelo que explica o impacto de cianófagos em populações de cianobactérias marinhas, parece explicar o efeito destes vírus em cianobactérias de água doce. De acordo com o modelo “Kill the winner”, os vírus restringem a densidade das populações mais abundantes. Este modelo assume que os próprios vírus são beneficiados pelo facto de permitirem a renovação das populações de hospedeiras ao contribuírem para libertar na água nutrientes que as favorecem na competição com outras (**Jacquet, S., et al, 2010**).

Assim, cianobactérias com maiores densidades celulares podem levar a uma maior abundância de vírus específicos, resultando numa taxa de mortalidade significativa. Tal como num ciclo de predador – presa, a consequente limitação do número de hospedeiras refletir-se-á numa redução da taxa de replicação dos vírus. Isto permite que não ocorra lise de todas as hospedeiras e garante a viabilidade do cianófago, já que sem a presença do seu hospedeiro, o cianófago não é viável por muito tempo (**Suttle C., 2000**).

Vários métodos de estimação de abundância viral têm sido utilizados para avaliar o papel ecológico dos bacteriófagos, nomeadamente: - o método de contagem das unidades formadoras de placas fágicas (PFU) em placas de Petri com agar-agar; - o método do número mais provável (MPNs) em tubos múltiplos com deteção dos tubos positivos para lise das culturas, - a deteção em microscopia eletrónica de transmissão (TEM); - em microscopia de epifluorescência (EFM) com fluorocromos específicos para ácidos nucleicos ou em citometria de fluxo (FC) (**Suttle, C., 2000**). A utilização destes métodos tem como objetivo principal quantificar os cianófagos. Esta quantificação passa pela monitorização de partículas virais ao longo do tempo, medição

da infetividade viral e pela medição da razão de contacto entre cianófagos e cianobactérias (**Jacquet, S, et al, 2010; Suttle, C., 2000**). No entanto, a sua quantificação indireta pode ser feita pela determinação dos seus efeitos sobre as populações de cianobactérias pela determinação de taxas de mortalidade através da quantificação da clorofila *a*, da densidade celular e da quantidade de cianotoxinas libertadas (**Jacquet, S, et al, 2010**). Embora pareça óbvio que a presença de cianófagos influencie a libertação de cianotoxinas, poucos estudos científicos têm sido efetuados no sentido de uma melhor compreensão deste facto.

Capítulo IV

LC-MS/MS – Estado da arte

Do crescente interesse em se obter análises de elevado grau de confiança, surgiu a necessidade de desenvolver novos métodos analíticos, mas também de aprimorar outros já existentes. A combinação de técnicas ortogonais como a cromatografia líquida com a espectrometria de massa em modo MS/MS (LC-MS/MS) foi bem-sucedida, resultando numa análise mais sensível e específica. Dada a sua sensibilidade e especificidade, esta técnica analítica é frequentemente utilizada nas mais diversas aplicações, como por exemplo, análise de novos compostos naturais bioativos, como metabolitos secundários de cianobactérias. O conhecimento de cada uma das componentes desses equipamentos e o modo como funcionam e relacionam entre si, é imperativo para quem os queira utilizar. Apenas quando se compreende tecnicamente o funcionamento dos equipamentos em que se efetuam as análises é possível fazer uma avaliação correta dos resultados obtidos. Neste sentido, o presente capítulo pretende dar a conhecer a cromatografia acoplada à espectrometria de massa enquanto técnica analítica assim como a parte instrumental que a constitui.

4.1. Cromatografia

A cromatografia foi a primeira técnica a ser desenvolvida para a análise separativa de compostos presentes numa mistura. O botânico russo Mikhail Tswett, em 1903, foi o primeiro cientista a utilizar a cromatografia na separação de pigmentos fotossintéticos de extratos de plantas, usando um hidrocarboneto como solvente e uma coluna de adsorção líquida com carbonato de cálcio como adsorvente (**Scott, R., 2003; Harris, D., 2005**). A presença de bandas coloridas nessa coluna outorgou a designação cromatografia (do grego *chroma*, cor, e *graphein*, grafia, designando-se literalmente por grafia da cor) para esta técnica separativa (**Scott, R., 2003**).

Em termos analíticos, a cromatografia é um método separativo que permite a separação dos componentes de uma mistura entre duas fases, uma fixa, a fase

estacionária e a outra que se desloca, a fase móvel (**Harris, D., 2005**). Esta separação é regulada pelo equilíbrio de concentrações dos analitos (componentes da mistura) e pelas interações intermoleculares que estabelecem com a fase estacionária e com a fase móvel (**Scott, R., 2003; Harris, D., 2005**). Este equilíbrio de concentrações pode ser quantificado através do coeficiente de distribuição de Nernst, K_D , também definida como:

$$K_D = \frac{\text{Concentração do analito na fase estacionária}}{\text{Concentração do analito na fase móvel}} \quad (4.1)$$

Quanto maior for a afinidade do analito pela fase estacionária maior será o valor de K_D , pelo que o tempo de eluição do analito será maior. Na figura 4.1 está representada uma separação cromatográfica explicativa do processo de separação de dois componentes numa mistura. Uma mistura, constituída pelo componente A e pelo componente B, é adicionada a uma coluna cromatográfica que se encontra empacotada com partículas sólidas (fase estacionária). Quando o solvente (fase móvel) é adicionado e a torneira a coluna é aberta, ocorre o deslocamento dos dois componentes ao longo da coluna devido ao fluxo contínuo de solvente. O componente A é mais retido pela fase estacionária que o componente B, de tal forma que o seu movimento ao longo da coluna é mais lento, sendo eluído posteriormente ao componente B (**Harris, D., 2005**).

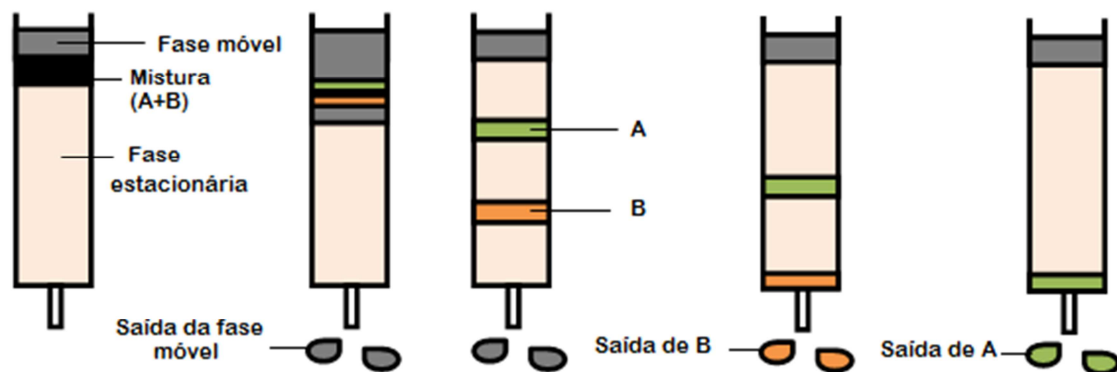


Figura 4.1 – Representação esquemática de uma separação cromatográfica de dois componentes, A e B, de uma mistura (imagem adaptada de **Harris, D., 2005**).

4.1.1. Classificação dos métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos podem classificar-se de várias formas, dependendo do critério de classificação usado. Na tabela 4.1 estão apresentados, de forma geral, os vários métodos de cromatografia classificados de acordo com alguns critérios de classificação.

Tabela 4.1 – Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com critérios analíticos composta a partir de **Harris, D., 2005; Rouessac, F. & Rouessac, A. 2000; Scott, R., 2003.**

Critério de classificação	Tipo de Cromatografia
Tipo de suporte	Planar Coluna
Modo de separação	Adsorção Partição Troca iónica Exclusão molecular Afinidade
Natureza da fase móvel	Gasosa Líquida Supercrítica
Composição da fase móvel	Isocrática Gradiente
Modo de operação	Frontal Deslocamento Eluição
Objetivo da separação	Preparativa Analítica

4.1.2. Cromatograma

Um cromatograma é um diagrama a duas dimensões que mostra a resposta do detetor em função do tempo de análise, sendo a sua resposta proporcional à concentração do analíto eluído pela fase móvel e sob a forma de uma curva Gaussiana, como mostra a figura 4.2 (**Harris, D., 2005; Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

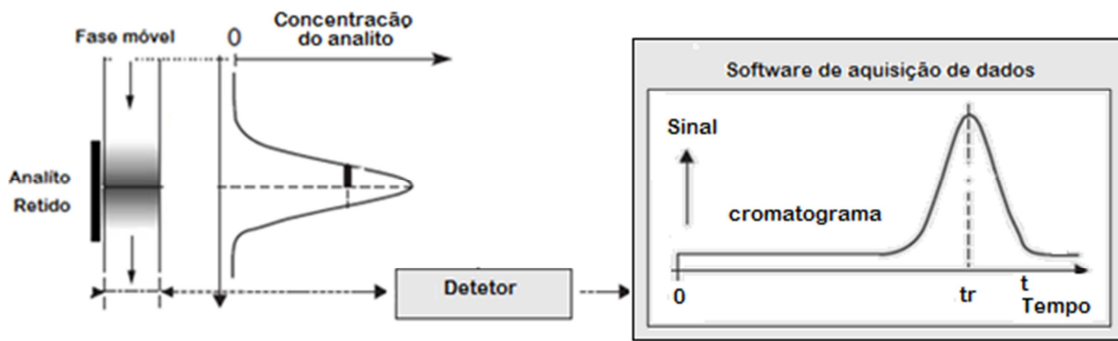


Figura 4.2 – Representação gráfica do sinal do detetor em função da concentração de analito detetada ao longo do tempo (adaptado de **Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

Um cromatograma permite revelar várias informações, quer relativamente à amostra quer ao sistema cromatográfico. De acordo com o número de picos detetados é possível saber o grau de complexidade da amostra e de acordo com a área de cada um é possível determinar a concentração do analito detetado. A eventual sobreposição de picos cromatográficos dá a indicação da baixa resolução do sistema cromatográfico e consequentemente da capacidade de desempenho (**Meyer, V., 2004**).

4.1.3. Fatores que influenciam a separação cromatográfica

Considera-se que um cromatograma revela uma boa separação cromatográfica quando a separação é eficiente. Isto é, quando os analitos não ficam retidos na coluna cromatográfica durante muito tempo, sendo facilmente separados de forma a serem eluídos como bandas estreitas e que não se sobrepõem, como mostra a figura 4.3 (**Harris, D., 2005**).

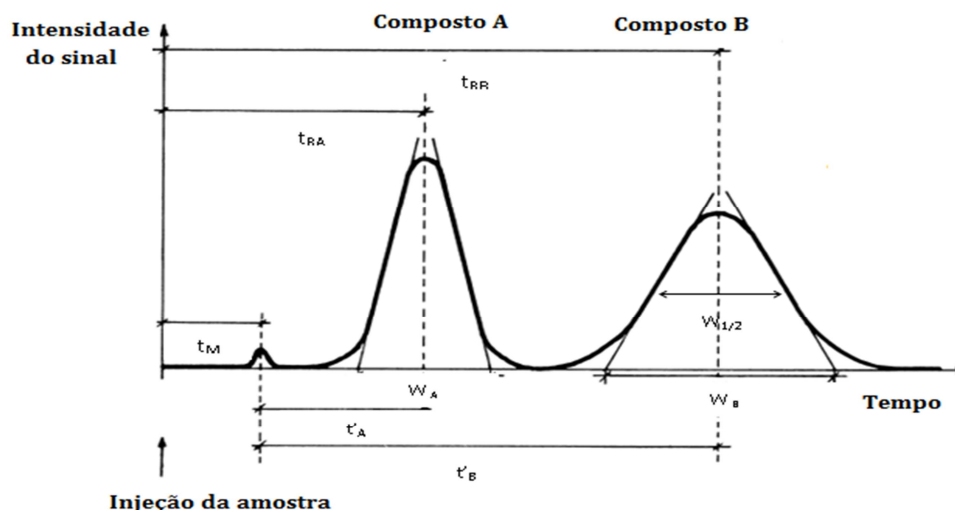


Figura 4.3 – Representação gráfica do sinal do detector em função do tempo de eluição de dois compostos de uma mistura e alguns parâmetros cromatográficos que influenciam a separação, nomeadamente, tempo morto (t_M), tempo de retenção (t_R), tempo de retenção ajustado (t'_R), largura do pico (w) e a largura do pico à meia altura ($W_{1/2}$) (esquema montado sobre imagem de **Meyer, V., 2004**).

O tempo de retenção (t_R) de um analito define-se como o tempo que esse analito leva a percorrer a coluna cromatográfica até atingir o detector. Quanto mais um analito for retido pela fase estacionária, maior será o seu tempo de retenção e consequentemente maior será o fator de capacidade, k' (**Harris, D., 2005**).

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (4.2)$$

Quanto maior for a diferença entre os termos do k' , mais afastados estão os picos cromatográficos e consequentemente melhor será a separação. O tempo de retenção ajustado corresponde à diferença entre o tempo de retenção do composto e o tempo morto, t_M , ao tempo em que os componentes não retidos levam até atingir o detector ($t'_R = t_R - t_M$) (**Meyer, V., 2004**).

A largura (w) de um pico cromatográfico define-se como a distância na linha de base entre as tangentes de cada um dos picos dos padrões (cf. figura 4.3). Quanto mais tempo demora um analito a passar por toda a coluna, mais largo se torna o pico. O alargamento dos picos cromatográficos é regido por processos cinéticos que afetam a largura da base dos picos. De acordo com o modelo dos pratos teóricos, os

analitos progridem na coluna cromatográfica numa sequência de passos estáticos, através da qual estabelecem um equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária. A distância que cada analito percorre na coluna em cada passo é designada por um “prato teórico” (N). Admitindo que a banda cromatográfica reflete uma curva de Gauss perfeita, o número de pratos teóricos pode ser calculado através das seguintes equações:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (4.3)$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (4.4)$$

De acordo com a equação 4.3 é possível determinar o número de pratos teóricos tendo em conta a largura da banda e o tempo de retenção dos analito. Quanto menor for a largura da banda, maior será o número de pratos teóricos e conseqüentemente maior será a eficiência da separação cromatográfica. A equação 4.4 mostra outra forma de se calcular o número de pratos teóricos através da largura do pico a meia altura ($w_{1/2}$) (Harris, D., 2005; Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000).

A partir da altura equivalente a um prato teórico (H) também é possível determinar a eficiência da separação cromatográfica, na medida em que está relacionado com o comprimento da coluna (L) e com o número de pratos teóricos, como mostra a equação:

$$H = \frac{L}{N} \quad (4.5)$$

De acordo com a equação 4.5, quanto menor for a altura equivalente a um prato teórico, mais estreitas serão as bandas cromatográficas o que se traduz numa separação mais eficiente dos picos cromatográficos (Harris, D., 2005).

A teoria dos pratos teóricos explica com sucesso a forma gausseana dos picos cromatográficos. Contudo, esta teoria peca quando considera que existe um estado de equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária, porque na verdade não é possível estabelecer-se um equilíbrio entre uma fase fixa e uma outra móvel. Neste sentido, esta teoria tem sido abandonada a favor da teoria cinética.

De acordo com a teoria cinética, a velocidade da fase móvel é uma das variáveis experimentais que permite um melhor ajuste da eficiência da separação. Esta teoria descreve a eficiência de uma separação cromatográfica com base na equação de

Van Deemter, que relaciona a altura dos pratos teóricos com a média da velocidade linear da fase móvel (cm/s), μ . A equação de Van Deemter é dada pela expressão:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + (C_s + C_M)\mu \quad (4.6)$$

em que, o termo A surge em virtude do preenchimento da coluna cromatográfica não ser regular, de tal forma que as moléculas ao atravessarem a fase estacionária podem seguir vários percursos, influenciando o seu tempo de retenção. Este termo é então dependente do empacotamento da coluna e do tamanho das partículas que a constituem e independente da velocidade da fase móvel. O termo B, surge em virtude do estabelecimento de gradientes de concentração que se formam ao longo de toda a coluna cromatográfica. Estes gradientes resultam da difusão longitudinal das moléculas de zonas de maior concentração para zonas de menor concentração. A altura de um prato teórico, depende diretamente da difusão na fase móvel (D_M) e inversamente da velocidade média linear da fase móvel (μ). Para além disso, quanto maior for a velocidade média linear do solvente, menor será a difusão longitudinal. O termo (C_s+C_m) surge em virtude da resistência à transferência de massa entre o soluto e as fases estacionária e móvel. À medida que um analito vai percorrendo a coluna, as concentrações de analito vão-se alterando, de tal forma que as moléculas do analito na parte inicial da banda estão em grandes concentrações na fase móvel, enquanto na fase estacionária não. Esta diferença de concentrações resulta do rápido arrastamento das moléculas de analito pela fase móvel, verificando-se o oposto na parte de trás da pluma de analito. As moléculas do analito ficam para trás na fase estacionária devido ao rápido movimento da fase móvel. Desta forma obtêm-se picos com dispersão variada (σ), que dependem do tempo que demora até ocorrer o equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária (**Harris, D., 2005; Meyer, V., 2004; Snyder, L., et al,1997; Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

A eficiência de separação cromatográfica é uma medida de relação do alargamento dos picos cromatográficos com o tempo de retenção. Esta depende de alguns parâmetros cromatográficos, como por exemplo: dimensão da coluna, forma e tamanho das partículas, volume e massa da amostra, temperatura e fluxo da fase móvel (**Meyer, V., 2004; Harris, D., 2005; Snyder, L., et al,1997**).

A capacidade que a coluna tem para separar dois analitos, revela-se através da resolução. A resolução declara se existe ou não sobreposição de picos e pode ser definida pela seguinte equação:

$$R_S = 2 \frac{t_{RB} - t_{RA}}{W_A + W_B} \quad (4.7)$$

Para que ocorra a separação de dois picos é necessário que o fator de resolução seja superior a um. Para que esta resolução possa ser quantificada é necessário que seja igual ou superior a 1,5, o que corresponde a um grau de sobreposição mínimo de 2%, figura 4.4 (Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000).

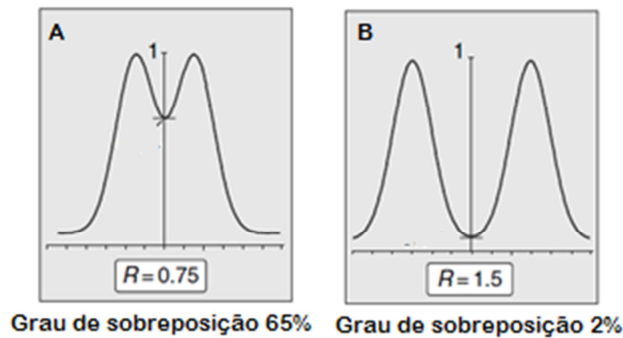


Figura 4.4 – Fatores de resolução em função da sobreposição de bandas cromatográficas. A) Péssimo R_s em virtude da sobreposição total de duas bandas, B) Bom R_s em virtude da não sobreposição das duas bandas (imagem adaptada de Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000).

A resolução também pode ser definida em função do fator de separação (α), do fator de retenção k' e do fator que expressa o alargamento das bandas como mostra a seguinte equação:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K_B}{1 + K_B} \right) \quad (4.8)$$

Assim, de modo a testar a capacidade de separação de uma coluna é uma boa prática medir periodicamente o fator de capacidade de um padrão, o número de pratos teóricos e a assimetria dos picos cromatográficos (Harris, D., 2005).

4.2. Cromatografia Líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta pressão, vulgarmente conhecida por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), é um método separativo de misturas no estado líquido sobre alta pressão. Este método permite a separação de compostos de tamanho muito reduzido (Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000). No entanto, para que se consigam boas separações cromatográficas tem que operar sobre altas pressões para que o caudal da fase móvel elua e arraste as moléculas do analito (Gonçalves, M., 2001).

4.2.1. Esquematização geral de um sistema de HPLC

Um sistema de HPLC é constituído por um reservatório da fase móvel, bomba, injetor, coluna, detetor e um sistema de registo e tratamento de dados (Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000). Estes componentes podem estar interligados através de sistemas modulares. Para além destes constituintes, os sistemas de HPLC mais sofisticados usufruem de um desgaseificador e de um termostato. A figura 4.5 representa um desses sistemas de HPLC.

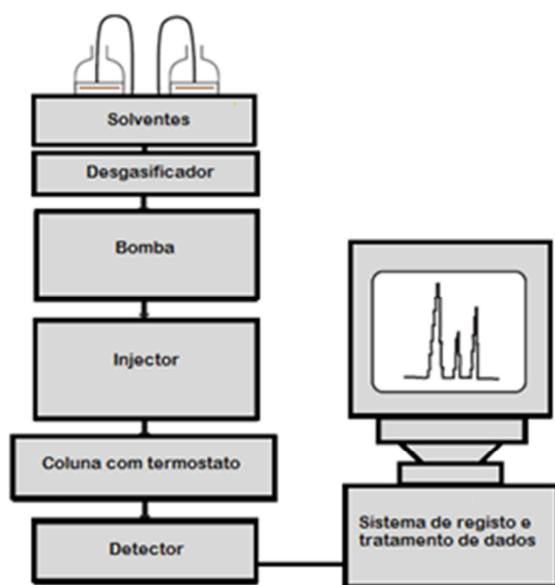


Figura 4.5 – Representação esquemática de um equipamento de HPLC (imagem adaptada de Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000; Degani, A, *et al*, 1998).

4.2.2. Fase estacionária

As fases estacionárias são matrizes sólidas compactas, com as quais os compostos dissolvidos no solvente podem interagir (**Harris, D., 2005**). Vários materiais orgânicos e inorgânicos têm sido usados como matrizes de fases estacionárias. As matrizes mais usadas são matrizes de sílica, que apresentam resistência a altas pressões.

A sílica é constituída por partículas de formato esférico com diâmetro compreendido entre 2 a 10 µm e apresentam uma grande área superficial (**Harris, D., 2005; Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**). A constituição microporosa da sílica permite que a coluna cromatográfica seja compacta e homogénea de forma que o deslocamento da fase móvel ocorra sem a formação de vias preferenciais de deslocamento (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**). A capacidade de adsorção da sílica resulta dos vários grupos funcionais que a constituem, nomeadamente, grupos silanol (Si-OH) isolados e geminais e ligações siloxano, como mostra a figura 4.6. A presença dos grupos silanol isolados, grupos ligeiramente ácidos, tornam a superfície hidrofílica proporcionando a retenção de compostos de carácter básico (**Meyer, V., 2004**). Estas propriedades químicas da sílica, desencadearam a sua frequente utilização na cromatografia de fase normal, pelo que neste tipo de cromatografia requer-se uma fase móvel de carácter menos polar que a fase estacionária (**Harris, D., 2005**).

Contudo, estas características dos grupos silanol podem tornar a superfície da sílica pouco homogénea, de tal forma que os mecanismos de retenção podem ser alterados. Para além disso, podem reagir com a fase móvel de forma a danificar a fase estacionária.

De forma a ultrapassar estes problemas, surgiram novas fases estacionárias de sílica, resultantes da modificação da superfície da sílica. A superfície da sílica foi modificada por introdução de uma camada orgânica que por reação com determinados reagentes formam fases quimicamente ligadas, como por exemplo, C18 (octadecil sílica) e C8 (octil sílica). Estas fases detêm poder de retenção para compostos apolares, de tal forma que são frequentemente empregues na cromatografia de fase reversa. Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é não polar e a fase móvel polar, pelo que os solutos mais polares eluem primeiro (**Tonhi, E., et al, 2002**).

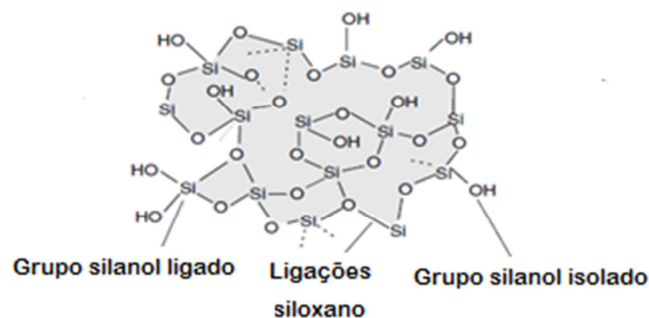


Figura 4.6 - Esquematização da estrutura geral química de uma fase estacionária de matriz siliciosa (imagem adaptada de **Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.2.3. Colunas

As colunas cromatográficas contêm no seu interior a fase estacionária, que se localiza entre dois discos porosos situados em cada uma das extremidades. Normalmente, são colunas de aço inoxidável cujo comprimento varia entre 5 a 30 cm e o diâmetro interno entre 1 a 5mm (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000; Harris, D., 2005**). Por vezes, este tipo de colunas são revestidas internamente por um material inerte, como por exemplo vidro (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**). Muitas vezes, as colunas cromatográficas são facilmente degradadas por partículas sólidas presentes na amostra ou até mesmo nos solventes de eluição. Dado o seu elevado custo, vulgarmente, a entrada destas colunas é protegida por pré-colunas com a mesma fase estacionária. As pré-colunas irão reter eventuais impurezas de tal forma que estas não cheguem à coluna principal, podendo ser substituídas periodicamente (**Harris, D., 2005**).

A precisão de uma análise cromatográfica pode ser aumentada, se a coluna estiver inserida num forno termostaticado, o que permite manter a temperatura controlada. O aquecimento da coluna proporciona uma diminuição da viscosidade dos solventes, que se traduz na redução da pressão e na diminuição dos tempos de retenção sem haver alterações na resolução dos picos cromatográficos. No entanto, temperaturas altas (superiores a 45°C), tendem a degradar a fase estacionária, diminuindo consequentemente o tempo de vida da coluna e a resolução dos picos. Neste sentido, é recomendado o uso de colunas cromatográficas aquecidas, mas a uma temperatura contante entre 25°C a 30 °C (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.2.4. Fase móvel



A fase móvel de um sistema de HPLC são os solventes que transportam os solutos através da coluna cromatográfica e deve ser sempre escolhida em função do tipo de fase estacionária que a constitui (**Harris, D., 2005**). Antes da análise cromatográfica, esta deverá ser sempre desgaseificada e de elevado grau de pureza, *HPLC grade* ou qualidade semelhante (**Meyer, V., 2004**). A utilização deste tipo de solventes é imperativa para que a eventual presença de impurezas não resulte na degradação da fase estacionária e para que o sinal do detetor não seja alterado por deteção de contaminantes (**Harris, D., 2005**). Neste sentido, antes de uma análise de HPLC, eventuais bolhas de ar deverão ser eliminadas dos solventes por sonicação e do sistema de HPLC por purga com hélio ou com recurso a um módulo desgaseificador. A distribuição dos solventes por todo o sistema cromatográfico dá-se por um tubo com um diâmetro interno muito pequeno e com capacidade de resistir a altas pressões, mais de 350 bar (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**). A extremidade do tubo cromatográfico que está em contato com os solventes deverá ter sempre um filtro, que permita a retenção de pequenas partículas que possam existir nos recipientes dos solventes (**Harris, D., 2005**).

4.2.5. Processo de eluição

O processo de eluição de um soluto depende da força de eluição dos solventes, não sendo totalmente dependente das propriedades físico-químicas desse soluto.

A força de eluição de um solvente caracteriza-se pela sua energia de adsorção à fase estacionária. Quanto maior for a força eluente, maior é a capacidade que o solvente tem para solubilizar os solutos. No entanto, tudo depende também do tipo de fase estacionária que se usa. Na cromatografia de fase normal, usa-se uma fase estacionária polar e uma fase móvel menos polar, pelo que um solvente mais polar tem uma força de eluição maior. Na cromatografia de fase reversa, usa-se um solvente mais polar, pelo que um solvente menos polar, tem uma força de eluição maior sobre uma fase estacionária apolar ou fracamente polar, cf. tabela 4.2 (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000, Harris, D., 2005**).

Tabela 4.2 – Força eluente dos solventes usados como fases estacionárias de uma cromatografia de fase normal ou de fase reversa (tabela adaptado de **Rouessac & F., Rouessac, A., 2000**).

Solvente	Força eluente	
	Fase de polaridade normal	Fase de polaridade reversa
Hexano	Fraca	Forte
Tolueno		
Triclorometano		
Diclorometano		
Éter		
Acetato de etilo		
Metanol		
Água		

Na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*), eluições por gradiente são decisivas na resolução dos picos cromatográficos. No entanto, alguns cuidados são imprescindíveis, pelo que quando se efetuam várias análises sucessivas, o reequilíbrio das duas fases de modo a que estas retomem à sua concentração inicial requerer a passagem de um volume mais do que 10 vezes o volume morto (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.2.6. Bombas

A presença de pelo menos uma bomba num sistema de HPLC permite a retirada dos solventes dos seus reservatórios a um fluxo constante, evitando pulsões que eventualmente resultem de variações na composição dos solventes, ou da presença de bolhas de ar (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**). O fluxo de bombagem pode variar entre 0,1 mL/min a 10 mL/min, mas para análises preparativas de HPLC, o fluxo poderá ser 100 mL/min (**Scott, R., 2003**). A presença de bombas permite a passagem da fase móvel pelas colunas cromatográficas compactadas. Como resultado, ocorre um aumento da pressão no injetor chegando a atingir cerca de 200 bar, dependendo da viscosidade da fase móvel e do empacotamento da coluna cromatográfica (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

Os sistemas de HPLC, geralmente, são constituídos por duas ou mais bombas, dependendo do número de solventes usados. Normalmente, estas bombas são de 2 pistões em série que trabalham em oposição para evitar que haja interrupções no fluxo de eluição. Enquanto um pistão está a bombear, o outro está a ser preenchido com solventes de composição fixa, operando em modo isocrático, ou de composição variável de modo a criar gradientes de eluição (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.2.7. Injetores

A injeção da amostra na entrada da coluna cromatográfica deve ser efetuada de forma rápida e sem perturbar o fluxo estável da fase móvel. O volume da amostra a injetar deve ser fixo, variando entre 2 a 1000 μL (**Harris, D., 2005**). A injeção da amostra é efetuada de forma manual ou automática, através de uma válvula de injeção. A válvula de injeção pode assumir duas posições, nomeadamente a posição de carregamento da amostra e a posição de injeção. (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

Na posição de carregamento da amostra, apenas a ligação entre a bomba e a coluna cromatográfica está assegurada. A amostra a analisar será introduzida com uma seringa, a uma pressão atmosférica elevada, numa zona tubular pequena (*loop*). Na posição de injeção, a amostra é injetada a alta pressão para dentro da coluna após a rotação da válvula de injeção a 60°C, ligando o circuito da amostra ao da fase móvel (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.2.8. Detetores

Os detetores são parte integral de um sistema de HPLC, que após a passagem de um analito pela coluna cromatográfica geram um sinal que é posteriormente revelado num computador como um desvio em relação à linha de base (**Sadek, P., 2004; Meyer, V., 2004**). O sinal surge em virtude da concentração de analito detetado. Um detetor é considerado um bom detetor quando é capaz de ser sensível a baixas concentrações de todos os analitos, de fornecer uma resposta linear, de não causar o alargamento dos picos eluídos e de ser insensível a alterações na temperatura e na composição dos solventes (**Harris, D., 2005**).

Os detetores de HPLC foram desenvolvidos de forma a detetarem e permitirem a quantificação de analitos de acordo com as suas propriedades óticas e químicas, nomeadamente, absorção UV/vis, fluorescência e índice de refração e razão massa/carga (Meyer, V., 2004). Neste subcapítulo, só os detores de UV/vis e de razão massa/carga serão descritos, uma vez que foram os detores utilizados neste trabalho.

4.2.8.1. Detetores espectrofotométricos

Os detetores mais comuns em HPLC são os detetores de ultravioleta (UV), porque existem muitos solutos que absorvem radiação ultravioleta. Para além disso, estes são sensíveis, têm uma vasta gama de linearidade, não são afetados por eventuais variações de temperatura e podem operar em modo de eluição por gradiente (Rouessac, F.& Rouessac, A., 2000).

A deteção dos analitos por este tipo de detetores é baseada na lei de Lambert-Beer, $Abs = \epsilon l c$, em que Abs representa a absorvância da fase móvel à medida que sai da coluna, podendo ser medida a um ou mais comprimentos de onda do espectro do visível ou do UV; ϵ representa o coeficiente de extinção molar dos solutos detetados, l , o comprimento do percurso ótico na célula analítica onde o eluato passa e C representa a concentração dos analitos detetados (Harris, D., 2005). Com este tipo de deteção é importante que os solventes utilizados como fase móvel não absorvam de forma significativa para não interferirem nos espectros de deteção dos analitos (Harris, D., 2005).

Os detetores espectrofotométricos mais comuns utilizam como fonte de luz, lâmpadas que emitem luz policromática, como por exemplo, lâmpadas de deutério, xénon ou tungstênio (Skoog, D., et al 2001). Os detetores de matriz de fotodíodos (DAD - Diode-Array Detectors), são um exemplo destes detetores. Nestes a luz policromática UV/Vis ao incidir na célula será dispersada e transmitida, de acordo com os constituintes da amostra, para uma matriz de díodos que monitoriza as suas intensidades de radiação efetuando o seu registo sobre a forma de espectro UV. Num espectro UV, o perfil cromatográfico para cada componente da amostra varia de acordo com a absorvância, tempo de eluição e com os comprimentos de onda monitorizados, como mostra a figura 4.7 (Rouessac, F.& Rouessac, A., 2000).

O facto de ser possível monitorizar a vários comprimentos de onda ao mesmo tempo e de poder ser utilizado em modo de gradiente de eluição torna este detetor bastante utilizado em análises de rotina (**Rouessac, F.& Rouessac, A., 2000**).

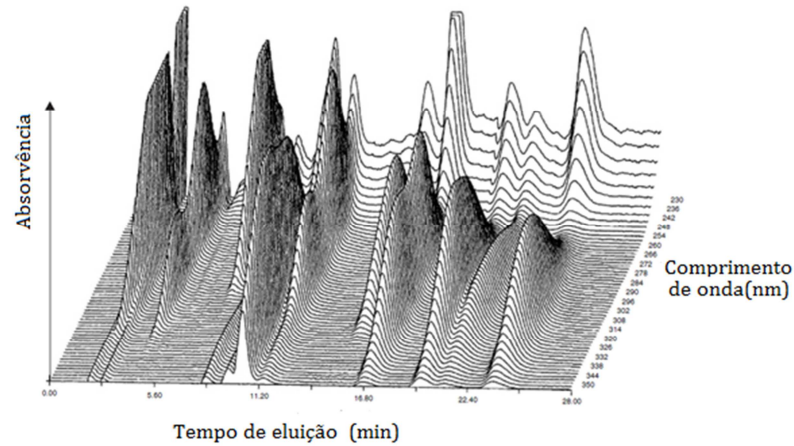


Figura 4.7 – Exemplificação de um espectro de UV 3D, em que o perfil cromatográfico para cada componente da amostra varia de acordo com a absorvância, tempo de eluição e com os comprimentos de onda monitorizados (imagem adaptada de **Rouessac, F.& Rouessac, A., 2000**).

4.2.8.2. Deteção por espectrometria de massa

Hoje em dia, os sistemas de HPLC para além de conterem detetores de UV, podem combinar outros detetores analíticos, nomeadamente, detetores de massas. Os detetores de massa, na verdade, detetam um analito de acordo com a sua razão carga/massa com base nos fundamentos teóricos que estão por detrás da espectrometria de massa.

Uma vez que neste trabalho experimental se utilizou também um detetor de massas, no subcapítulo seguinte, será abordado com mais detalhe a técnica altamente sensível e específica de espectrometria de massas.

4.3. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite a caracterização estrutural elementar de amostras complexas através da determinação da sua massa atômica e molecular, pelo que permite obter informações sobre as estruturas moleculares de compostos inorgânicos, orgânicos e biológicos que as constituem (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

A espectrometria de massa, ao longo dos tempos tem vindo a sofrer melhorias contínuas de tal forma que a tornaram uma técnica mais sensível e versátil de modo a fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos em estudo (**Harris, D., 2005**). Esta versatilidade faz com que a espectrometria de massa seja um método de deteção utilizado em várias áreas, nomeadamente, bioquímica, química orgânica, inorgânica, clínica e ambiental (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.3.1. Fundamentos teóricos

Para que uma amostra possa ser analisada por espectrometria de massas é necessário que essa amostra primeiramente seja convertida em fase gasosa. Após essa conversão, a amostra será ionizada e as espécies carregadas resultantes serão submetidas sob vácuo à ação de campos magnéticos e/ou elétricos, dependendo do tipo de equipamento. A relação das forças exercidas sobre os iões permite a determinação da sua razão massa/carga. De acordo com a abundância e a razão massa/carga dos iões formados, estes são apresentados por ordem crescente de razão massa/carga num gráfico designado por espectros de massa (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2000**).

4.3.2. Esquematização geral de um sistema de espectrometria de massa associado à cromatografia líquida

Um espectrómetro de massas é constituído por 3 componentes principais, nomeadamente, fonte de ionização, analisadores de massa e detetores, como mostra a figura 4.8.

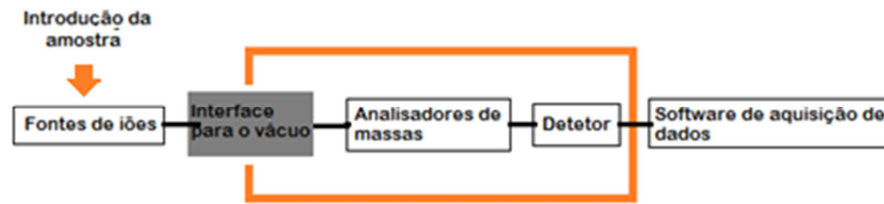


Figura 4.8 – Esquematização dos constituintes básicos de um espectrômetro de massa.

4.3.2.1 Fonte de ionização

A fonte de ionização é um componente primordial num espectrômetro de massas. Para que um espectro de massa de determinada amostra seja obtido é necessário que as moléculas que as constituem sejam transformadas em iões, ou seja, sejam ionizadas. Este processo de ionização ocorre por adição ou remoção de partículas carregadas dependendo do tipo de ião que está a ser formado (**Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007**).

Dado que o processo de ionização é fundamental à espectrometria de massa, várias fontes de ionização têm sido desenvolvidas ao longo dos tempos. Na tabela 4.3 estão representados todas as fontes de ionização e os respetivos agentes de ionização que atualmente são utilizadas na espectrometria de massa, no entanto, só a ionização por *electrospray* será descrita com mais detalhe, uma vez que foi o tipo de ionização utilizado neste trabalho. As abreviaturas são apresentadas em inglês, pelo que é desta forma que são vulgarmente conhecidas.

Tabela 4.3 - Fontes de ionização e os respetivos agentes de ionização atualmente utilizadas em LC-MS (Tabela modificada de **Skoog, D., et al 2001**).

Fontes de ionização	Agentes de ionização
Ionização por eletronebulização (ESI)	Campo elétrico elevado
Ionização química a pressão atmosférica (APCI)	Vapores de eluente ionizados por efeito de “corona”
Dessorção/ionização com laser auxiliada por matriz (MALDI)	Faixa de laser

4.3.2.3.1 Ionização por *electrospray*

A ionização por *electrospray* (ESI) é uma das principais técnicas de ionização, sendo frequentemente utilizada na determinação estrutural de moléculas biológicas de elevado peso molecular e de espécies inorgânicas e poliméricas (Skoog, D., *et al* 2001). A ionização por eletronebulização ocorre à pressão atmosférica num dispositivo como o apresentado na figura 4.9.

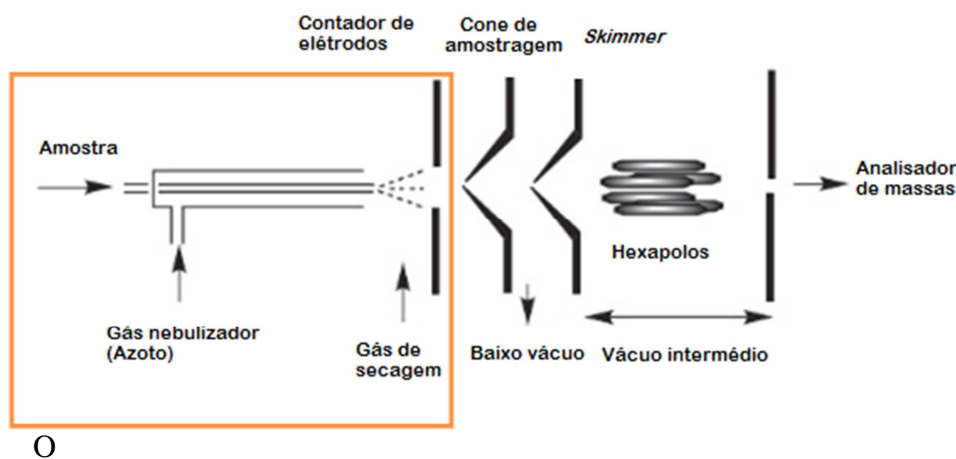


Figura 4.9 – Sessão transversal de um dispositivo de ionização por *electrospray* (imagem adaptada de Dass, H., 2007).

Os mecanismos envolvidos no processo de ionização, ainda não estão completamente esclarecidos, no entanto, são conhecidos dois modelos que tentam explicar este processo, nomeadamente, o modelo do resíduo carregado (CRM – *charged-residue model*) e o modelo da dessorção de iões (IDM – *ion-desorption model*) (Souza, L., 2008). Estes dois modelos consideram que o processo de ionização começa com a formação de um aerossol, que surgirá a partir da ponta do capilar em virtude da formação do cone de Taylor. A formação deste cone resulta da exposição das microgotas do solvente a fortes campos elétricos (Dass, H., 200; Souza, L., 2008). À medida que o campo elétrico aumenta, o cone inverte-se e um jato é projetado, formando um *spray* de minúsculas gotas de solvente que contêm o analito e que estão carregadas com cargas elétricas positivas ou negativas, dependendo do modo de ionização de análise. Estas gotículas de solvente, posteriormente, serão evaporadas por ação de um fluxo de azoto (N₂) aquecido, sendo o seu diâmetro reduzido rapidamente. Com esta redução de tamanho, as cargas contidas nessas gotículas passam a estar mais

próximas umas das outras causando uma maior repulsão eletrostática. Quando a força de repulsão eletrostática (ou Coulômbica) é maior que a força de tensão do solvente ocorre um colapso e a formação de gotículas mais pequenas de solvente e de analito (figura 4.10). É a partir deste ponto que estes dois métodos diferem um do outro (Dass, H., 2007). De acordo com o modelo CRM as gotículas continuam a ser evaporadas e a sofrerem processos de fissão até que todas as moléculas sejam dessolvatadas, ocorrendo desta forma uma transferência de cargas entre o solvente e o analito, produzindo iões isolados (Figura 4.10 – A). Enquanto o modelo IDM (*Ion-Desorption Model*) considera que depois da evaporação, as moléculas de solvente ficam com o tamanho suficiente para expulsarem os analitos para fora da gotícula por transferência de carga (Figura 4.10 – B) (Dass, H., 2007). Hoje em dia pensa-se que o método seguido para formação de iões depende do tipo de analito, sendo o CRM o método seguido para ionização de moléculas hidrofílicas, enquanto o IDM para ionização de moléculas hidrofóbicas (Dass, H., 2007;Souza, L., 2008).

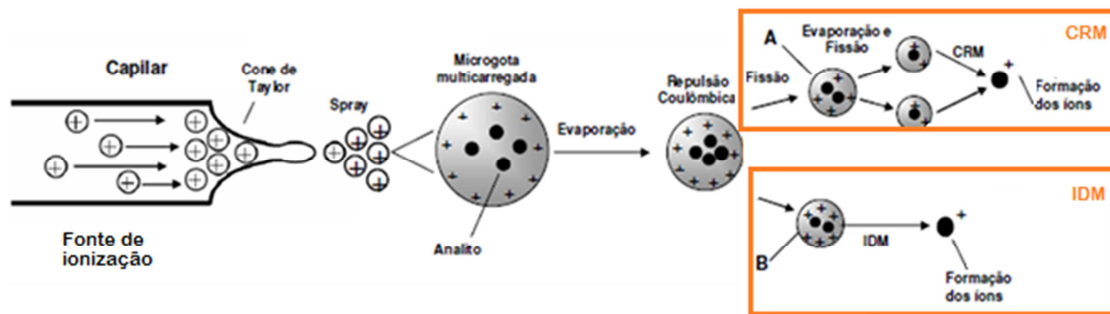


Figura 4.10 - Modelo de ionização por *electrospray*. A) Modelo do resíduo carregado, CRM e B) Modelo da dessorção de iões, IDM (imagem modificada de Souza, L., 2008).

Durante o processo de ionização, para além da ionização dos analitos pode haver a ionização das moléculas de solvente ou de outras moléculas eventualmente presentes na amostra. A ionização destas moléculas desencadeia a formação de adutos que podem interferir com o espectro de massa dos analitos. Na tabela 4.4 estão representados alguns dos iões produzidos em virtude da ionização por *electrospray* e do modo de ionização escolhido.

Tabela 4.4 – Iões típicos produzidos por ionização *electrospray* (adaptado de **Waters Marketing**).

Modo de ionização	Iões produzidos	Designação
Positivo	$[M+H]^+$	Molécula protonada
	$[M+Na]^+$, $[M+K]^+$	Adutos
	$[M+CH_3CN+H]^+$	Molécula protonada com adutos
Negativo	$[M-H]^-$	Molécula desprotonada
	$[M-HCOO]^-$	Adutos

4.3.2.2 Analisadores de massas

Os analisadores de massas são parte integrante de um espectrómetro de massa. Estes controlam a trajetória que os campos elétricos e magnéticos impõem aos iões após a sua entrada no espectrómetro de massa, de modo a que depois da sua separação de acordo com a razão massa/carga, consigam alcançar o detetor. Hoje em dia, são conhecidos vários analisadores de massas (**Dass, H., 2007; Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007**). Na tabela 4.5 estão representados alguns dos analisadores que atualmente são utilizadas na espectrometria de massa, no entanto, só o analisador *ion trap* será descrito com mais detalhe, uma vez que foi o analisador de massas utilizado neste trabalho. As abreviaturas são apresentadas em inglês, pelo que é desta forma que são vulgarmente conhecidas.

Tabela 4.5 – Analisadores de massa atualmente utilizados na espectrometria de massa (Tabela adaptada de Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007).

Tipos de Analisadores de massa	Sigla	Princípio da separação
Analisadores com setor magnético	B	Momento magnético
Analisadores com setor elétrico	E ou ESA	Energia cinética
Analisadores quadrupolar de transmissão	Q	m/z Estabilidade da trajetória
Analisadores de massa através do tempo de voo	TOF (<i>Time of Flight</i>)	Velocidade
Analisadores de captura de iões	IT (<i>Ion trap</i>)	m/z Frequência de ressonância
Analisadores com transformada de Fourier tipo Orbitrap™	FT-OT	m/z Frequência de ressonância
Analisadores com transformada de Fourier de ressonância de íon ciclotron	FTICR	m/z Frequência de ressonância

4.3.2.3.1 Analisadores quadrupolares de captura de iões – *Ion trap*

Os analisadores de massa quadrupolares de captura de iões utilizam campos elétricos oscilatórios para estabilizarem ou destabilizarem seletivamente os iões que aprisionaram de acordo com a sua razão massa/carga. Os iões resultantes do processo de ionização que foram encaminhados até a estes analisadores são aprisionados, daí o nome de “armadilha de iões”. Esta armadilha de iões é composta por 3 elétrodos, um com formato circular e posição central e dois com geometria hiperbólica mas localizados nas extremidades, que geram um campo elétrico que mantém os iões aprisionados e a circular de forma estável, figura 4.11. Posteriormente, serão ejetados para fora do analisador pela aplicação de uma força crescente de radiofrequência (FR) que os destabiliza ejetando-os de acordo com a sua razão crescente de massa/carga em direção ao detetor (Dass, H., 2007).

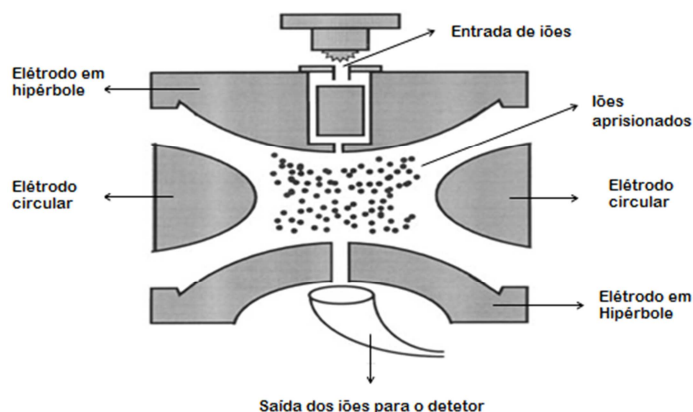


Figura 4.11 – Sessão transversal de um analisador *Ion Trap* (imagem adaptada de March, R., 1997).

4.3.2.3 Detetores

Os detetores são o componente final de um espectrómetro de massa. Estes são responsáveis pela detecção dos íons separados no analisador de massas. Os detetores convertem os íons, positivos ou negativos em elétrões que dão origem ao sinal elétrico que pode ser amplificado por efeito de cascata sendo traduzidos num espectro de massa (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007). Atualmente, são conhecidos alguns detetores de massa.

Na tabela 4.6 estão representados alguns desses detetores, no entanto só o detetor multiplicador de elétrões será descrito com mais detalhe, uma vez que foi o detetor de massas utilizado neste trabalho. As abreviações são apresentadas em inglês, pelo que é desta forma que são vulgarmente conhecidas.

Tabela 4.6 – Detetores de massa atualmente utilizados na espectrometria de massa (Tabela adaptada de Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007).

Detetor de Massas	Sigla	Princípio
<i>Faraday cup</i>	FC	Corrente de carga
Multiplicador de electrões	EM (<i>Electronmultipliers</i>)	Energia cinética
Detetor de íons eletro-óticos	EOID (<i>Eletro-optical ion detectors</i>)	Energia cinética

Os detetores de espectrometria de massa podem também determinar a forma como se obtém o cromatograma. Quando um cromatograma é traçado tendo em conta todos os componentes eluídos, esse cromatograma é obtido por corrente total de iões (TIC – *total ion current*). Quando se seleciona um ião em particular, modo de monitorização seletiva (SIM - *Selective Ion Monitoring*), obtém-se um cromatograma seletivo. Embora, este método em alguns casos conduza a uma menor sensibilidade que a dos detetores clássicos, para muitos tipos de análises, nomeadamente no contexto dos estudos ambientais, tornou-se essencial. Quando se seleciona alternadamente entre o ião precursor e o ião produto obtém-se um cromatograma em modo de monitorização de múltiplas reações (MRM - *Multiple Reaction Monitoring*).

4.3.2.3.1 Detetor multiplicador de eletrões

Detetores multiplicadores de eletrões têm sido os detetores mais utilizados na espectrometria de massa. Depois de os analisadores separarem os iões de acordo com a sua massa/carga, estes são acelerados neste tipo de detetor de modo a aumentar a sua eficiência de deteção (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007). Os iões ao entrarem no detetor vão chocar com eléctrodos existentes no multiplicador, designados por díodos. Existem dois tipos de multiplicadores de eletrões: díodo discreto, constituído por 16 a 20 díodos e os díodos contínuos, que atuam como um eléctrodo contínuo, como mostra a figura 4.12 (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007). Os iões ao chocarem vão removendo eletrões da superfície interna do detetor, e dado que este processo é um processo que se repete várias vezes, no final cada ião incidente foi amplificado até uma ordem de grandeza 10^7 (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007).

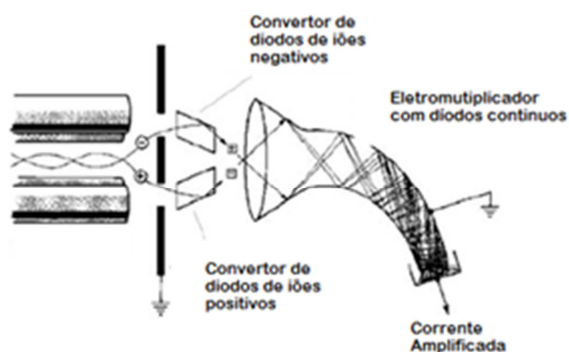


Figura 4.12 – Representação esquemática de díodos contínuos (imagem adaptada de Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007).

4.5. Espectrometria por análise MS/MS

Ao longo dos últimos anos, a espectrometria por análise MS/MS, tem vindo a destacar-se devido à sua alta especificidade e sensibilidade. Esta técnica de deteção pode ser entendida como uma técnica que opera em modo sequencial de deteção de massas/cargas (m/z) (Dass, H., 2007). A deteção de m/z é efetuada em 3 passos. No primeiro passo, ocorre a seleção do ião precursor (este é o ião de interesse e é assim chamado porque irá dar origem a outros iões), no segundo passo ocorre a fragmentação deste ião de forma a formar iões-fragmentados e por fim, no terceiro passo, ocorre a análise e deteção dos iões-fragmentados pelos métodos anteriormente descritos. Nos espectros de deteção dos iões-fragmentados irão estar só representados os picos que dizem respeito à deteção da sua razão m/z e não os dos iões precursores, figura 4.13 (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007; Dass, H., 2007).

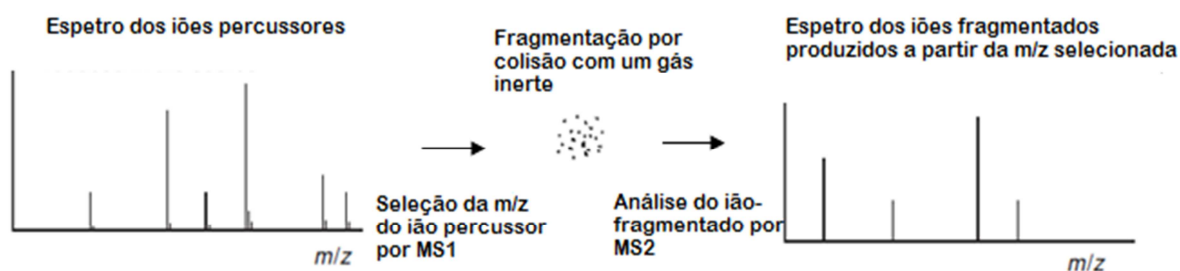


Figura 4.13 – Esquemática da formação de um espectro de MS/MS de um ião-fragmentado a partir do seu ião precursor (imagem adaptada de Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007).

Um espectrómetro de massa em modo MS/MS para além de operar em modo SIM pode operar também em modo MRM (Dass, H., 2007).

Para efetuar análises em modo MS/MS é necessário que os equipamentos de espectrometria de massa estejam equipados para tal. De entre os equipamentos mais utilizados, destaca-se *Ion trap*, figura 4.14 (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007). Neste equipamento, os iões resultantes da ionização vão ser encaminhados para a *trap* onde serão por instantes aí acumulados. Na *trap* os iões de interesse serão isolados, enquanto os restantes serão ejetados. Uma vez isolados, os iões serão excitados por ação de um campo multipolar 3D, de tal forma a colidirem com o gás de colisão, hélio. Desta

colisão, resultam íons fragmentados que irão permanecer condensados num “poço de potencial”, formado anteriormente por indução de campos de frequência RF aplicados ao anel da *trap*. Estes íons sob a forma de m/z entram em ressonância por aplicação de um potencial adicional ao eléctrodo de topo com $1/3$ da frequência principal e são ejetados do poço, figura 4.15 (Bruker Daltonics, 2004).

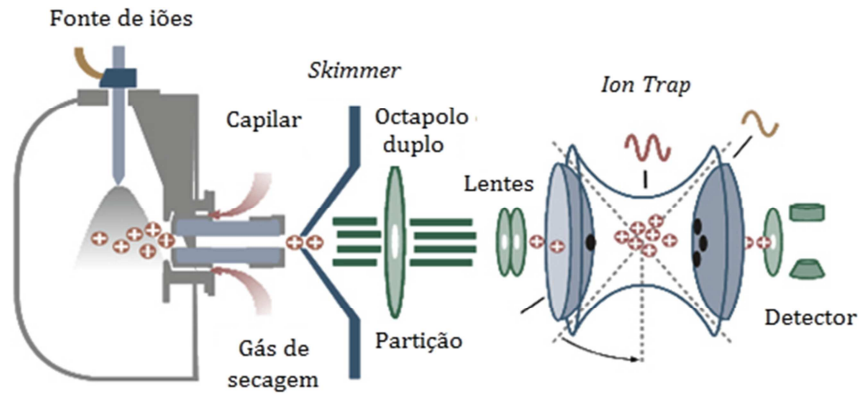


Figura 4.14 – Sessão transversal de um espectrómetro de massa *tandem* com analisador *ion trap* (imagem adaptada de Bruker Daltonics, 2004)

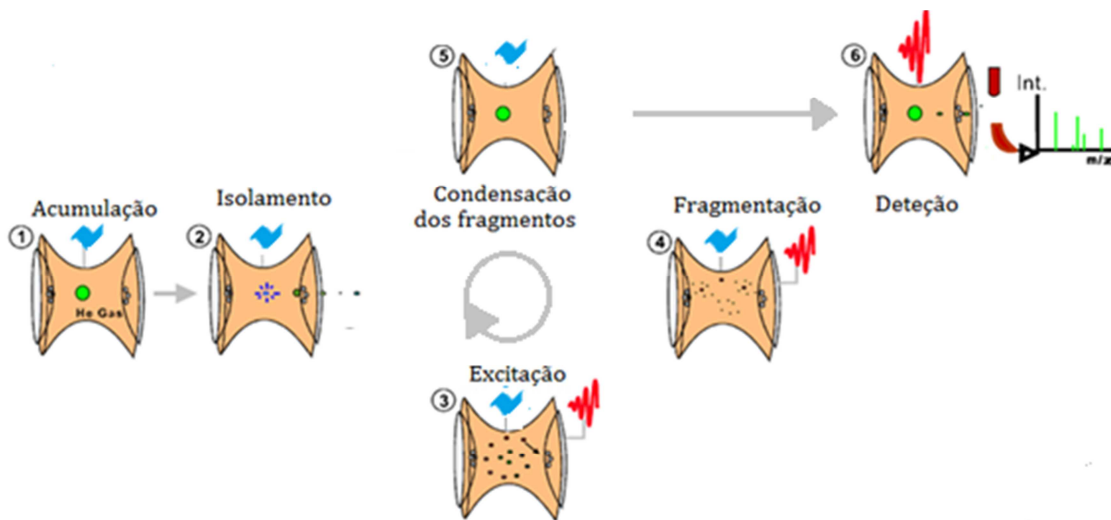


Figura 4.15 – Esquemática da formação de um íon-fragmentado a partir do seu íon precursor por um *ion trap*-MS/MS (imagem adaptada de Bruker Daltonics, 2004).

Uma vez que os produtos da dissociação estão armazenados na *trap*, um desses íons com um determinada m/z , ao ser seleccionado, irá formar íons fragmentos com uma determinada m/z . Ao invés de serem logo detetados, se esses íons forem novamente fragmentados, obtêm-se novos íons-fragmentados com uma terceira m/z . A análise

destes iões-fragmentados irá assumir a designação de MS/MS/MS ou MS³ (Bruker Daltonics, 2004; Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007). Este procedimento pode ser efetuado até 6 ou 7 vezes sucessivas (Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007). À medida que se aumenta o número de passos para a deteção de um determinado ião, aumenta o número de gerações (n) de iões analisados, de modo a que a análise assumirá a designação de MSⁿ (Bruker Daltonics, 2004; Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007).

4.5. LC-MS/MS

A cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa em modo MS/MS (LC-MS/MS) é uma técnica analítica que permite que os vários componentes que constituem uma amostra sejam separados, isolados, identificados e quantificados com elevado índice de especificidade e seletividade. Por este facto, o LC-MS/MS tem vindo a ser utilizado em várias áreas da investigação, como por exemplo, química (Kim, H. & Shin, H., 2011), ambiente (Maragou, N., *et al*, 2011) e ecologia microbiana (Dahlmann, J., *et al*, 2003). Dahlmann, J., *et al*, 2003, quantificaram em simultâneo por LC-MS/MS, várias toxinas planctónicas numa simples corrida de 30 min. As biotoxinas detetadas foram saxitoxina, anatoxina-A, ácido domoico, nodularina, ácido ocaídoico, dinofisiotoxina-1 e microcistinas. Estas biotoxinas foram determinadas individualmente com um limite de deteção (LD) igual ou inferior a 1µg/L depois de uma extração com metanol-água. Ainda neste estudo os autores isolaram e identificaram substâncias suspeitas de serem “novas” microcistinas, que são hepatotoxinas produzidas por cianobactérias. Ferranti, P., *et al*, 2009, caracterizaram por LC-MS/MS uma nova variante destas cianotoxinas isolada de um *bloom* de *Planktothrix rubescens* no lago Averno, Nápoles, Itália. Em LC-MS/MS para além de identificar e quantificar, também é possível elucidar as estruturas moleculares de novas variantes de microcistinas presentes em amostras de água doce, bem como de variantes de microcistinas para as quais ainda não existe comercialmente nenhum padrão disponível (Diehnelt, C., *et al*, 2005; Frias, H., *et al*, 2006). Para além de amostras de água, a técnica de LC-MS/MS também pode ser utilizada para a análise de biotoxinas em bivalves e peixes. Mekerebi, A., *et al*, 2009, desenvolveram e validaram um método por LC-ESI – MS/MS em modo MRM, para identificar e quantificar 6 microcistinas (MC-LA, LF, LR, LW, RR e YR) em amostras de água, bivalves e tecidos de peixes. Os limites de deteção e quantificação

das microcistinas detetadas foram determinados entre 0,2 e 1,0 pg em coluna, sendo estes valores 2 pg inferiores aos publicados na literatura até então.

Dada a sensibilidade e especificidade de LC-MS/MS apresentam-se no capítulo seguinte os métodos e procedimentos de otimização utilizados a fim de implementar um método de análise de algumas variantes de microcistinas por LC-ESI-MS/MS, bem como os respetivos resultados.

Capítulo V

Ensaio de um método de análise de microcistinas por LC-ESI-MS/MS

De modo a monitorizar a produção e a libertação de microcistinas em culturas de *M. aeruginosa* antes e depois da infeção com vírus específicos, foi desenvolvido um método de análise por LC-ESI-MS/MS. Para tal, foram efetuados estudos de forma a estabelecer as condições cromatográficas e de espetrometria de massa para uma separação, identificação e quantificação de microcistinas eficiente. Como uma análise por LC-ESI-MS/MS requer primeiramente um tratamento das amostras, foram também efetuados estudos de forma a estabelecer o método de extração de microcistinas adequado. Assim, no presente capítulo são apresentados todos os materiais, equipamentos e métodos utilizados para este fim, bem como os respetivos resultados.

5.1. Materiais

5.1.1. Reagentes e soluções padrão

Ao longo de todo o trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido trifluoracético (TFA) Sigma;
- Metanol *isocratic Chromatography grade* Merck, LiChrosolv;
- Metanol *gradient Chromatography grade* Merck, LiChrosolv;
- Acetonitrilo *gradient Chromatography grade* Merck, LiChrosolv;
- Ácido fórmico *MS grade*, Sigma;
- Água desionizada purificada por um sistema Millipore Simplicity™ 185;
- Sulfito de sódio, Sigma.

Para a otimização dos parâmetros de espectrometria de massa e das condições cromatográficas utilizaram-se padrões certificados de microcistina-LR (MCT-LR) de 10 µg/L e de 30 mg/L, de microcistina-RR (MCT-RR) de 10 µg/L e de microcistina-YR (MCT-YR) de 10 µg/L. O padrão certificado MCT-LR 30 mg/L foi gentilmente cedido pela Prof^a. Doutora Margarida Ribau Teixeira para a realização dos ensaios de seleção e otimização do método de extração de MCT. Os restantes padrões certificados foram adquiridos à LGS *standards*.

5.1.2. Consumíveis analíticos

Ao longo de todo o trabalho experimental foram utilizados os seguintes consumíveis analíticos:

- Cartuchos de extração em fase sólida:
 - Varian Bond Elut C18, 500 mg 3 mL
 - Varian Bond Elut Env, 200 mg 3 mL;
 - Chromabond C18 ec, 200 mg 3 mL;
 - Chromabond C8, 200 mg 3 mL;
 - Chromabond Easy, 200 mg 3 mL.
- Coluna cromatográfica Grace smart RP-18, 3 µm 150 mm x 2,1 mm.

5.2. Equipamentos

Para a preparação das amostras antes da análise das microcistinas foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Sonicador Bandelin Sonorex Super RK255H;
- Sistema de extração vaccum manifold (Macherey - Nagel);
- Bomba de vácuo S&S.

A análise de microcistinas foi efetuada no Sistema de HPLC Agilent Technologies, modelo 1200, com desgaseificador e termostato incorporados e com detetor UV/Vis DAD a monitorizar dois comprimentos de onda, nomeadamente 238 nm

e 250 nm. Este sistema de HPLC esteve acoplado ao espectrómetro de massa Bruker Daltonics HCT ultra, com fonte de ionização por *electrospray* e analisador *ion trap*. O *software* Bruker Daltonics esquire 6.1 foi utilizado para o registo dos cromatogramas e dos espectros de massa e o *software* DataAnalysisTM Versão 3.4 foi usado para o tratamento desses cromatogramas e espectros. A figura 5.1 mostra uma fotografia do equipamento.

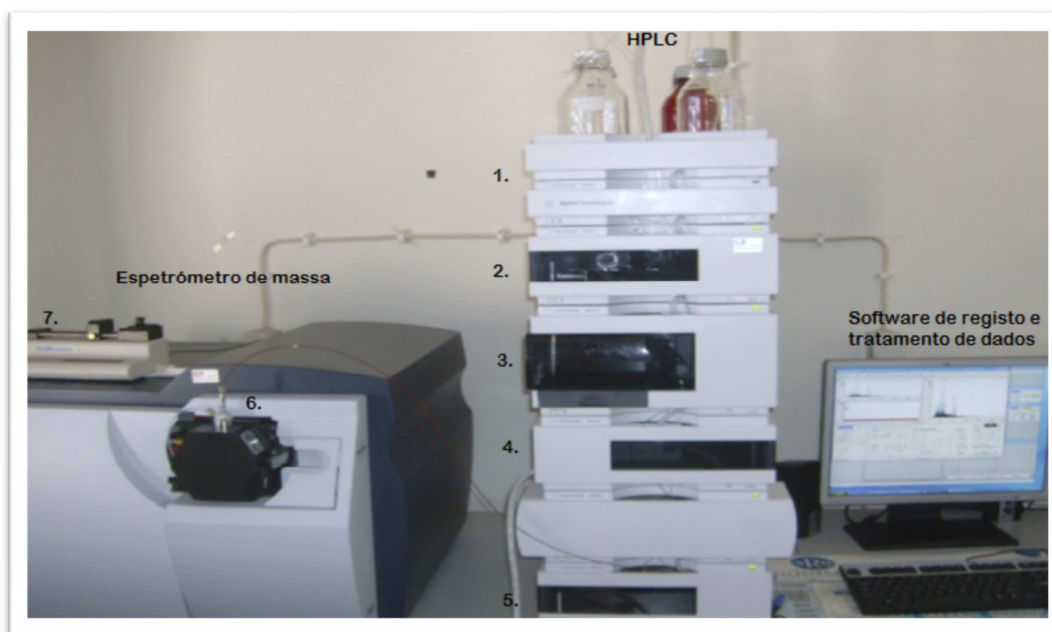


Figura 5.1 - Sistema de HPLC *Agilent Technologies* modelo 1200, acoplado ao espectrómetro de massa Bruker Daltonics HCT ultra. 1. Reservatório dos solventes, 2. Bomba quartenária, 3. Injetor, 4. Coluna termostatzada, 5. Detetor de UV/Vis DAD, 6. Fonte de ionização e 7. Bomba de seringa para injeção direta.

5.3. Métodos

5.3.1. Otimização de um método de análise de microcistinas por LC-ESI-MS/MS

Para que a análise de algumas variantes de microcistinas por LC-ESI-MS/MS pudesse ser efetuada, primeiro foi necessário otimizar as condições de separação, identificação e quantificação destas cianotoxinas. Para tal, antecederam-se estudos de otimização dos parâmetros de espetrometria de massa assim como dos

parâmetros cromatográficos, com soluções padrão de trabalho das variantes LR, YR e RR de microcistinas preparadas a partir das soluções padrão *stock*.

5.3.1.1. Preparação das soluções padrão de trabalho

Para a otimização dos parâmetros de espectrometria de massa e das condições cromatográficas foram preparadas, em metanol: água (CH₃OH:H₂O, 70:30 v/v) e 0,1 % de ácido fórmico (CH₂O₂), dois tipos de soluções padrão de trabalho de 500 µg/L, nomeadamente soluções padrão individualizadas de MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR e uma solução padrão com a mistura destas três variantes de microcistinas em estudo. Esta solução é aqui designada por MCT-MIX.

Às duas soluções padrão de trabalho foram adicionadas ácido fórmico, de forma a haver promoção da formação de iões na fonte de ionização, pelo que este atua como agente ionizante. Para evitar a degradação fotoquímica as soluções foram preparadas em *vials* âmbar, que posteriormente foram armazenados a -20°C.

5.3.1.2. Otimização dos parâmetros de MS e MS/MS

Os parâmetros de aquisição MS foram otimizados por injeção direta da solução padrão de trabalho MCT-MIX de 500 µg/L. A injeção direta deste padrão no espectrómetro de massa foi efetuada com recurso a uma bomba de seringa e pretendeu-se avaliar, especificamente, quais os picos correspondentes a cada uma das variantes de microcistinas presentes na mistura. Pretendeu-se também escolher o melhor modo de ionização, modo positivo ou negativo. A figura 5.2 mostra os espetros de MS obtidos em modo de varrimento total (*full scan*) entre 50 *m/z* e 2000 *m/z*, quando a ionização das moléculas de MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR resulta na remoção de um protão [M-H]⁻, modo negativo ou quando resulta na adição de um protão [M+H]⁺, modo positivo.

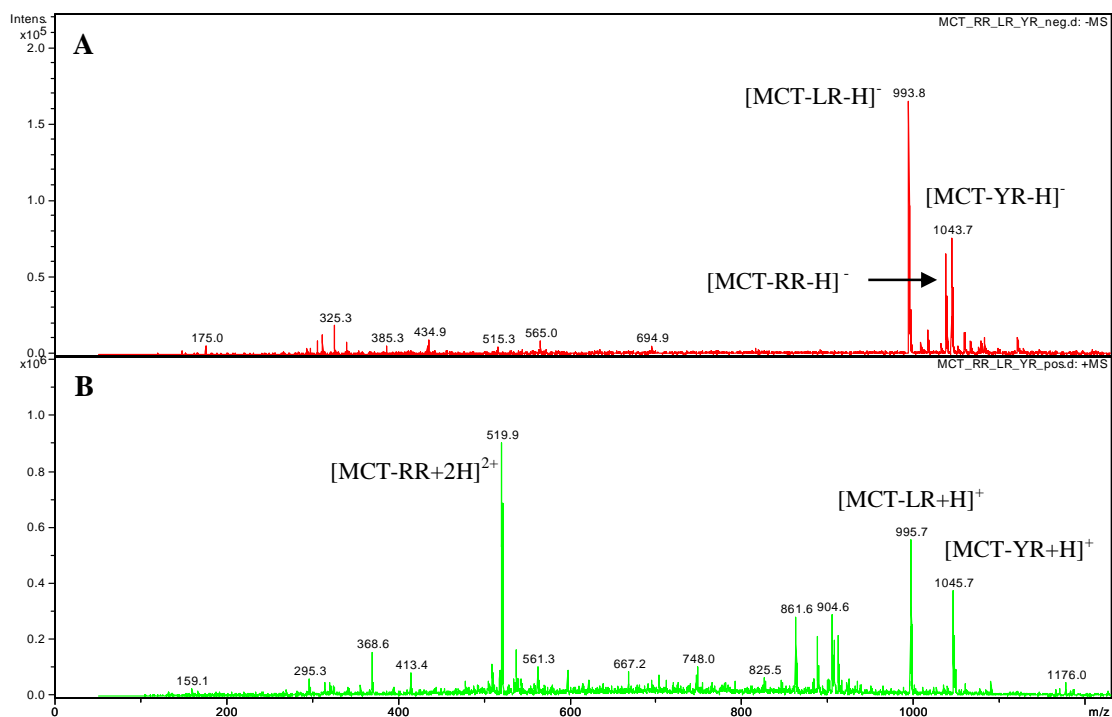


Figura 5.2 – Espectros de MS em *full scan* da solução padrão de trabalho de MCT-MIX de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B).

Observando a figura acima, é possível verificar que em modo negativo os espectros em *full scan* obtidos mostram exclusivamente a presença de iões moleculares desprotonados $[M-H]^-$, claramente evidenciados por três picos maioritários de razão m/z aproximada a 994 ($[M-H]^- = 994 m/z$), a 1038 ($[M-H]^- = 1038 m/z$) e 1044 ($[M-H]^- = 1044 m/z$). A deteção destes três picos corresponde à deteção de MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR, respetivamente. Estes picos foram identificados como tal com recurso aos valores de massa molecular de cada uma das variantes das microcistinas, expressos em termos de unidade de massa atómica, 995, 1038 e 1044 u.m.a, respetivamente, e com recurso aos espectros de MS já reportados na literatura (Yuan, M., *et al*, 1999; Spoof, L., *et al*, 2003; Li, C., *et al*, 2006). Em modo positivo é possível verificar que é revelada exclusivamente a presença de iões moleculares protonados $[M+H]^+$ para as variantes LR e YR de microcistinas. Estas variantes são claramente evidenciadas pelos respetivos picos maioritários de razão m/z aproximada a 996 ($[M+H]^+ = 996 m/z$) e a 1046 ($[M+H]^+ = 1046 m/z$). É presenciado também um pico maioritário de razão m/z aproximada a 520, cuja razão m/z é aproximadamente metade do valor da massa atómica de MCT-RR. A presença de dois resíduos carregados de arginina nas cadeias laterais da molécula de microcistina resultam na retenção de prótons externos, de tal

forma que esta apresenta-se, então, como duplamente carregada $[M+2H]^{2+}$ (Mekebri A. *et al*, 2009).

É possível verificar também que o modo de ionização positivo traduz-se num sinal mais intenso que o modo negativo, contudo, o espectro de MS obtido em modo negativo apresenta um pico bastante definido, pelo que parece não ser sensível a eventuais impurezas. De acordo com, Yuan, M., *et al* (1999), o processo de ionização de microcistinas por ionização *electrospray* é um processo complexo pelo facto destas cianotoxinas terem uma estrutura cíclica. A complexidade deste processo parece ser também influenciada pelo estado de carga dos iões formados ser afetado por vários parâmetros e por processos de equilíbrio das soluções.

De modo a avaliar se o sinal de deteção das três variantes em estudo não foi sobrevalorizado pela deteção de contaminantes eventualmente presentes no solvente em que se preparam as soluções padrão de trabalho, efetuou-se uma injeção direta de uma mistura $CH_3OH:H_2O$ (70:30, v/v). A figura 5.3 mostra os espectros de MS obtidos em modo de varrimento total (*full scan*) em modo negativo e em modo positivo.

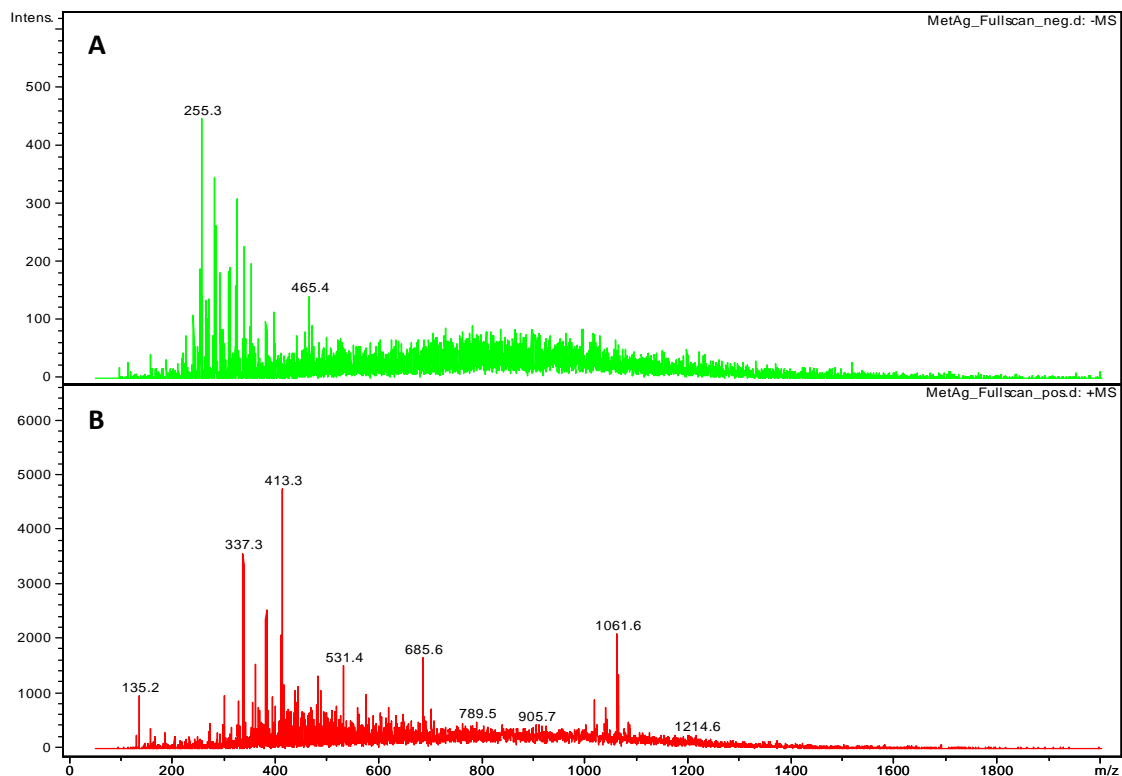


Figura 5.3 – Espectros de MS em *full scan* da mistura $CH_3OH:H_2O$ (70:30, v/v) obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B).

Averiguando a figura acima é possível verificar que não foi detetado nenhum pico de razão massa/carga coincidente como picos de cada uma das variantes de microcistinas em estudo. Assim, a preparação das soluções padrão numa mistura CH₃OH:H₂O (70:30, v/v) parece não sobrevalorizar o sinal de deteção destas variantes de microcistina. Observando a figura é possível verificar também que a ionização em modo positivo parece revelar eventuais impurezas presentes na mistura CH₃OH:H₂O (70:30, v/v), uma vez que o espectro de MS apresentado mostra ser mais complexo do que o obtido em modo negativo.

Uma vez otimizados os parâmetros de MS e de se constatar que o solvente não influencia os picos das microcistinas em estudo, procedeu-se à otimização dos parâmetros de MS/MS através de estudos de fragmentação. Para tal, efetuaram-se injeções diretas de cada uma das soluções de padrão de trabalho individualizadas. Nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6 observa-se, respetivamente, os espectros de MS/MS obtidos quer em modo de ionização negativo quer em positivo.

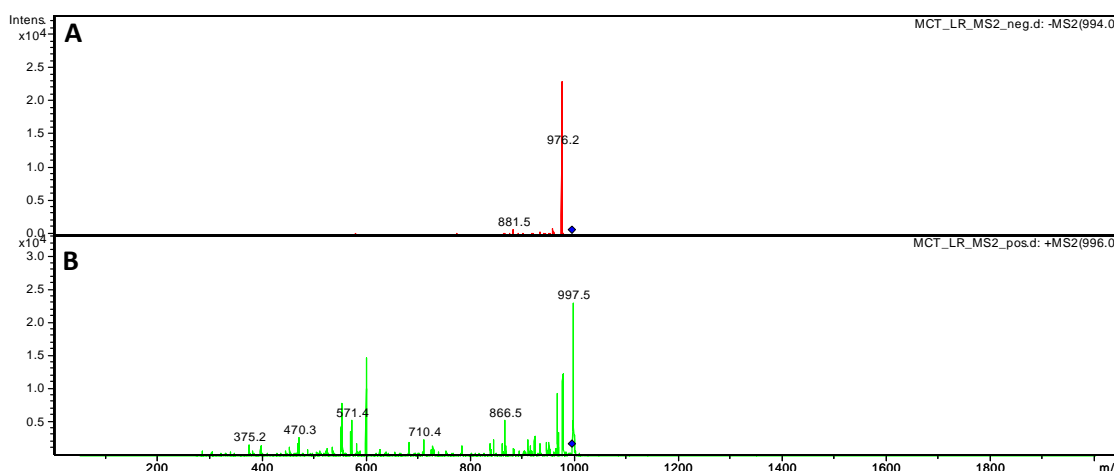


Figura 5.4 – Espectros de MS/MS da solução padrão de trabalho de MCT-LR de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B).

Observando a figura 5.4 é possível verificar que em modo negativo ao selecionarmos o ião correspondente à variante LR, 994 ± 2 m/z, para fragmentar, o ião produto formado tem aproximadamente 976 ± 2 m/z. Em modo positivo é possível verificar que fragmentação do ião de 996 ± 2 m/z dá origem a um espectro de fragmentação com um conjunto complexo de picos de massa/carga. Em termos de

complexidade, o espectro de MS/MS de MCT-LR, em modo negativo, mostra-se menos complexo do que em modo positivo.

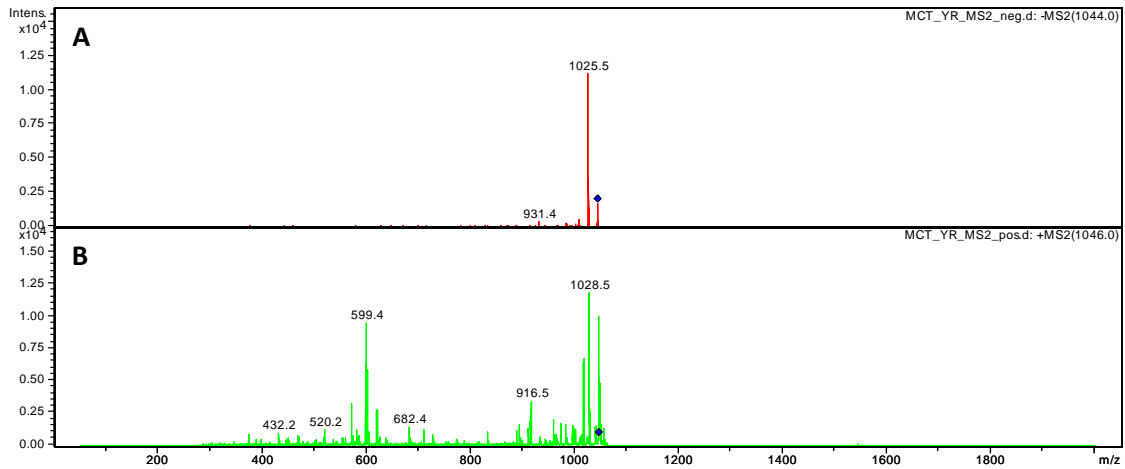


Figura 5.5 – Espectros de MS/MS da solução padrão de trabalho de MCT-YR de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B).

Analisando a figura 5.5 é possível verificar que à semelhança do espectro de MS/MS obtido em modo negativo para MCT-LR, o espectro de MCT-YR obtido neste modo de ionização mostra um espectro menos complexo do que o obtido em modo positivo. É possível verificar também que da fragmentação do ião de 1044 ± 2 m/z, correspondente à variante YR, resultou a formação de um pico maioritário e bem definido correspondente ao ião produto formado de 1026 m/z. Em modo positivo, verifica-se que o pico correspondente ao ião produto formado de 1028 ± 2 m/z não está claramente definido.

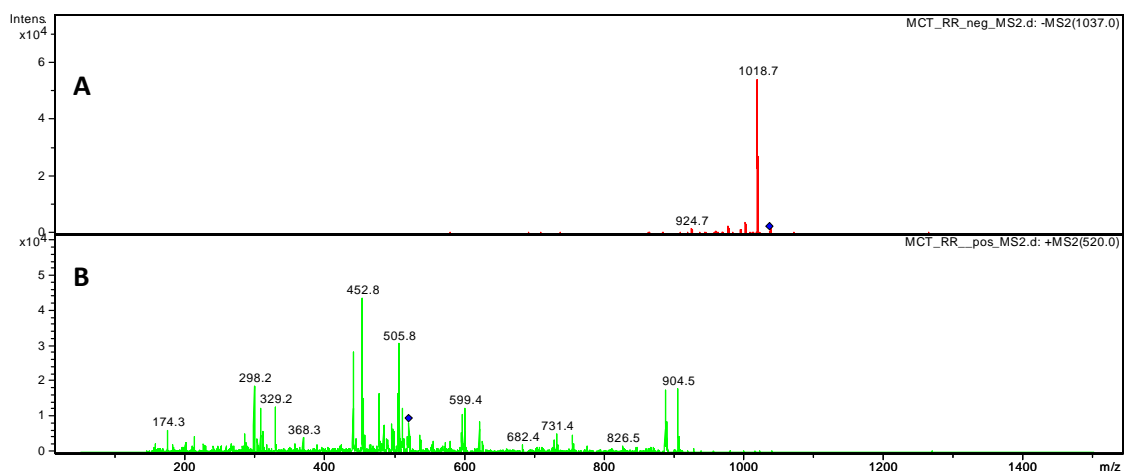


Figura 5.6 – Espectros de MS/MS da solução padrão de trabalho de MCT-RR de 500 µg/L obtidos por ionização ESI em modo negativo (A) e em modo positivo (B).

Observando a figura 5.6 é possível verificar que em modo negativo ao selecionarmos o íon correspondente à variante RR, $1038 \pm 2 m/z$, para fragmentar, o íon produto formado tem aproximadamente $1019 \pm 2 m/z$. É possível verificar também que em modo positivo de ionização o espectro de MS/MS de MCT-RR se revela muito complexo.

Analisando mais ao pormenor os três espectros de MS/MS acima representados é possível verificar que razão massa/carga de cada um dos íões precursoros e a de cada um dos íões produto formados, diferem 18 u.m.a. Esta diferença pode significar que da fragmentação dos íões precursoros ocorreu a libertação de 18 u.m.a, que possivelmente poderão corresponder a uma molécula de água.

Uma vez obtidos os espectros de MS/MS com boa intensidade e definição, estão então otimizados os parâmetros de MS/MS para cada uma das três variantes de microcistina em estudo. Na tabela 5.1 estão definidos todos os parâmetros otimizados de MS/MS estabelecidos por injeção direta de soluções padrão de trabalho de MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR.

Tendo em conta os espectros de MS e MS/MS obtidos para cada uma das três variantes de microcistinas em estudo, assim como os espectros de MS do solvente, optou-se, então, por escolher o modo negativo como modo de ionização para a análise das microcistinas por LC-ESI-MS/MS.

Tabela 5.1 – Parâmetros de MS/MS otimizados para a análise das variantes LR, RR e YR de microcistinas por LC-ESI-MS/MS.

Parâmetros da Fonte de ionização		Parâmetros do Analisador			
ESI		<i>Ion Trap</i>			
		Variantes	MCT-LR	MCT-RR	MCT-YR
Modo de ionização	Negativo	<i>Skimmer</i>	- 40,0 V	- 40,0 V	- 40,0 V
Gás de nebulização	Azoto	Capilar de saída	- 117,8 V	- 117,8 V	- 117,8 V
Pressão do nebulizador	10 psi	Octopolo 1 DC	- 12,0 V	- 12,0 V	- 12,0 V
Gás de secagem	Azoto	Octopolo 2 DC	- 1,70 V	- 1,70 V	- 1,70 V
Fluxo do gás de secagem	5,0 L/min	Octopolo RF	- 117,6 Vpp	- 117,6 Vpp	- 117,6 Vpp
Temperatura do gás de secagem	300 °C	Capilar de alta voltagem	4000 V	4000 V	4000 V
Intervalo de Scan	50 a 2000 <i>m/z</i>	Lentes 1	- 5,0 V	- 5,0 V	- 5,0 V
Tempo máximo de acumulação	200 ms	Lentes 2	- 60,0 V	- 60,0 V	- 60,0 V
Outros parâmetros de aquisição					
Variantes		MCT-LR	MCT-RR	MCT-YR	
Intervalo de massa		2 <i>m/z</i>	2 <i>m/z</i>	2 <i>m/z</i>	
Ião precursor		994 <i>m/z</i>	1037 <i>m/z</i>	1044 <i>m/z</i>	
Ião produto		976 <i>m/z</i>	1019 <i>m/z</i>	1026 <i>m/z</i>	
Amplitude de fragmentação		0.42	0.35	0.32	
Gás de colisão		Hélio	Hélio	Hélio	

5.3.1.3. Otimização das condições cromatográficas

Uma vez otimizados os parâmetros de MS e MS/MS, procedeu-se à otimização das condições cromatográficas de modo a que fosse possível efetuar a análise das microcistinas por LC-ESI-MS/MS. Dado que as microcistinas têm massa molecular inferior a 2000, e que são solúveis em solventes orgânicos polares, escolheu-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa, coluna *Grace smart RP-18*, 3 μm 150 mm x 2,1 mm. Selecionou-se para constituição da fase móvel dois solventes, nomeadamente, água Milli-Q (A) e acetonitrilo (B), ambos com 0,1% de CH_2O_2 .

Usando a solução padrão de MCT-MIX de 500 $\mu\text{g/L}$ procedeu-se à otimização do gradiente de eluição, por HPLC, ajustando o fluxo, as percentagens dos solventes selecionados para a composição da fase móvel e a duração do gradiente. Definiu-se um tempo total de corrida de 26 min, para garantir a estabilização da composição do sistema eluente na coluna cromatográfica. Na tabela 5.2 está representado o gradiente de eluição eleito para uma separação eficiente das três microcistinas em estudo, usando um fluxo de 0,25 mL/min a 30°C e um volume de injeção de amostra de 10 μL .

É importante referir que antes de proceder à otimização das condições cromatográficas os solventes foram sujeitos a sonicação a fim de eliminar gás dissolvido. Este procedimento de eliminação foi também complementado pelo degaseificador do sistema de HPLC. Foi necessário também definir um método de limpeza do equipamento.

Tabela 5.2 - Gradiente de eluição ajustado para a análise de uma mistura de três microcistinas, nomeadamente MCT-LR, YR e RR.

Tempo (min)	Solventes de eluição (%)	
	H ₂ O Milli-Q + 0,1% CH ₂ O ₂ (A)	CH ₂ CN +0,1% CH ₂ O ₂ (B)
0	70	30
2	70	30
11	15	85
14	15	85
16	70	30
25	70	30

5.3.1.4. Otimização do método de LC-ESI-MS/MS

Utilizando os parâmetros de MS e de MS/MS e as condições cromatográficas anteriormente otimizadas, procedeu-se ao ajuste de alguns parâmetros de espectrometria de massa, nomeadamente, da fonte de ionização de forma a otimizar o método de LC-ESI-MS/MS para a análise de uma mistura das três microcistinas. Este ajuste consistiu no ajuste da pressão de nebulização do azoto para 45 psi, do fluxo de gás de secagem para 8 L/min e da temperatura de secagem para 350°C, sendo estes ajustes efectuados tendo em atenção o fluxo do eluente cromatográfico otimizado. Uma vez ajustados procedeu-se à análise da solução padrão de MCT-MIX de 500 µg/L por LC-ESI-MS/MS, de modo a verificar a ordem de eluição das três toxinas em estudo e os respectivos tempos de retenção. A figura 5.7 ilustra o cromatograma obtido para esta solução padrão de trabalho em modo *full scan* e os espectros de MS/MS aplicado às condições cromatográficas e de espectrometria de massa anteriormente descritas.

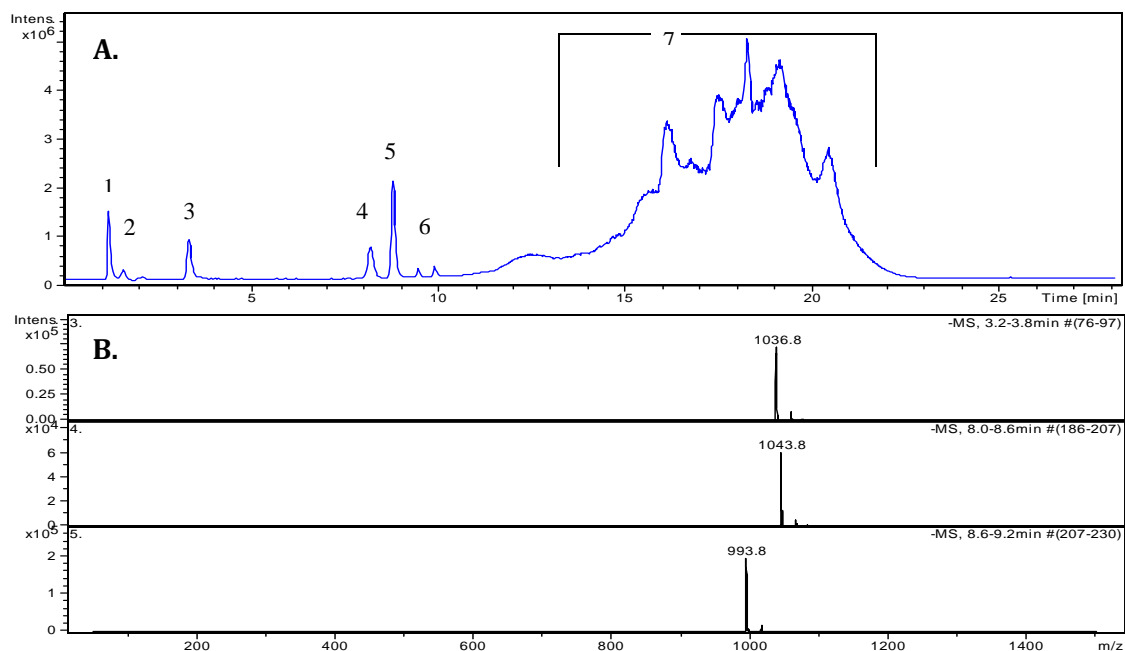


Figura 5.7 – Cromatograma (A) e espetros de MS (B) obtidos por injeção *on-line* no sistema de HPLC de 10 µL de solução padrão de trabalho de MCT-MIX de 500 µg/L em modo de ionização ESI negativo. Os picos cromatográficos assinalados representam 1. Saída do eluente, 2. Saída de impurezas, 3. Eluição de MCT-RR, 4. Eluição de MCT-YR, 5. Eluição de MCT-RR, 6. Saída de impurezas e 7. Saída dos solventes e contaminantes eventualmente presentes na coluna cromatográfica.

Analisando a figura 5.7 é possível verificar a ordem de eluição de cada uma das três microcistinas em estudo, presentes em 10 µL de solução padrão de trabalho de MCT-MIX de 500 µg/L. A ordem de eluição das variantes LR, YR e RR foi determinada através dos espetros de MS de cada uma das variantes. A primeira variante de microcistina a sair da coluna cromatográfica foi a variante RR, depois a variante YR e por fim a variante LR, pelo que os tempos de retenção de cada variante foram 3.4 min, 8.2 min e 8.8 min, respetivamente. Isto significa que em termos de interação entre fase móvel e fase estacionária, a variante RR interagiu de forma mais fraca que as variantes YR e LR, sendo a variante LR a variante com maior afinidade para a fase estacionária. Tendo em conta os tempos de eluição destas três variantes de microcistinas, é possível verificar que as microcistinas não ficam muito tempo retidas na coluna cromatográfica, sendo eluídas em menos de metade do tempo de análise. Este facto, associado ao aquecimento da coluna cromatográfica a 30°C, traduz-se na formação de bandas cromatográficas estreitas e bem resolvidas. Observando o cromatograma obtido é possível verificar também que os componentes não retidos na coluna cromatográfica levam 1.2 minutos até serem detetados, como mostra o pico cromatográfico assinalado na figura 5.7 A. como número 1. Verifica-se também a presença de picos cromatográficos referentes à deteção de impurezas, como o caso dos picos 2 e 6. O conjunto de picos sobrepostos representados na figura como número 7, surgem em virtude do gradiente de eluição e impurezas que eventualmente ficaram no sistema de HPLC e coluna cromatográfica. A eluição destes componentes é essencial para que em análises futuras não ocorra co-eluição dos picos cromatográficos das microcistinas com eventuais impurezas.

Uma vez averiguada a ordem de eluição e os tempos de eluição de cada uma das variantes de microcistinas em estudo, procedeu-se à análise da solução padrão de MCT-MIX de 500 µg/L, por LC-ESI-MS/MS, de modo a obter cromatogramas e espetros de MS/MS mais bem definidos. A figura 5.8 ilustra o cromatograma obtido para esta solução padrão de trabalho em modo MRM e os espetros de MS/MS aplicado às condições cromatográficas e de espetrometria de massa anteriormente descritas.

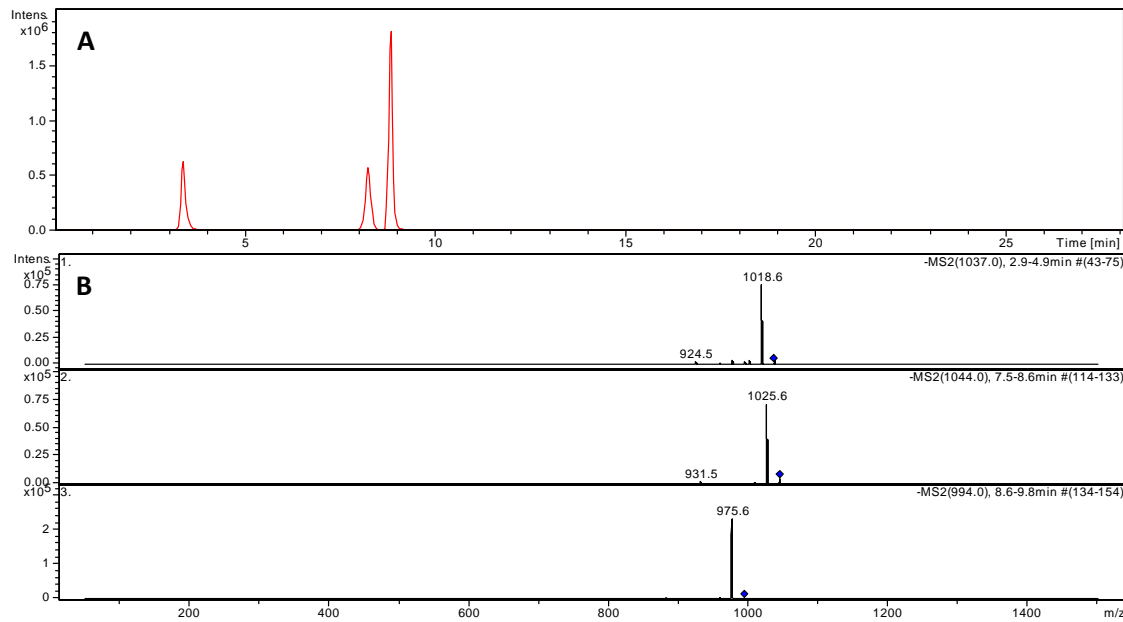


Figura 5.8 – Cromatograma modo de detecção MRM (A) e espectro de MS/MS (B) obtidos por injeção *on-line* no sistema de HPLC de 10 μ L de solução padrão de trabalho de MCT-MIX de 500 μ g/L, com modo de ionização ESI negativo.

Observando a figura 5.8 é possível verificar que ao selecionar o modo de detecção MRM, o cromatograma que se obtém é mais simples e mais específico, pelo que só são detetados os iões precursores e produtos que foram selecionados. A seleção desses iões, surgiu em virtude da introdução de dois segmentos de tempo, em que em cada segmento foram só analisados os iões precursores selecionados e dos respetivos iões de fragmentação. O primeiro segmento definido, foi entre 0 e 6 min e o segundo entre os 6 e 20 minutos. Durante os primeiros 6 minutos da análise, foram só selecionados e fragmentados os iões com razão massa/carga aproximada de 1037 ± 2 m/z relativos à variante RR. Os iões com razão massa/carga aproximada de 1044 ± 2 m/z e de 1026 ± 2 m/z foram selecionados e fragmentados no segundo segmento de tempo e dizem respeito às variantes YR e LR, respetivamente.

Uma vez obtidos cromatogramas e espectros de MS/MS com boa definição, por escolha do modo MRM estão, então, otimizados todos parâmetros quer de cromatografia quer de espectrometria de massa para a análise das variantes RR, YR e LR de microcistina por LC-ESI-MS/MS.

5.3.2. Seleção e otimização do método de extração

Uma vez ajustados todos os parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massa, procedeu-se à seleção do método de extração das microcistinas. Os métodos **Lawton, L. et al (1994)**, **Mekebri, A. et al (2009)** e **Ferranti, P. et al (2009)** foram testados de forma a selecionar o método mais eficiente na extração de microcistinas de culturas de *M.aeruginosa*. Estes métodos de extração foram testados através de ensaios de recuperação, em que amostras de água Milli-Q fortificadas (*spiked*) com uma quantidade de MCT conhecida foram sujeitas a um processo de SPE em cartuchos Varian Bond Elut C18, 500 mg de 3 mL. Após este processo as amostras foram analisadas por LC-ESI-MS/MS e a quantidade de toxina recuperada foi determinada e comparada com a quantidade de MCT-LR inicialmente presente na amostra de forma a calcular a percentagem de recuperação.

Nas figuras 5.9, 5.10 e 5.11 estão descritos todos os passos seguidos em cada um dos métodos testados. Todos eles têm em comum passos de fortificação (*spiking*) da amostra, de extração em fase sólida, de lavagem, de eluição, evaporação e de ressolubilização. Com exceção do método de **Mekebri, A. et al (2009)** que não utiliza os passos de evaporação e ressolubilização. Estes métodos variam entre eles na preparação da amostra antes da fortificação, nos solventes utilizados no condicionamento e ativação do cartucho de SPE, assim como nos solventes utilizados na eluição e resuspensão das microcistinas, quando existente.

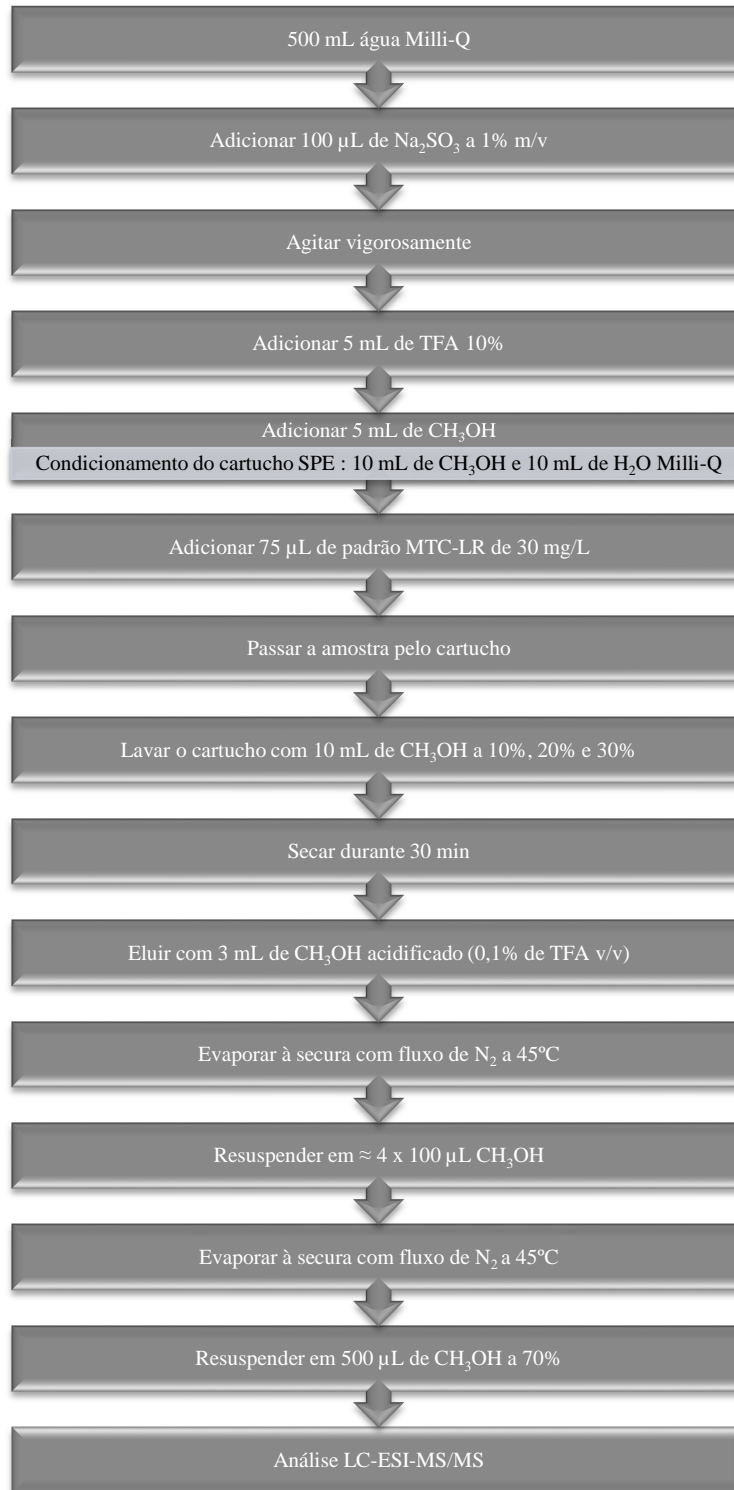


Figura 5.9 – Esquematização do procedimento de extração de microcistinas LR a partir de amostras de águas efetuado de acordo com o método **Lawton, L. et al, 1994**.

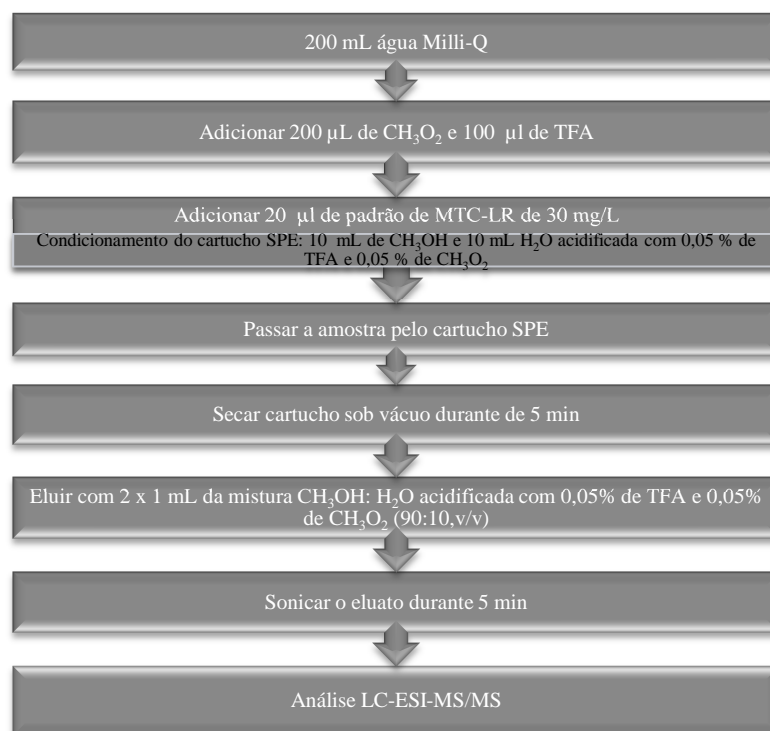


Figura 5.10 – Esquematização do procedimento de extração de microcistinas LR a partir de amostras de águas efetuado de acordo com o método **Mekebri, A. et al, 2009**.

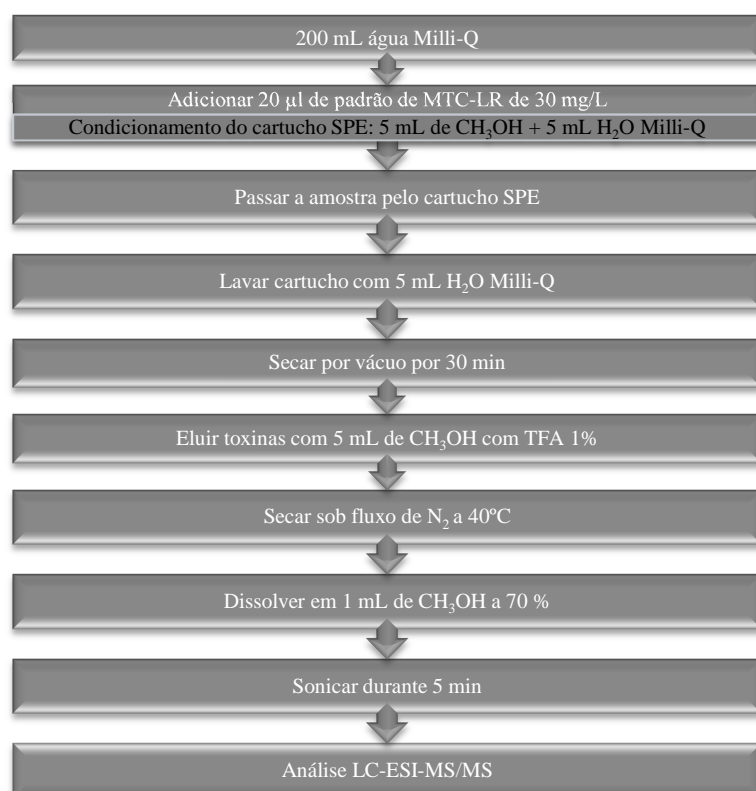


Figura 5.11 – Esquematização do procedimento de extração de microcistinas LR a partir de amostras de águas efetuado de acordo com o método **Ferranti, P. et al, 2009**.

Uma vez analisadas todas as amostras por cada um dos métodos, as percentagens de recuperação de MCT-LR foram calculadas com base na área dos picos cromatográficos obtidos na análise da amostra fortificada e da solução padrão de trabalho corrida na mesma análise, de acordo com a equação 5.1. Na tabela 5.3 estão as percentagens de recuperação obtidas para cada um dos métodos de extração de microcistinas em estudo.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do pico do analito na amostra}}{\text{Área do pico do analito no padrão}} \times 100\% \quad (5.1)$$

Tabela 5.3 – Percentagens de recuperação (%) obtidas em função do método de extração de MCT-LR testado.

Método de extração testado	Concentração do padrão de MCT-LR	Percentagem de recuperação (%) ± Erro padrão (n = 3)
Lawton, L. <i>et al</i> , 1994	500 µg/L	19,5 ± 8,4
Mekebri, A. <i>et al</i> , 2009	300 µg/L	9,5 ± 6,3
Ferranti, P. <i>et al</i> , 2009	600 µg/L	59,4 ± 5,0

Observando as percentagens de recuperação de MCT-LR reveladas na tabela 5.3 é possível verificar que de forma geral as percentagens obtidas são muito baixas, em comparação com as percentagens de recuperação obtidas pelos autores do método. As percentagens de recuperação obtidas por Lawton, L. *et al*, 1994 e Ferranti, P. *et al*, 2009 para dois níveis de *spiking* de MCT-LR variam entre 90 e 75% e entre 72,6 e e 96,5%, respetivamente. Com um nível de *spiking* inferior, **Mekebri, A. *et al* (2009)** obtiveram percentagens de recuperação superiores a 100%.

A diferença entre estes valores e os resultados aqui obtidos podem ser devidos à utilização de diferentes cartuchos de extração em fase sólida, embora o cartucho utilizado tenha sido também um de fase reversa. Outros fatores poderão ser apresentados para este facto, nomeadamente um mau condicionamento e uma ativação ineficiente do cartucho de forma a que a sua matriz não tenha ficado bem preparada

para receber a amostra e reter as microcistinas. Durante os passos de evaporação e subsequente solubilização também podem ter ocorrido perdas de toxina que depois se refletiram nestes valores baixos.

Por ter apresentado, nos estudos preliminares realizados, o maior valor de eficiência de extração para MCT-LR, o método de Ferranti, P. *et al*, 2009 foi o método escolhido e aplicado à extração das outras variantes de microcistinas em estudo. De forma a tornar este método de extração ainda mais eficiente, foram efetuados estudos de extração de microcistinas com recurso a outros cartuchos de extração em fase sólida, com fases estacionárias diferentes. Para tal, foi estudado a eficiência de extração dos seguintes cartuchos de SPE: Varian Bond Elut Env, 200 mg 3 mL; Chromabond C18 ec, 200 mg 3 mL; Chromabond C8 , 200 mg 3 mL e Chromabond Easy, 200 mg 3 mL. Na tabela 5.4 estão representadas as percentagens de recuperação obtidas para cada um dos cartuchos de SPE testados.

Tabela 5.4 - Percentagens de recuperação (%) obtidas em função da fase estacionária cartuchos de SPE testados.

Concentração do padrão de MCT-MIX	Cartucho de SPE	Percentagem de recuperação (%) ± Erro padrão (n=3)		
		MCT-RR	MCT-YR	MCT-LR
		500 µg/L	Chromabond C18 ec, 200 mg 3 mL	26,2 ± 5,2
500 µg/L	Chromabond C8, 200 mg 3 mL	54,6 ± 15,3	54,4 ± 17,2	57,1 ± 14,9
500 µg/L	Chromabond Easy, 200 mg 3 mL	48,9 ± 1,1	43,6 ± 3,1	47,5 ± 2,0
500 µg/L	Varian Bond Elut Env, 200 mg 3 mL	64,2 ± 4,5	66,6 ± 4,5	82,7 ± 1,6

Todos os cartuchos de extração em fase sólida utilizados são cartuchos de fase reversa com composições químicas diferentes. Os cartuchos de SPE Chromabond C18 ec, são constituídos por uma matriz de sílica modificada por grupos octadecil (C18), de forma a reter compostos apolares. Os cartuchos Chromabond C8 são muito semelhantes aos C18, pelo que são também constituídos por uma matriz de sílica

modificada, no entanto a modificação ocorreu por adição de grupos octil (C8), proporcionando a retenção de compostos moderadamente polares. As matrizes dos cartuchos Chromabond Easy e Varian Bond Elut Env são constituídas por polímeros de elevada pureza, mais precisamente por poliestireno divinilbenzeno. Observando os valores de percentagens de recuperação obtidos para cada um dos cartuchos em estudo é possível verificar que os cartuchos Varian Bond Elut Env, com partículas esféricas de 125 µm de diâmetro ligadas entre si, mostram ser os mais eficientes na extração das três variantes em estudo, pelo que revelaram percentagens de recuperação entre $64,2 \pm 4,5$ e $82,7 \pm 1,6$ sendo estas, então, consideradas como aceitáveis.

5.3.3. Estabelecimento do método de extração

De forma a monitorizar a produção e a libertação de microcistinas em culturas de *M. aeruginosa*, antes e depois da infeção com cianófagos, foi estabelecido o método de extração, que a seguir se descreve, tendo em atenção os vários testes de otimização anteriormente realizados.

Na extração em fase sólida o condicionamento do cartucho Varian Bond Elut Env, foi efetuado com a passagem de metanol sob força da gravidade, para que a matriz ficasse bem preparada para receber o solvente de ativação, a água. A passagem da água pelo cartucho de extração foi realizada por vácuo usando um sistema de extração vácuo *manifold*. Se a matriz do cartucho estiver bem preparada irá reter uma maior quantidade de microcistinas, pelo que esta deverá sempre ser bem condicionada. O fluxo da amostra a passar pelos cartuchos de SPE foi contínuo e controlado, não excedendo os 5 mL/min. Após a lavagem dos cartuchos, estes foram bem secos durante 30 min. O processo de secagem foi efetuado por ação da bomba de vácuo. A eluição das microcistinas com metanol acidificado com 0,1% de TFA, foi efetuada pela ação da gravidade, para que o eluente arrastasse todas as microcistinas aderidas à matriz do cartucho. O eluato obtido foi sujeito a evaporação por um fluxo de azoto. A evaporação foi efetuada a uma temperatura aproximada de 40°C, de modo a que a evaporação do solvente de eluição decorresse de forma estabilizada. O resíduo seco obtido foi solubilizado em metanol aquoso (70%) tendo o cuidado de passar muito bem as paredes do tubo de recolha do solvente. Após a adição do solvente, as amostras foram sonicadas de forma a garantir a total solubilização das microcistinas. Por fim, os extratos obtidos foram transferidos cuidadosamente para *vials* escuros (âmbar), para evitar a degradação

fotoquímica das amostras. O manuseamento das amostras e dos padrões foi executado com precaução, uma vez que as microcistinas são substâncias hepatotóxicas. Neste sentido, a transferência das microcistinas para os *vials*, assim como a preparação das soluções padrão de trabalho analisadas em simultâneo com as amostras, foram efetuadas na *hotte*, estando o analista devidamente protegido com bata e luvas. Os extratos obtidos e as soluções padrão de trabalho foram armazenados a -20°C até ao dia da análise por LC-ESI-MS/MS para evitar sua degradação. A análise foi efetuada no próprio dia da extração. Quando tal não foi possível as amostras foram reservadas a -20°C , para que não ocorresse degradação da amostra. Antes da análise, foi adicionado ácido fórmico às amostras e aos padrões de trabalho para promover a formação de iões na fonte de ionização, facilitando a deteção em modo MS e MS/MS. Pelo mesmo motivo, a água e o acetonitrilo utilizados como eluentes no processo de separação cromatográfica continham também ácido fórmico. Uma vez acidificados, os solventes foram primeiramente submetidos a sonicação, de forma a eliminar eventuais bolhas de gás e só depois foram utilizados. Antes da análise das amostras o sistema de HPLC foi limpo através da passagem de solventes de limpeza (metanol: água 70:30, v/v). A passagem de metanol e de água Milli-Q pelo sistema permitiu remover todos os solventes e impurezas que eventualmente tivessem ficado retidos no sistema.

As microcistinas em estudo, eventualmente produzidas pelas estirpes PCC 7820 e 7005, foram analisadas por LC-ESI-MS/MS, num tempo total de 26 min, sendo todas as variantes eluídas nos primeiros 10 min. A ordem de eluição esperada será, então, RR, YR e por fim LR. Os espetros de massa destas variantes serão obtidos em modo de ionização negativo. São esperados, nos espetros de MS/MS, picos maioritários de razão massa/carga 1019 m/z , 1026 m/z ou de 976 m/z resultantes da deteção dos iões produto da fragmentação dos iões precursores de RR, YR ou de LR, respetivamente. A quantidade de microcistinas detetadas nas amostras será determinada através da relação entre a área dos picos cromatográficos da amostra e entre a área do padrão respetivo analisado paralelamente.

Estas foram as condições estabelecidas para a monitorização, por LC-MS/MS, da produção e da libertação de microcistinas em culturas de *M. aeruginosa*, antes e depois da infeção com cianófitos.

Capítulo VI

Estudo de fatores biológicos eventualmente condicionantes da produção de microcistinas em cultura

6.1. Introdução

Como foi referido, ao longo dos últimos anos têm sido efetuados vários trabalhos experimentais de forma a estudar a influência de fatores ambientais, incluindo fatores biológicos, no crescimento de cianobactérias assim como na produção e libertação das suas toxinas em culturas de laboratório. Os vírus, no ambiente parecem atuar como agentes de controlo biológico, podendo assumir um papel importante na redução da densidade populacional destas populações fitoplanctónicas (Suttle, C., 2000).

No presente capítulo apresentam-se os resultados de experiências de monitorização da produção e libertação de microcistinas ao longo do crescimento de culturas de *M. aeruginosa* antes e depois da infeção por cianófagos.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Culturas de cianobactérias e cianófagos

Ao longo deste trabalho experimental utilizaram-se duas culturas de cianobactérias adquiridas anteriormente à coleção de culturas de cianobactérias do Instituto Pasteur (Paris), nomeadamente *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005. *M. aeruginosa* PCC 7820 foi isolada por R. Stewart, em 1975, no Lago de Balgavies, Escócia e foi caracterizada como sendo uma estirpe de cianobactérias produtora de toxinas, nomeadamente microcistinas. *M. aeruginosa* PCC 7005 foi isolada em 1946 do Lago Mendota, no estado de Wisconsin, USA, por W. Koch e é caracterizada como estirpe não produtora destas toxinas.

Como fator biológico, utilizaram-se cianófagos de *M. aeruginosa*. Estes cianófagos foram isolados do Lago Erie no estado de Michigan (USA) e foram designados por Ma-LEZ¹01 (Mesquita, S., *et al.*, 2009). O concentrado viral líquido utilizado ao longo do trabalho experimental foi obtido de acordo com o método desenvolvido por Mesquita, S. (Tese de Doutorado em preparação).

6.2.2. Cultivo e manutenção das culturas

As culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 foram cultivadas em triplicados biológicos no meio de cultura BG11, descrito por Stanier, R. *et al.*, 1971 (Anexo1). Por questões que se prendem com a aceleração do crescimento de *M. aeruginosa* em situações de maior densidade celular (d.c.) foi necessário começar o cultivo em volumes pequenos, com progressivo aumento de escala por repicagem.

Numa fase inicial, inocularam-se 5 mL de cultura bruta em 95 mL de meio BG 11 estéril (1:20 v/v) em balões Erlenmeyer de vidro de 250 mL. As culturas foram mantidas num fitoclima com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e intensidade de radiação média de $15 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 16 horas por dia (Figura 6.1). Esta iluminação foi obtida mediante a utilização na proporção 1:1 de lâmpadas Cool White 36W/20 (OSRAM L) e Cool Daylight, Energy Sarver 36W 65 (OSRAM L).

Quando as culturas alcançaram a fase exponencial de crescimento (cerca de 30 dias depois de cultivadas) foram repicadas por diluição 1:20 (v/v) para balões Erlenmeyer de vidro de 1L e posteriormente para frascos de cultura de poliestireno com tampa ventilada (1L Orange Scientific). A repicagem das culturas para grandes volumes ocorreu na fase exponencial de modo a que não ocorresse limitação do seu crescimento, quer por *deficit* de nutrientes, quer por excesso de metabolitos secundários eventualmente concentrados nas culturas. As culturas, uma vez repicadas, foram mantidas nas condições de temperatura e de intensidade de radiação acima descritas.

¹ Z substitui a família atualmente ainda desconhecida

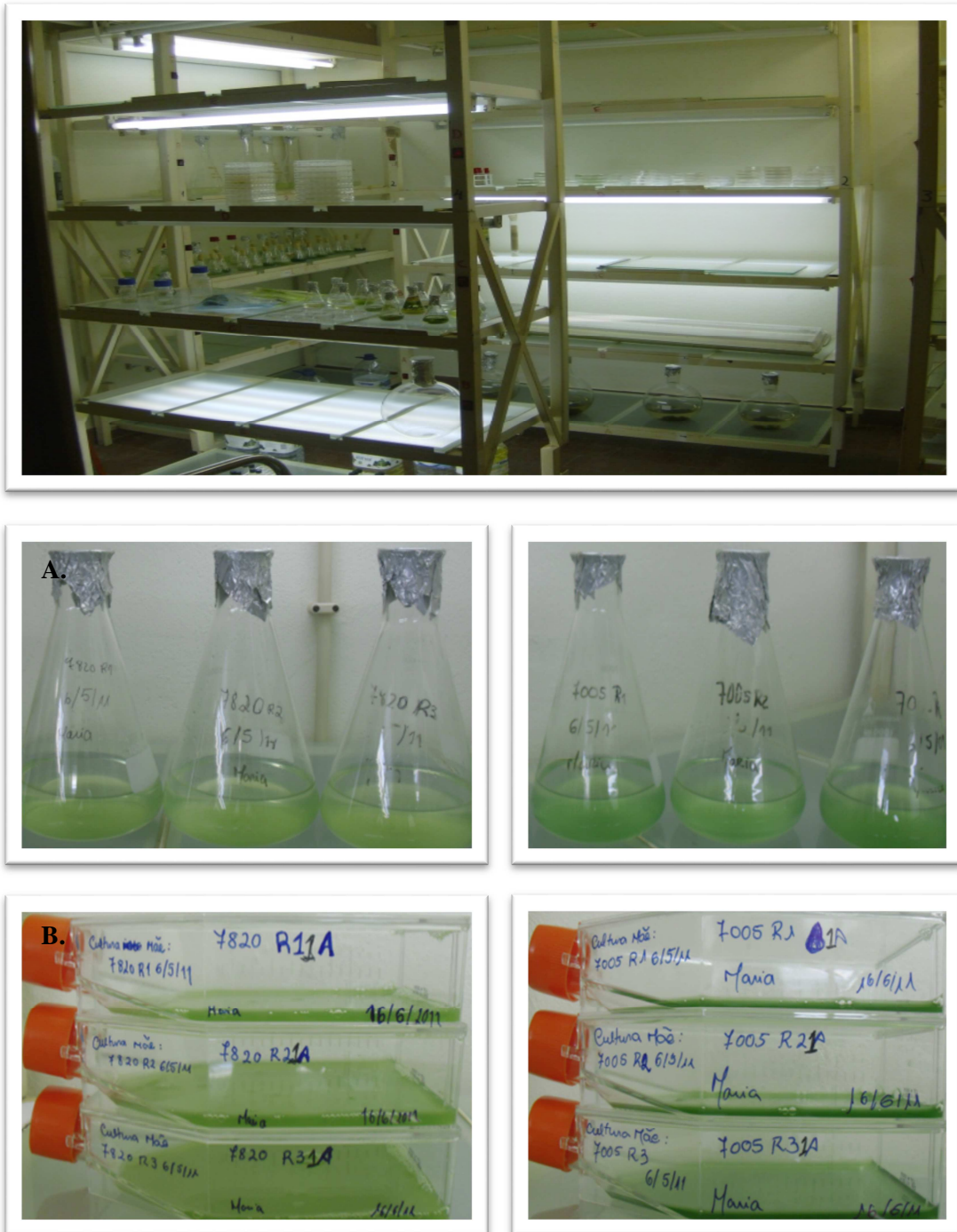


Figura 6.1 – Culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 em crescimento em balões Erlenmeyer de 1 L (A) e em frascos de cultura de poliestireno de 1L (B) no fitoclima.

6.2.3. Desenho experimental

6.2.3.1. Monitorização do crescimento e libertação de cianotoxinas em cultura

Estudou-se o espectro contínuo de absorção, entre 350 nm e 800 nm, obtido para amostras de cada um dos replicados das culturas das duas estirpes, utilizando um leitor espectralfotométrico de microplacas *Biotek Synergy 4 microplate reader* (Anexo 1). O crescimento das culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 foi acompanhado por leituras das densidades óticas a $\lambda = 680$ nm, $\lambda = 730$ nm e $\lambda = 750$ nm no espectralfotómetro JenWay Genova. Para tal, três dias por semana durante 70 dias, retirou-se, na câmara de fluxo laminar, uma amostra de 2 mL de cada um dos replicados das culturas em balões Erlenmeyer de vidro e procedeu-se à leitura da densidade ótica (d.o.).

Em simultâneo, o crescimento das culturas de *M. aeruginosa* foi também monitorizado por observação microscópica, mais precisamente através da contagem e medição de células, estimando-se como parâmetros do crescimento o nº de células por L e o biovolume total (mm³/L). Assim, um dia por semana durante os 70 dias em que decorreu a experiência retirou-se, na câmara de fluxo laminar, uma amostra de cada um dos replicados das culturas e fixou-se com gluteraldeído a 25% (para microscopia, Merck) refrigerado, para uma concentração final de 2% (v/v). As amostras uma vez fixadas, conservaram-se no frio até ao dia da visualização microscópica de modo a não haver degradação das células. As células de *M. aeruginosa* foram observadas, quantificadas e medidas em microscopia de epifluorescência (Microscópio Leitz DMLB, com oculares HC Plan 12.5x/16 (Leica), com objetiva de imersão Plan Apo 63x/1.32-0.6, câmara fotográfica digital Leica DC 300 FX, e *software* de aquisição de imagem Leica QWin versão 3.2.1) utilizando o fluorocromo proflavina monoclorada (Fluka) de acordo com o método de **HAAS, L., (1982)**. Para a visualização em microscopia de epifluorescência dos pigmentos clorofilinos intercalou-se um filtro verde (Leica LP590 N2.1) no feixe de radiação ultravioleta de modo a obter luz com um comprimento de onda entre 515 nm e 560 nm capaz de excitar a sua autofluorescência. A visualização de outros pigmentos fotossintéticos, em preparações coradas com fluorocromo proflavina, foi facilitada pela utilização de um filtro azul (Leica LP515 I3) de modo a obter luz com um comprimento de onda entre 450 nm e 490 nm.

Todos estes procedimentos de monitorização do crescimento das culturas encontram-se detalhadamente descritos no anexo 1.

A produção e libertação de cianotoxinas, nomeadamente microcistinas, foram acompanhadas por LC-ESI-MS/MS. Para tal, de 15 em 15 dias durante os 70 dias em que decorreu a experiência, retirou-se, na câmara de fluxo laminar, uma amostra de 30 mL de cada um dos replicados das culturas e conservou-se no congelador para posterior análise. Antes da análise por LC-ESI-MS/MS, as amostras de *M. aeruginosa* foram sujeitas a um conjunto de tratamentos de forma a extrair, limpar e concentrar as suas endotoxinas. O método de **Mekebri, A., et al (2009)** foi o método eleito para provocar a lise celular e subsequente libertação (extração) das microcistinas. Este método consistiu em expor as amostras a um ciclo de congelação-descongelação agitação e posteriormente a uma extração por centrifugação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído e reservado. O sedimento (*pellet*) foi sujeito a um ciclo de extração complementar que consistiu na adição de um solvente de extração (mistura de CH₃OH:H₂O acidificada com 0,1 % de CH₂O₂ e 0,05% de TFA 90:10, v/v), sonicação e centrifugação, de forma a garantir que todas as microcistinas de *M. aeruginosa* fossem devidamente libertadas. O *pellet* resultante desta última centrifugação foi descartado e o sobrenadante diluído e reservado. Depois da libertação de todas as microcistinas, os sobrenadantes foram sujeitos a um processo de extração em fase sólida, evaporação e ressolubilização, como se indica na figura 6.2. Este processo de purificação (*clean up*) e concentração foi baseado no método de **Ferranti, P., et al (2009)**, uma vez que este mostrou ser o método com maior fiabilidade em termos de percentagens de recuperação, como descrito no capítulo anterior. Uma vez decorridos os processos de tratamento e extração, as microcistinas foram então analisadas por LC-ESI-MS/MS e subsequentemente identificadas por comparação dos tempos de retenção e do espectro de MS/MS com os das soluções padrão de microcistinas. A quantificação das microcistinas detetadas foi efetuada pelo método de calibração externa usando uma solução padrão de referência com concentração conhecida de 50 µg/L ou de 500 µg/L (figura 6.2). Todo este procedimento encontra-se detalhadamente descrito no anexo 1.

Ensaio de um método de análise de microcistinas por LC-ESI-MS/MS

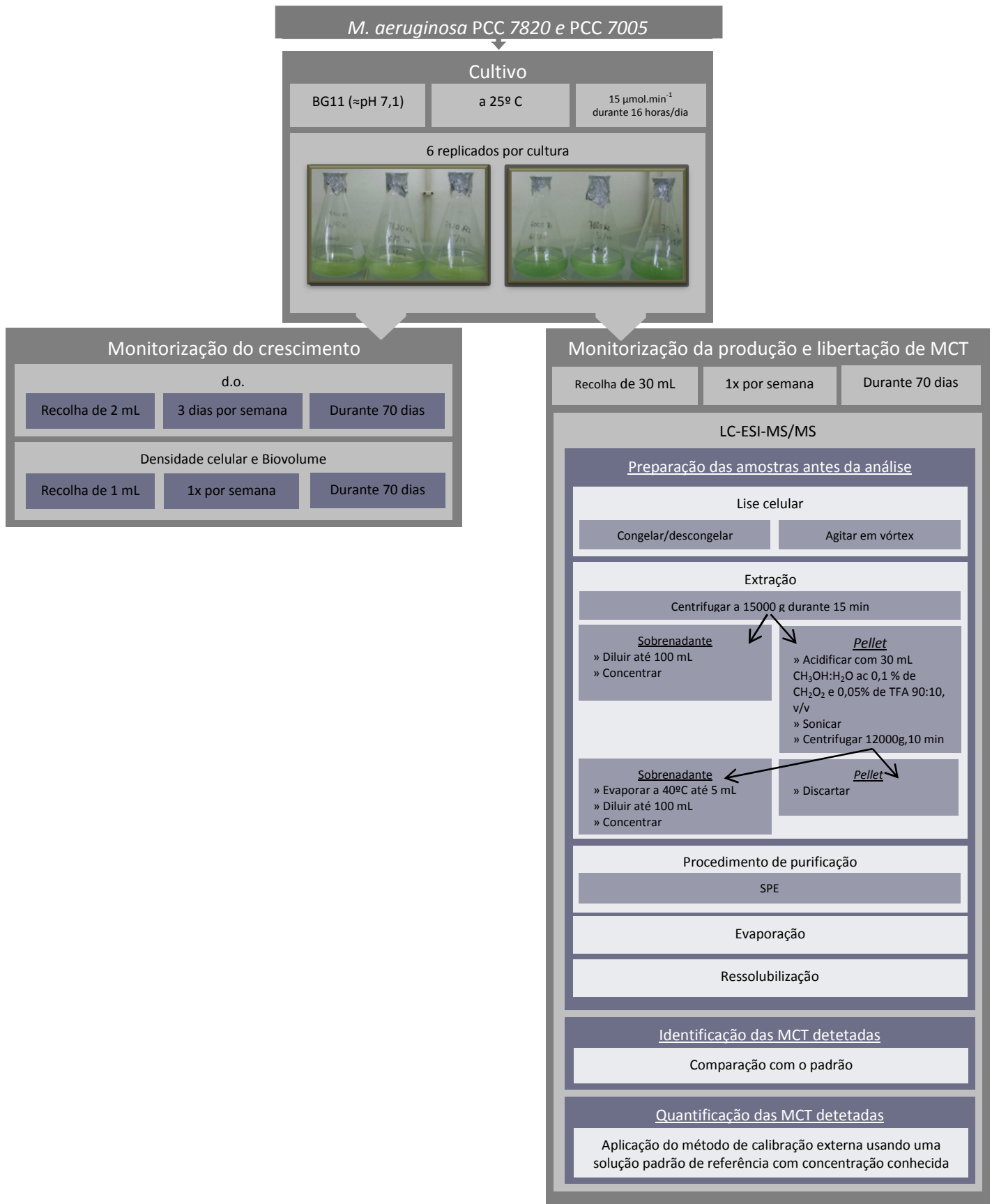


Figura 6.2 – Delineamento experimental para a monitorização do crescimento e da produção e libertação de microcistinas de culturas de *M. aeruginosa*, PCC 7820 e PCC 7005.

6.2.3.2. Monitorização da produção e libertação de microcistinas após infecção viral com cianófagos

A produção e libertação das microcistinas, após infecção das culturas de *M. aeruginosa*, PCC7820 e PCC7005, com um concentrado viral líquido, foi monitorizada por análise LC-ESI-MS/MS dos replicados infetados e não infetados, no início da infecção e 31 dias após a infecção viral. Para tal, na câmara de fluxo laminar, infetou-se três de seis replicados de 100 mL das culturas de *M. aeruginosa* já com 8 dias de cultivo em BG11 em frascos de cultura de tecidos (1 L Orange Scientific), com 8 mL de concentrado viral líquido Ma-LEZ01. Este concentrado viral líquido foi previamente avaliado de uma forma geral, em termos do número de partículas semelhantes a vírus (VLP – *Virus Like Particles*) de acordo com o procedimento de **Noble, R. & Fuhrman, J. (1998)**, conforme descrito no Anexo 1. Imediatamente a seguir à infecção, as culturas foram suavemente homogeneizadas e procedeu-se à recolha de uma amostra de 30 mL de cada um dos replicados bem como dos replicados do controlo negativo. As amostras e os controlos negativos foram imediatamente conservados no congelador para análise posterior. O crescimento destas culturas também foi monitorizado por d.o.. Assim, dois dias por semana, recolheu-se assepticamente 2 mL de cada replicado das culturas infetadas com cianófagos e dos respetivos controlos e acompanhou-se o seu crescimento com leituras de d.o. aos três comprimentos de onda em estudo. Decorridos 31 dias após a infecção, as culturas apresentavam claros indícios de declínio e lise celular, pelo que se finalizou a experiência. Para tanto, recolheu-se uma amostra de 30 mL de cada replicado das culturas infetadas e dos respetivos controlos negativos para posterior análise por LC-ESI- MS/MS. Todos estes procedimentos, assim como, os efectuados na preparação das amostras para análise por LC-ESI- MS/MS encontram-se esquematizados na figura 6.3.

Para além deste, foram realizados outros dois desenhos experimentais que envolveriam a monitorização da produção e libertação de microcistinas por PCC 7820 e de PCC 7005, também por LC-ESI-MS/MS, de forma a avaliar a influência de uma infecção e de uma re-infecção viral com um concentrado viral constituído por 3 PFU (PFU- *Plaque-Forming Unit*) de cianófagos Ma-LEZ01. No entanto, a monitorização por LC-ESI-MS/MS não foi exequível em tempo útil, pelo que as amostras permanecem congeladas a fim de serem analisadas. A monitorização do crescimento destas culturas por d.o. e a monitorização do número de PFU não é por isso apresentada.

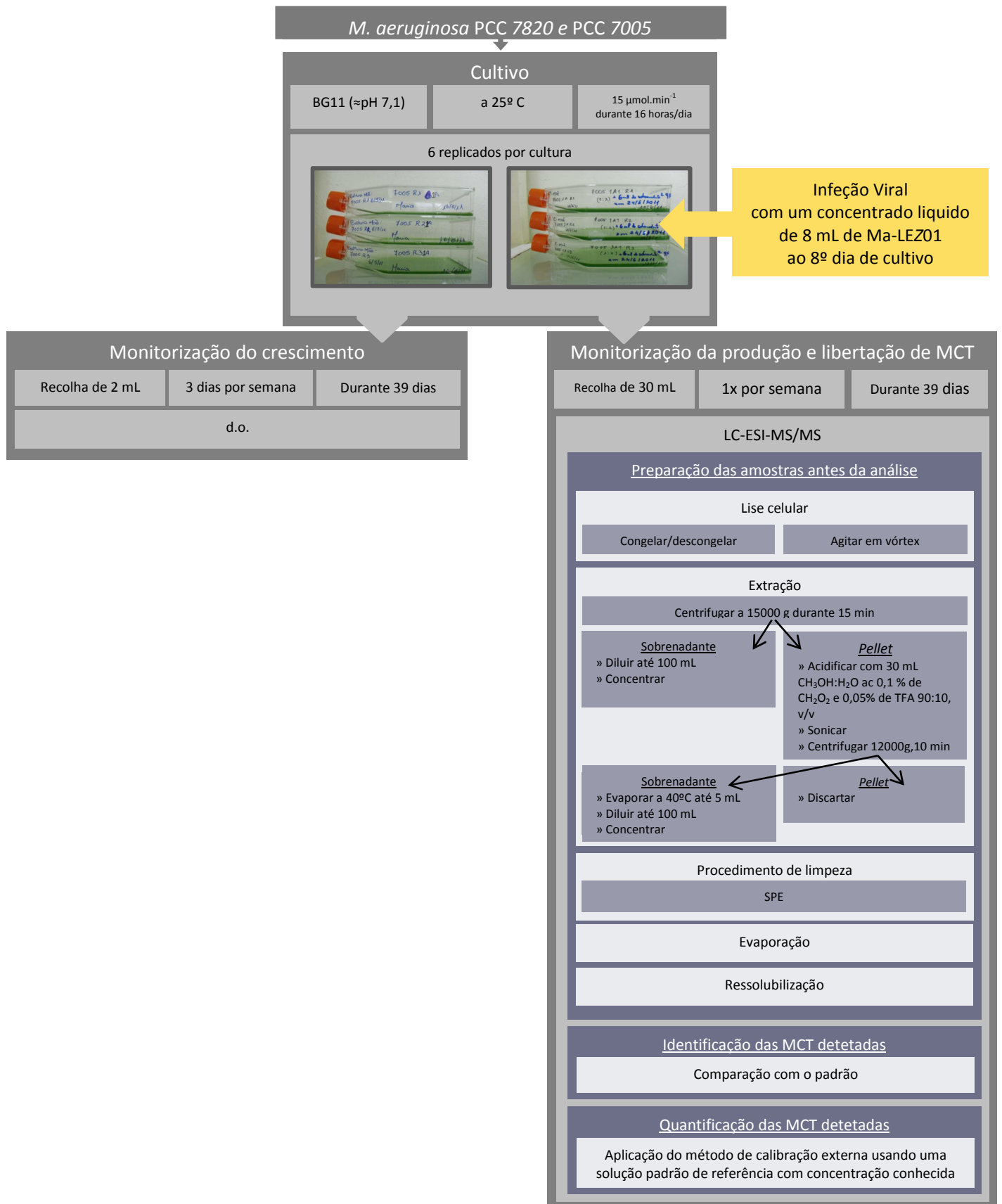


Figura 6.3 – Delineamento experimental para a monitorização do crescimento e da produção e libertação de microcistinas de culturas de *M. aeruginosa*, PCC 7820 e PCC 7005 após infeção viral com cianófagos Ma-LEZ01.

6.3. Tratamento de dados

O tratamento dos dados obtidos em virtude do trabalho experimental foi realizado com recurso ao *software* GraphPad Prism Versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com)..

6.4. Resultados

6.4.1. Monitorização do crescimento e libertação de microcistinas em cultura

6.4.1.1. Espetros de absorção

As figuras 6.4. e 6.5 mostram os espectros de absorção dos triplicados das culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005, respetivamente. Como referido anteriormente, estes espectros de absorção contínuos foram traçados para comprimentos de onda crescentes, a intervalos de 10 nm, entre os 350 nm e os 800 nm, incluindo assim a zona do visível.

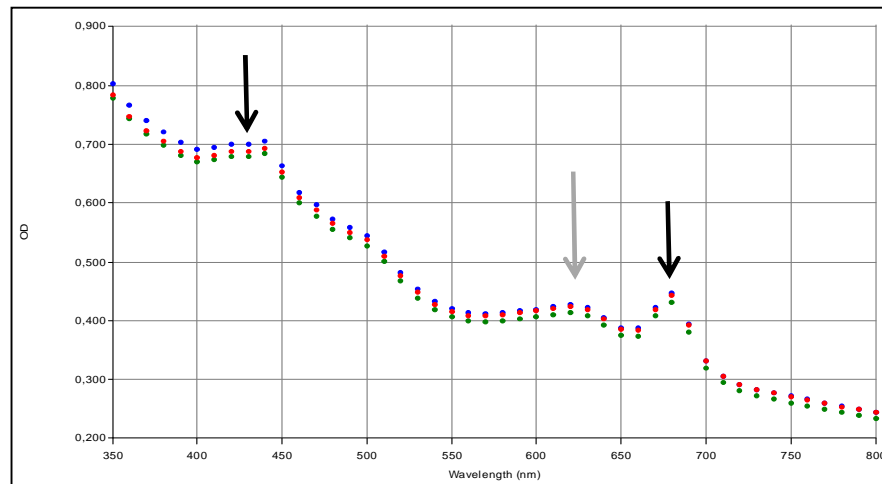


Figura 6.4 – Espectro de absorção traçado de 10 em 10 nm, entre os 350 nm e os 800 nm, para um dos triplicados biológicos de *M. aeruginosa* PCC 7820. As setas a preto indicam os picos referentes à absorção de clorofila *a* e a seta cinzenta o pico referentes à deteção de outro pigmento fotossintético.

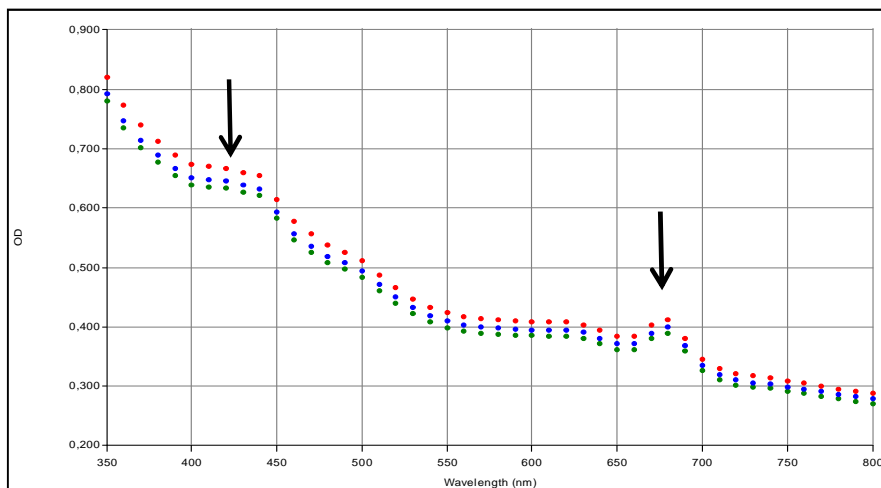


Figura 6.5 – Espectro de absorção contínuo traçado de 10 em 10 nm, entre os 350 nm e os 800 nm, obtido para um dos triplicados biológicos de *M. aeruginosa* PCC 7005. As setas a preto indicam os picos referentes à absorção de clorofila *a*.

Observando as figuras 6.4 e 6.5 pode-se constatar que ambas as estirpes de *M. aeruginosa* apresentam claramente dois picos de absorção ao longo de todo o intervalo de trabalho. A presença de um pico entre 400 nm e 450 nm e de outro entre 650 nm e 700 nm (picos devidamente assinalados na figura com uma seta a negro) resultam da absorção do principal pigmento fotossintético das cianobactérias, a clorofila *a*. De acordo com **Barsanti, L., et al (1990)**, a clorofila *a* no espectro de absorção do visível pode absorver a 440 nm, 580 nm e a 680 nm. De forma pouco evidente, mas assinalado na figura com uma seta a cinzento, parece surgir sobretudo para PCC 7820 um pico de absorção alargado, entre 550 nm e 650 nm, que poderá eventualmente resultar da sobreposição de picos de absorção de outros pigmentos fotossintéticos presentes nas cianobactérias, nomeadamente, ficoeritrina (550 nm) e ficocianina (620 nm) (**Barsanti, L., et al, 1990**). Como foi referido no capítulo II, as ficocianinas são responsáveis pela cor azul tão característica das escumas formadas pelas cianobactérias. Estes pigmentos fotossintéticos acessórios para além de absorverem luz no espectro do visível na zona do laranja, absorvem também na zona do infravermelho, mais precisamente a 730 nm. No entanto, nenhum pico de absorção a 730 nm foi observado nos espectros traçados para as duas estirpes de *M. aeruginosa* em estudo.

Apesar disso, e de acordo com os dados reportados na literatura (Kaebernick, M., *et al*, 2000; Cummings, M., 2002; Pearson, L., *et al*, 2004) optou-se por monitorizar o crescimento das culturas de *M. aeruginosa* por leitura das suas densidades óticas a $\lambda = 680$ nm e $\lambda = 730$ nm, utilizando para correção da turvação a leitura a $\lambda = 750$ nm (Sangolkar, L. *et al.*, 2008). Esta correção é tanto mais relevante quanto se sabe que apesar de unialgais, as culturas PCC 7820 e PCC 7006 não são axénicas.

6.4.1.2. Monitorização do desenvolvimento de *M. aeruginosa*

6.4.1.2.1. Densidade ótica

A monitorização do desenvolvimento das culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005, cultivadas em frascos de vidro, efetuada por leitura da d.o. a 680 nm e a 730 nm é ilustrada pela figura 6.6. Estão representados os valores médios de d.o. dos triplicados de cada uma das culturas, assim como os respetivos erros padrão. Estes valores médios foram obtidos após correção com os valores de d.o. resultantes da turvação da amostra (Sangolkar, L., *et al*, 2009).

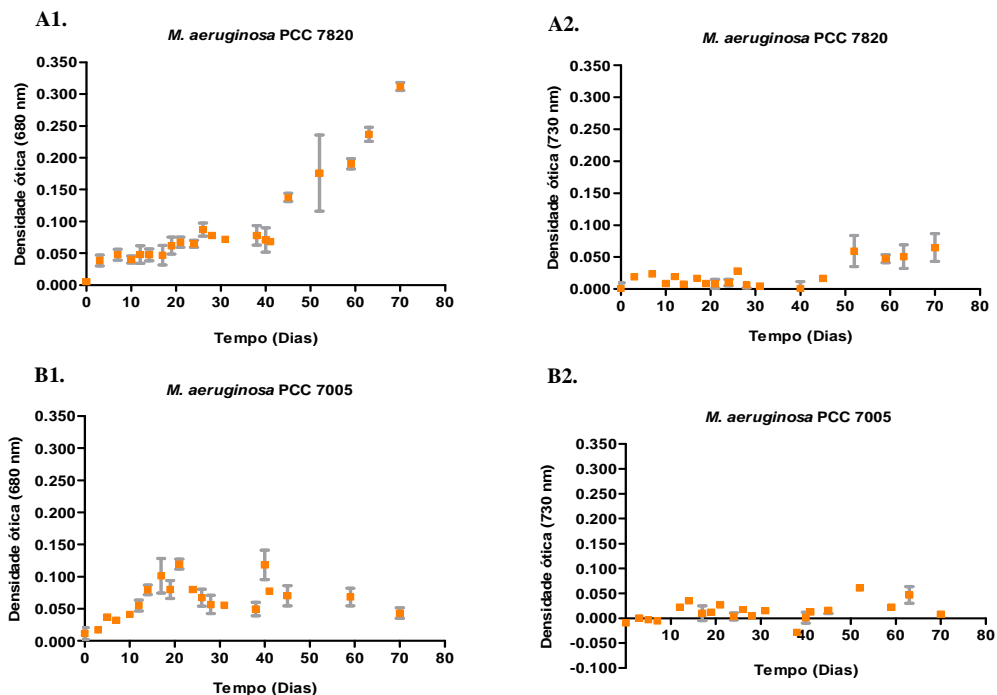


Figura 6.6 – Monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7820 (A1 e A2) e de *M. aeruginosa* PCC 7005 (B1 e B2) a 680 nm (A1 e B1) e a 730 nm (A2 e B2), com representação dos valores médios ($n = 3$) e dos respetivos erros padrão. Verifica-se em algumas situações a omissão dos erros padrão, por serem ínfimos.

Observando a figura 6.6 A1 é possível verificar que *M. aeruginosa* PCC 7820 após o inóculo demorou 40 dias a adaptar-se ao novo meio nutritivo BG11, sem multiplicação celular significativa. Após os 40 dias, entrou em fase exponencial de crescimento, mantendo-se assim até ao último dia da monitorização, sem que se tenha verificado uma fase estacionária ou de declínio na curva de crescimento. É possível verificar também que a monitorização do crescimento desta estirpe a 680 nm revelou valores de d.o. maiores em relação à monitorização a 730 nm. Para a estirpe PCC 7005 de *M. aeruginosa* a monitorização do seu crescimento também revelou maiores valores de d.o. a 680 nm, no entanto nunca alcançou valores de d.o. iguais ou superiores aos da estirpe PCC 7820. A monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7005 por d.o. revelou que após um período inicial de crescimento lento até ao 22º dia, a cultura deixou de crescer, variando os valores de d.o. dos três replicados em torno de valores médios iguais ou inferiores aos registados no 22º dia. Não foi, portanto, detetada uma verdadeira fase exponencial de crescimento, tendo os três replicados entrado em total senescência. Observando a figura 6.6 B2 é possível verificar que há uma dispersão de dados de tal forma que a monitorização do crescimento de PCC 7005 em termos de quantidade de ficocianina não foi possível.

6.4.1.2.2. Densidade celular e biovolume

A monitorização do crescimento das estirpes PCC 7820 e PCC 7005 foi também realizada através da densidade celular (número de células/L) e da biomassa, mais precisamente através do cálculo do biovolume de *M. aeruginosa* (mm^3/L). A figura 6.7 ilustra as médias e os respetivos erros padrão do número de células de *M. aeruginosa*/L e biovolume, calculados para cada uma das culturas em estudo.

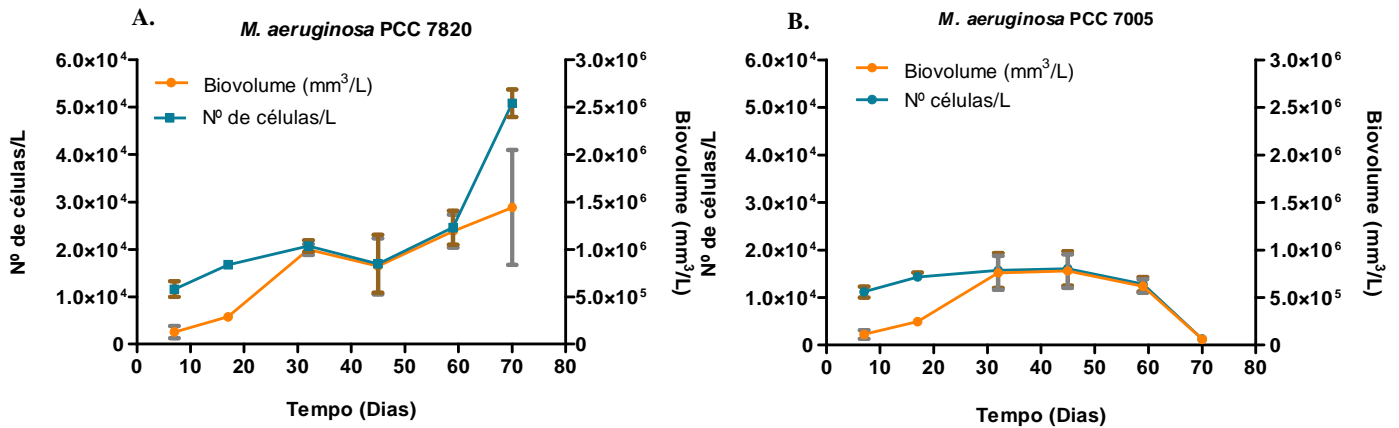


Figura 6.7 – Evolução da densidade celular (número de células/L) e do biovolume (mm³/L) das culturas *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) e PCC 7005 (B) ao longo de 70 dias, com representação dos valores médios (n=3) e dos respectivos erros padrão. Verifica-se em algumas situações a omissão dos erros padrão, por serem ínfimos.

Observando a figura 6.7 é possível verificar que o número de células/L de PCC 7820 aumentou ao longo do tempo de cultivo, variando entre $1,1 \times 10^4$ e $5,1 \times 10^4$, máximo relativo atingido ao 70º dia. Não se considera relevante a ligeira inflexão registrada ao 45º dia, dado o elevado erro padrão associado à média dos valores para esse dia. Em termos de biovolume, é possível verificar que esta estirpe de *M. aeruginosa* aumentou ao longo do tempo, variando entre $1,3 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^6$ mm³/L. A ligeira diminuição no biovolume de PCC 7820 ao 45º dia, reflete o sucedido com a d.c. estimada, que está na base do cálculo deste parâmetro. A comparação entre estas duas curvas ilustra o aumento do biovolume celular médio até ao 60º, aumento que foi particularmente acentuado, atingindo os 15%, até ao 17º dia da experiência (cf. tabela 6.1). Verificou-se que este aumento relativo das dimensões celulares com o tempo foi significativo ($P_{(H_0)} < 6,3 \times 10^{-9}$).

Em relação ao número de células de *M. aeruginosa* PCC 7005/L de cultura é possível verificar que este aumentou até ao 45º dia de cultivo, decaindo drasticamente até ao último dia da experiência no qual atingiu um valor mínimo de $1,3 \times 10^3$ células/L. Assim, o nº de células/L desta estirpe ao longo do tempo variou entre $1,1 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^3$ células/L. Em termos de biovolume esta estirpe aumentou claramente até ao 32º dia, sucedendo-se um ligeiro aumento até ao 45º dia e posteriormente um decaimento até ao último dia de cultivo, variando então entre $1,1 \times 10^5$ e $6,2 \times 10^4$ mm³/L. A comparação entre a curva do número de células e a do biovolume, ilustra o aumento do biovolume

celular médio até ao 60º dia de cultivo, aumento que foi particularmente acentuado, atingindo os 13%, entre o 17º dia e o 32º dia da experiência (cf. tabela 6.1). Verificou-se que este aumento relativo das dimensões celulares com o tempo foi significativo ($P (H_0) < 1,6 \times 10^{-8}$).

Comparando as densidades celulares das duas estirpes em estudo é possível constatar que, ao longo do tempo em que decorreu a experiência, a cultura da estirpe PCC 7005 não atinge a d.c. de PCC 7820, sendo em alguns casos inferior em uma ordem de grandeza. Esta relação de inferioridade é consequentemente registrada no biovolume, dado que o número de células está na base do cálculo deste parâmetro biológico de crescimento.

Durante o processo de contagem do número de células e de medição das células para o cálculo do biovolume foram tiradas algumas fotografias das culturas de *M. aeruginosa* em estudo. A figura 6.8 apresenta células de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005 recolhidas ao 7º dia (A) e ao 70º dia (B) de cultivo, onde é observada lise celular das células de PCC 7005 ao 70º dia de cultivo (B2), referida anteriormente. Estas células foram captadas com uma máquina fotográfica diretamente incorporada no microscópio de epifluorescência com intercalação de um filtro verde para visualização da autofluorescência de pigmentos clorofilinos.

Tabela 6.1 – Dimensões celulares das estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* ao longo dos 70 dias de cultivo.

Tempo (Dias)	Dimensões celulares (μm^3) (Média, n=3 \pm Erro padrão)	
	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7820	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7005
7	5,45 \pm 0,03	5,53 \pm 0,02
17	6,25 \pm 0,03	5,83 \pm 0,08
32	6,58 \pm 0,06	6,56 \pm 0,04
45	6,83 \pm 0,10	6,83 \pm 0,10
59	6,96 \pm 0,04	6,96 \pm 0,04
70	6,40 \pm 0,06	6,78 \pm 0,09

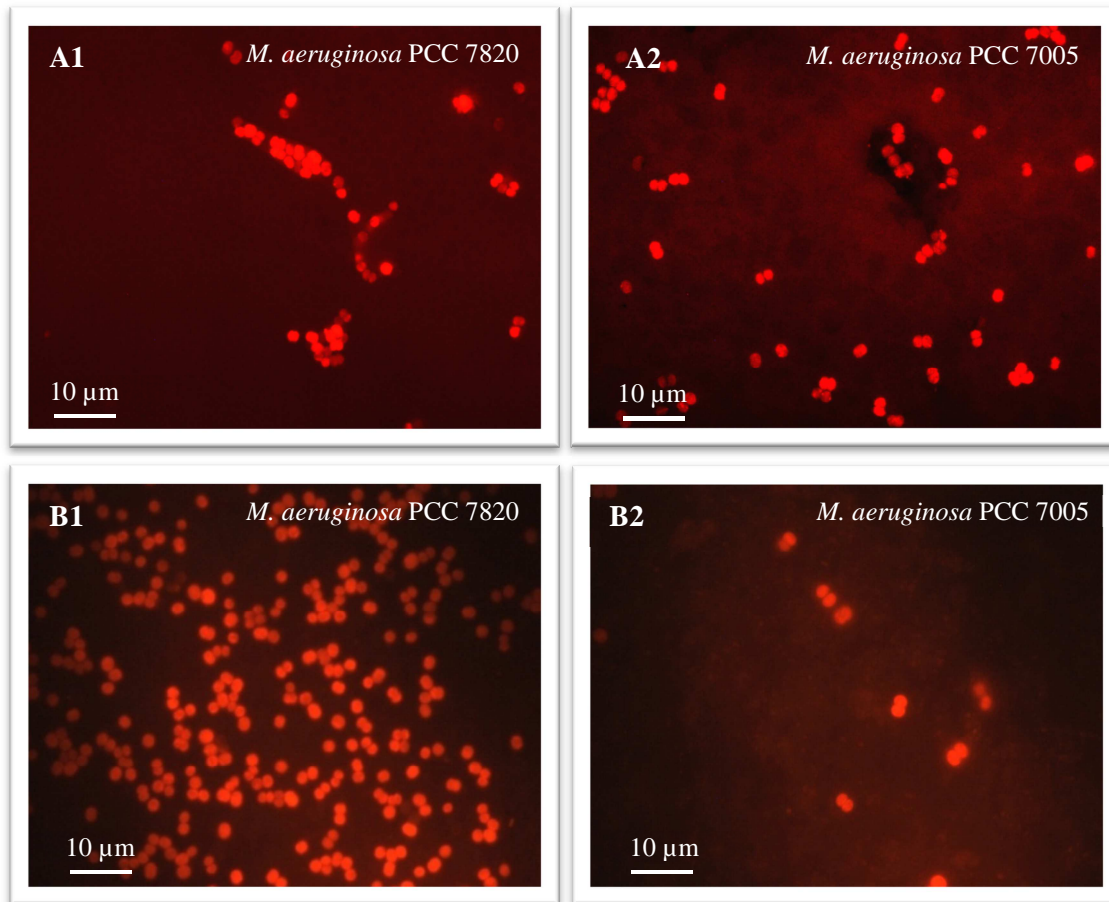


Figura 6.8 – Fotografias em microscopia de epifluorescência de amostras de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005, recolhidas ao 7º dia (A) e ao 70º dia (B) de cultivo, observadas com uma ampliação de 787.5x e visualizadas com filtro verde.

6.4.1.2.3. Taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação

A taxa específica de crescimento celular (μ) e o tempo de duplicação (td) são dois parâmetros biológicos indicadores da evolução do crescimento de uma cultura microbiana. Só foi possível calcular estes parâmetros para os replicados das culturas de PCC7820, uma vez que os da estirpe PCC7005 não chegaram a entrar em crescimento equilibrado. Na tabela 6.2 apresentam-se as médias e os erros padrão destes dois parâmetros de crescimento dos três replicados biológicos de PCC7820. O cálculo destes parâmetros foi executado com base nas d.o. lidas a 680 nm entre o 45º e o 70º dia de cultivo. Este intervalo também foi usado para os cálculos baseados quer na d.c., quer no

biovolume, por corresponder aos declives máximos obtidos para as tangentes às curvas de biovolume. Para o cálculo destes parâmetros com base no biovolume não se utilizaram os valores de um dos replicados, por serem negativos. As equações I.5 e I.6, apresentadas no anexo 1, foram as aplicadas para este cálculo.

Tabela 6.2 – Taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação de *M. aeruginosa* PCC 7820 calculados com base nos valores de d.o., d.c. e biovolume.

Parâmetro biológico de crescimento	Taxa específica de crescimento (dias ⁻¹) (Média, n=3 ± Erro padrão)	Tempo de duplicação (dias) (Média, n=3 ± Erro padrão)
D.o. a 680 nm	0,03 ± 0,00	21 ± 1
D.c (células/L)	0,04 ± 0,02	20 ± 8
Biovolume (mm ³ /L)	0,05 ± 0,01	16 ± 2

As diminutas diferenças entre as taxas específicas de crescimento e entre os tempos de duplicação registradas na tabela 6.2, para os mesmos intervalos de tempo, sugerem presença de correlação entre os valores da d.o. com os valores de d.c. Com efeito, foi possível obter regressões lineares significativas entre as medições de crescimento pelos diferentes métodos utilizados. Utilizando os dados relativos aos replicados que se mantiveram em crescimento equilibrado em todos os pontos em que se avaliou a d.c, foi possível obter elevadas regressões lineares entre a d.o. e a d.c. ($r^2 > 0,93$, com uma probabilidade de 92%). A regressão linear entre d.o. e o biovolume ($r^2 > 0,35$), não sugere uma forte correlação entre os valores de d.o e os de biovolume, como ilustra a figura 6.9.

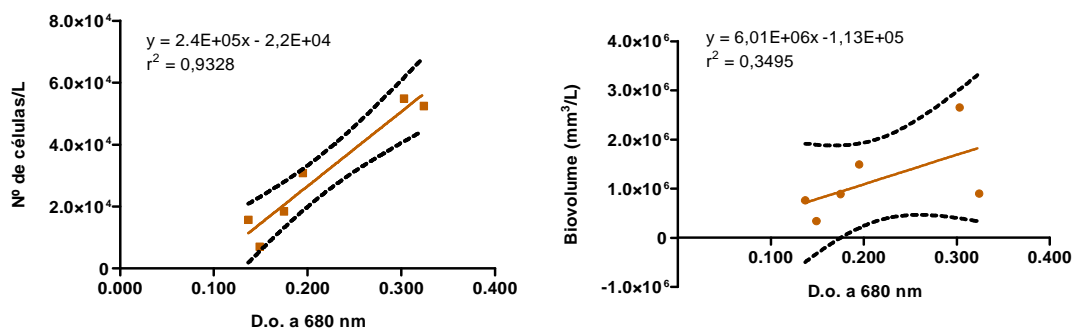


Figura 6.9 – Regressão linear obtida entre os valores de d.o. e de d.c (A) e entre os valores de d.o. e biovolume (B) obtidos para *M. aeruginosa* PCC 7820 quando esta se encontrava em crescimento equilibrado.

6.4.1.3. Produção e libertação de microcistinas

A produção e libertação de microcistinas pelas estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* foram monitorizadas ao longo de 70 dias de cultivo por LC-ESI-MS/MS. De modo a averiguar a intensidade do sinal resultante da deteção da quantidade de microcistinas presentes nas amostras, cada uma das estirpes em estudo foi submetida a uma análise preliminar dos dois sobrenadantes resultantes do processo de extração das amostras relativas ao 7º dia de cultivo. Durante esta análise foram analisados padrões de MCT de 50 µg/L e de 500 µg/L de forma a estimar os dados obtidos. Foi também analisada uma amostra de mistura de CH₃OH:H₂O 70:30 v/v (branco) de forma a avaliar se o solvente influencia a intensidade do sinal e também de forma a efetuar uma limpeza do sistema cromatográfico entre cada análise das culturas. Para simplificar e proporcionar uma melhor perceção, o sobrenadante obtido a partir do extrato bruto das culturas será designado por sobrenadante e o sobrenadante obtido pelo processo de extração complementar com CH₃OH:H₂O acidificada será designado por *pellet*. Na figura 6.10 e 6.11 estão representados a intensidade do sinal das microcistinas detectadas no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005, respetivamente, assim como nas soluções padrão.

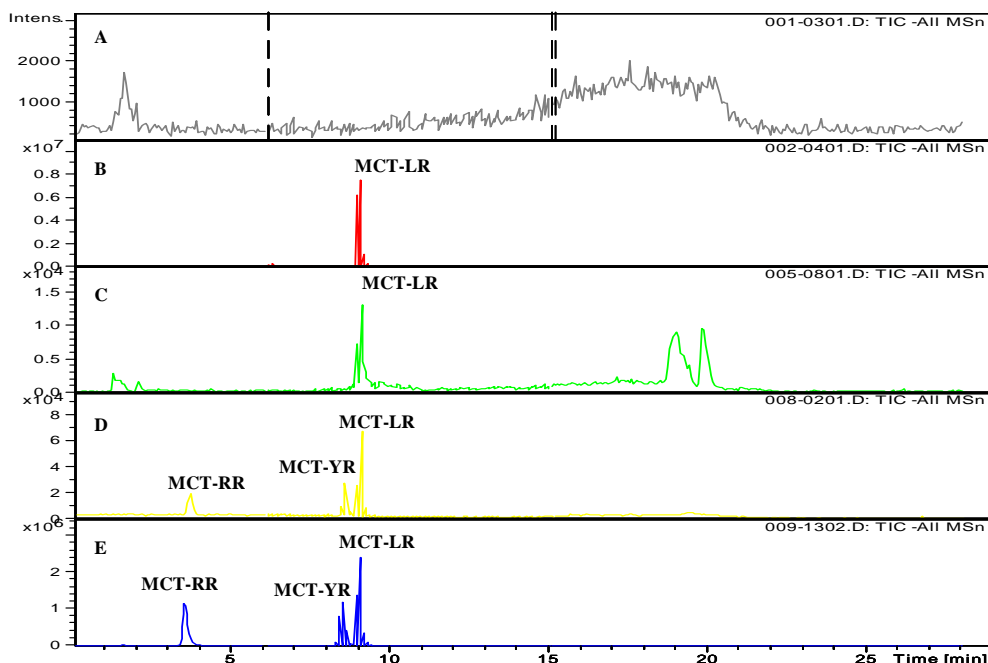


Figura 6.10– Intensidade do sinal do branco da amostra (A), de cada variante de MCT detetada no sobrenadante (B) e no *pellet* (C) de um replicado biológico de *M. aeruginosa* PCC 7820 ao 7º dia de cultivo e dos padrões de MCT-MIX, 50 µg/L (D) e de 500 µg/L (E).

Observando a figura acima é possível verificar que por LC_ESI_MS/MS só foi detetada no sobrenadante de PCC 7820 a presença de uma variante de microcistinas, nomeadamente, a variante LR. A deteção desta cianotoxina foi confirmada por comparação com o padrão de 500 µg/L, mais precisamente através do tempo de retenção e dos espectros de MS/MS de MCT-LR apresentados na tabela 6.3. Verifica-se também que a intensidade do sinal obtida para esta variante é superior à do padrão de MCT de maior concentração conhecida (500 µg/L) e que não está sobrevalorizada pela intensidade de sinal do branco da amostra. Neste sentido, optou-se por efetuar uma diluição de 1:10 (v/v) de cada sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7820 com uma mistura de CH₃OH:H₂O 70:30, v/v. À semelhança do sobrenadante, é possível verificar que no *pellet* desta estirpe de cianobactéria também só se detectou a microcistina LR, tendo sido a sua confirmação efectuada por comparação com o tempo de retenção e com o espectro de MS/MS do padrão de MCT de 50 µg/L apresentados na tabela 6.4. Em termos de intensidade os valores obtidos estão abaixo dos valores obtidos para o padrão de MCT de 50 µg/L.

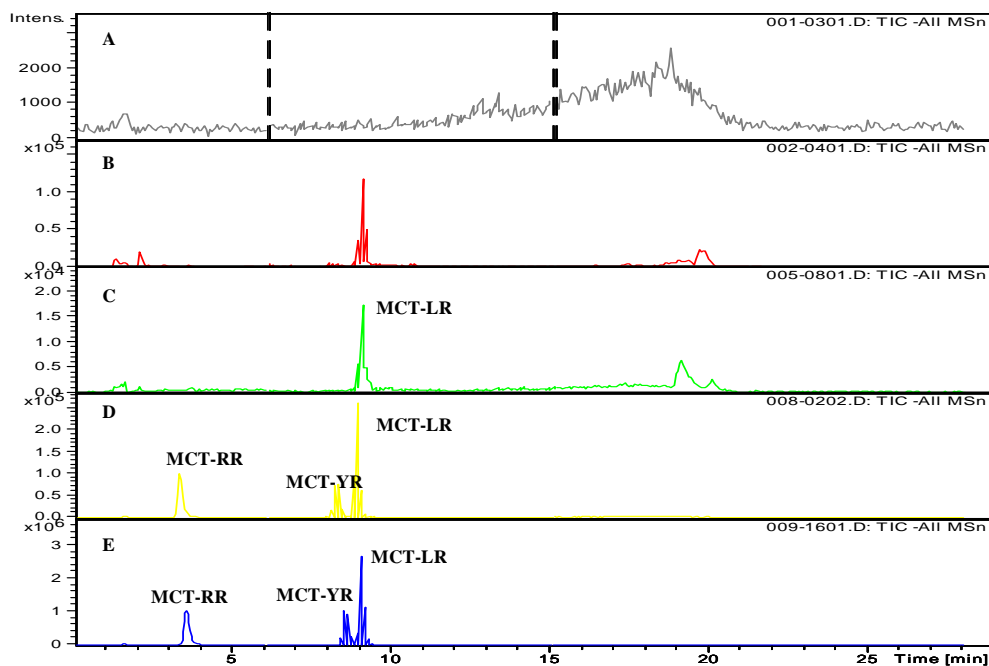
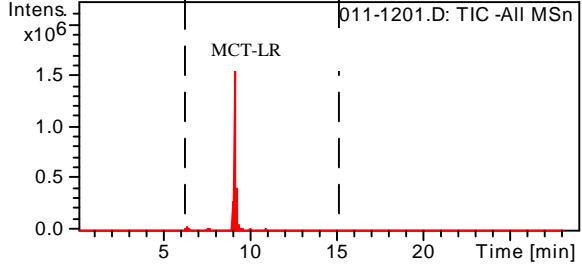
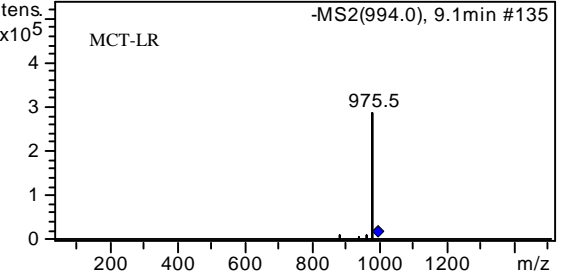
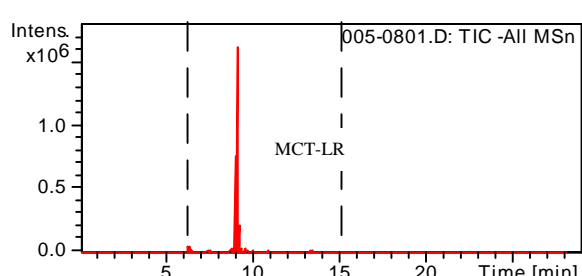
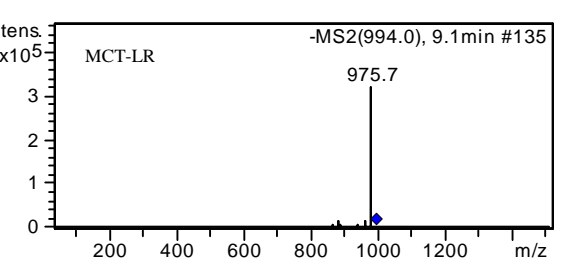
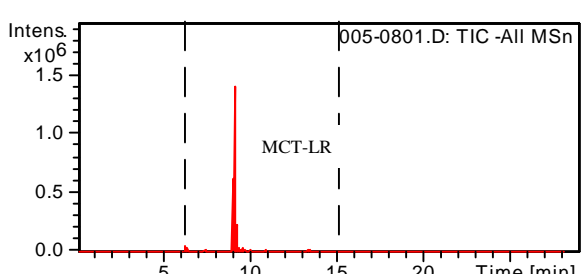
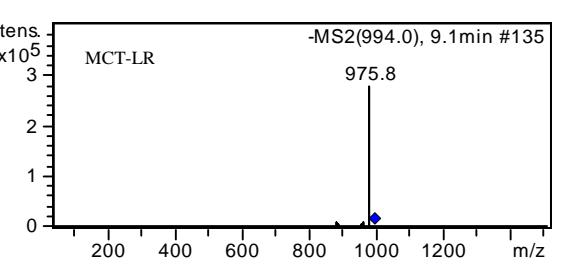
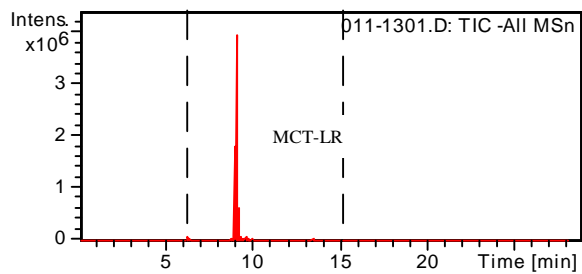
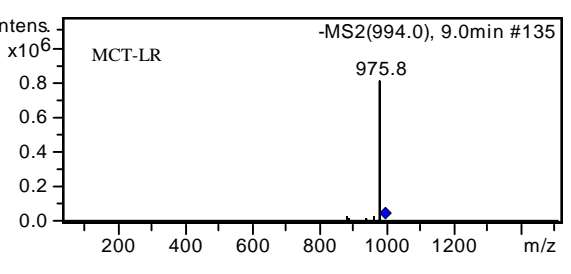
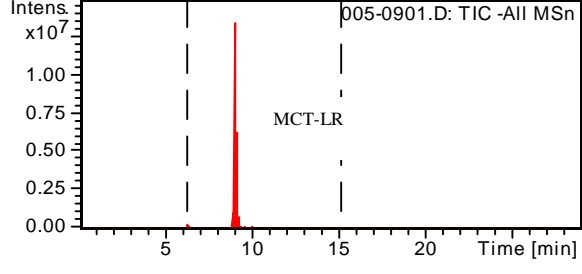
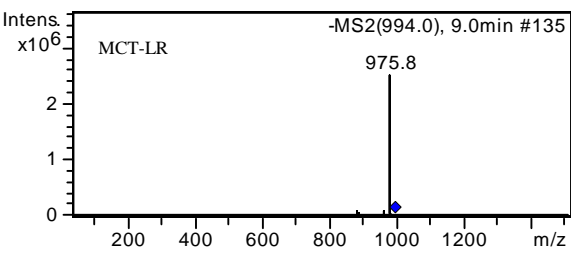


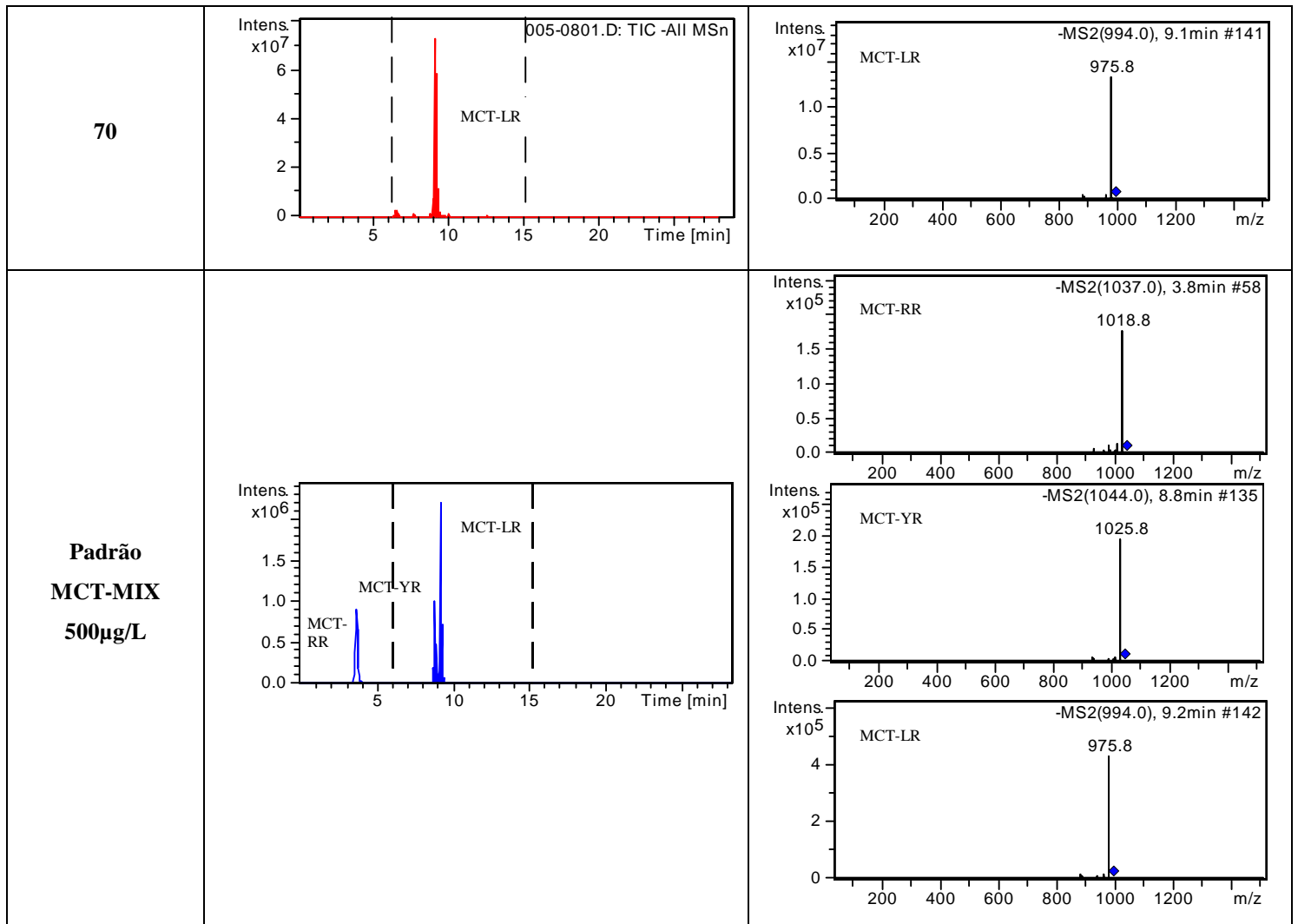
Figura 6.11– Intensidade do sinal do branco da amostra (A), de cada variante de MCT detetada no sobrenadante (B) e no *pellet* (C) de um replicado biológico de *M. aeruginosa* PCC 7005 ao 7º dia de cultivo e dos padrões de MCT-MIX, 50 µg/L (D) e de 500 µg/L (E).

Observando a figura acima verifica-se que, embora no cromatograma referente ao sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005 tenha sido detetado um composto com o mesmo tempo de retenção que a variante LR, não foi detetada nenhuma das variantes de microcistinas em estudo. Este facto é comprovado pelo espectro de MS/MS seguidamente apresentado na tabela 6.5. No entanto, a variante LR foi detetada no *pellet* desta estirpe, sendo a sua deteção confirmada por comparação com o tempo de retenção e espectro de MS/MS apresentados na tabela 6.6. Em termos de intensidade do sinal, verifica-se que quer a do sobrenadante quer a do *pellet* encontram-se abaixo dos limites de intensidade do sinal obtidos para o padrão de MCT de 50 µg/L. À semelhança de *M. aeruginosa* PCC 7820, a intensidade do sinal registrada para o branco da amostra parece não influenciar a intensidade do sinal registrada quer para o sobrenadante quer para o *pellet* desta estirpe.

As tabelas 6.3 e 6.4 mostram os cromatogramas e os espectro de MS/MS das variantes de microcistinas detetadas no sobrenadante (com uma diluição de 1:10, v/v) e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 ao longo dos 70 dias de cultivo. Os cromatogramas e os espectros de MS/MS do sobrenadante e do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 obtidos ao longo do tempo de cultivo estão representados nas tabelas 6.5 e 6.6. Nas quatro tabelas estão representados os cromatogramas e os espectros de MS/MS para um só replicado. Apresentando os restantes replicados resultados muito semelhantes não se considerou necessário incluir os seus cromatogramas e espectros MS/MS.

Tabela 6.3 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7820 (1:10, v/v) obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo.

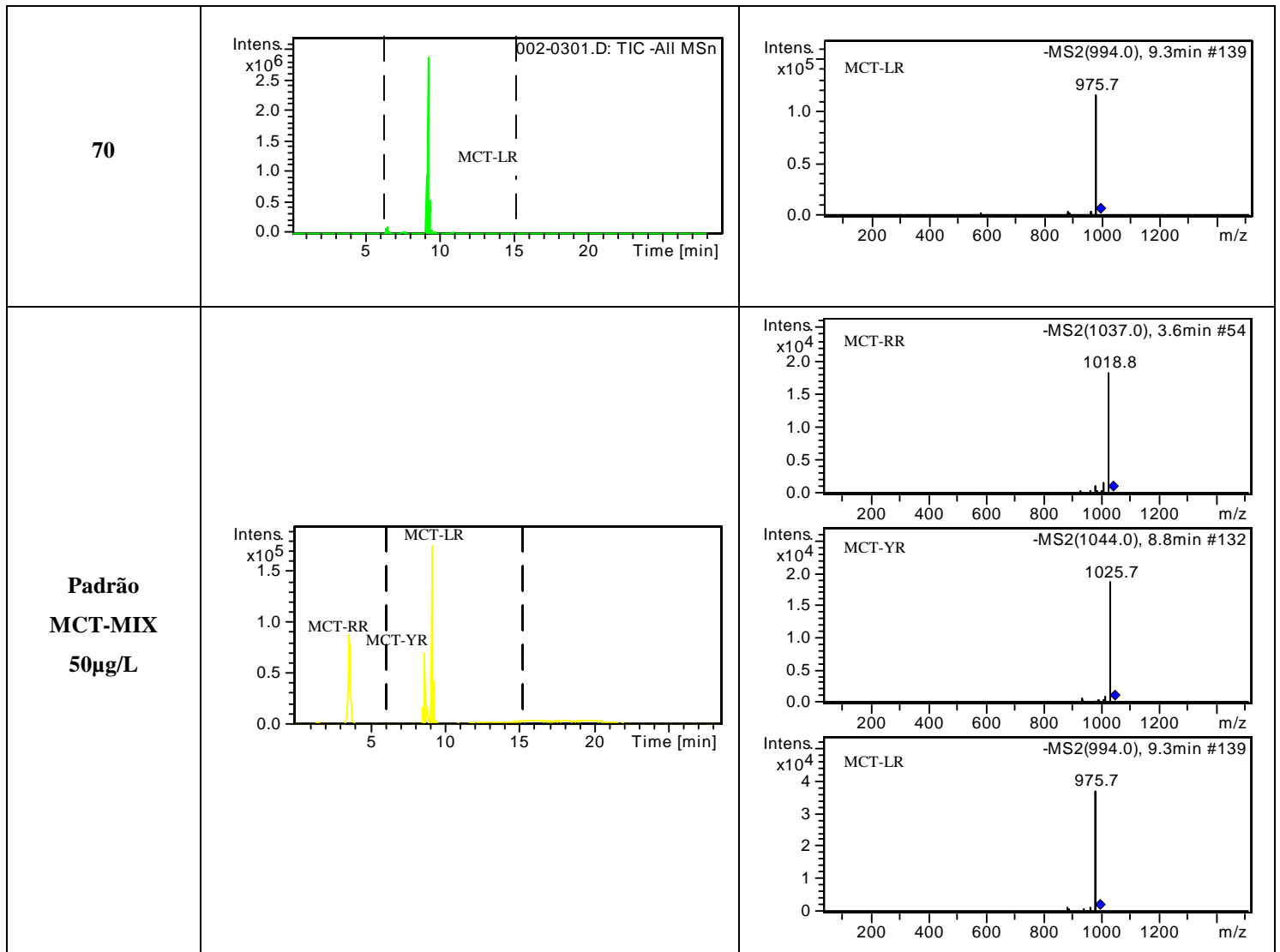
Tempo de cultivo (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
7		
17		
32		
45		
59		



Observando a tabela acima verifica-se que desde o primeiro tempo de monitorização ($t = 7$ dias) até ao último tempo ($t = 70$ dias) foi sempre detetada no sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7820 a presença só da variante LR. A deteção desta variante de microcistinas foi confirmada por comparação dos seus tempos de retenção e dos espetros de MS/MS com os do padrão de 500µg/L. Em termos de intensidade do sinal detetado, é possível verificar que este aumentou de forma gradual ao longo do tempo, atingindo o seu máximo de intensidade no último dia de monitorização.

Tabela 6.4 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do pellet de *M. aeruginosa* PCC 7820 obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo.

Tempo de cultivo (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
7		
17		
32		
45		
59		

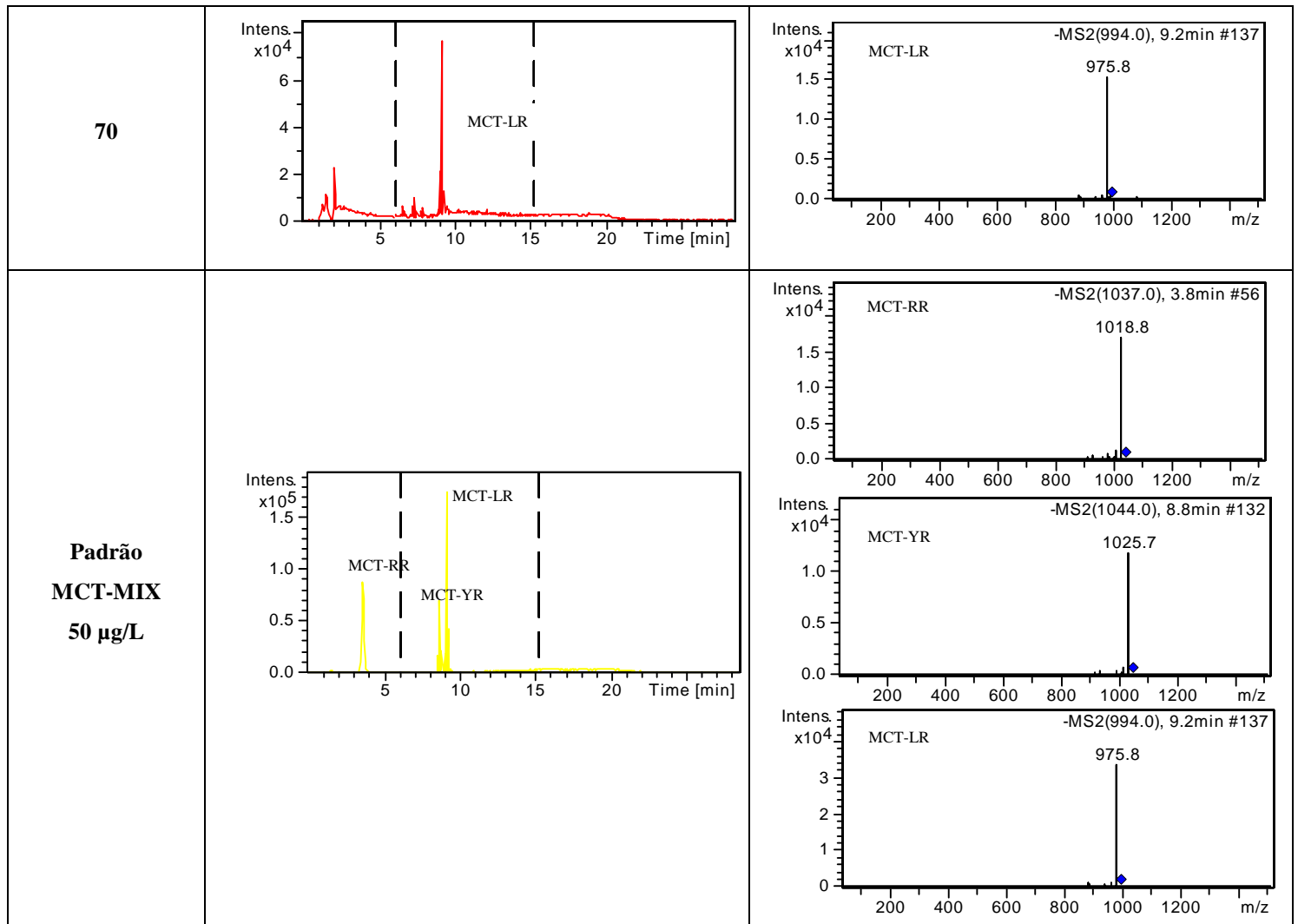


Analisando a tabela 6.4 verifica-se que a análise por LC_ESI_MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 desde o primeiro tempo de monitorização ($t = 7$ dias) até ao último tempo ($t = 70$ dias) revelou sempre a deteção da microcistina LR. Em termos de intensidade do sinal detetado, é possível verificar que, no início da monitorização ($t = 7$ dias) a baixa intensidade do sinal traduziu-se num espectro de massa com picos interferentes, como mostra o espectro de MS/MS. No entanto ao longo do tempo, esta aumentou de forma gradual atingindo o seu máximo de intensidade no 70º dia de cultivo.

Comparando as intensidades do sinal registradas nos cromatogramas da tabela 6.3 com os da tabela 6.4 é possível afirmar que a intensidade do sinal resultante da deteção de MCT-LR no sobrenadante é superior à do sinal da deteção desta mesma cianotoxina no *pellet*.

Tabela 6.5 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005 obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo.

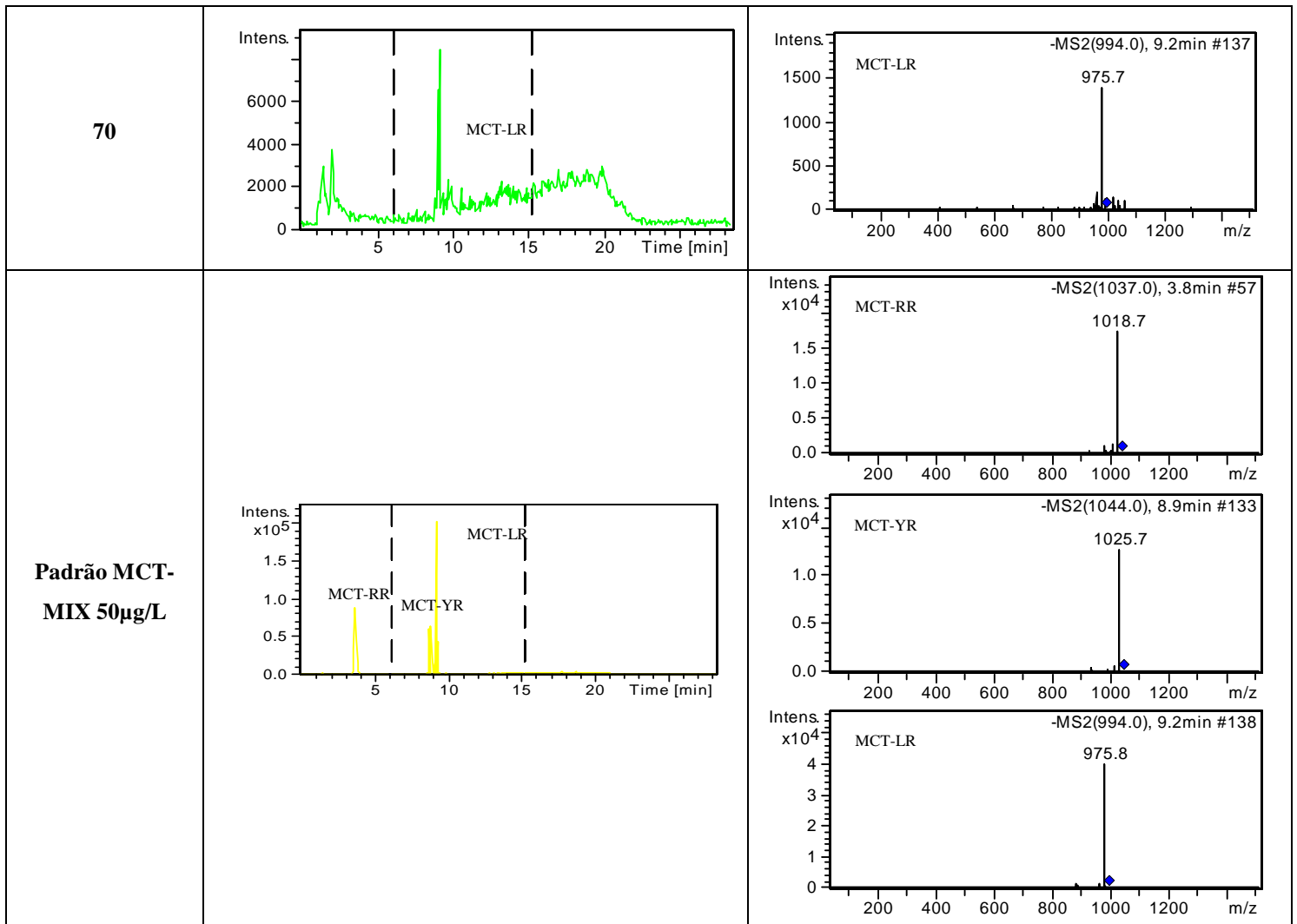
Tempo de cultivo (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
7		
17		
32		
45		
59		



Analisando a tabela 6.5 é possível verificar por comparação com os cromatogramas e com os espectros de MS/MS do padrão de 50 µg/L, que de forma geral não se observa a presença de nenhuma variante de microcistinas no sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005, nem mesmo a variante LR. Registou-se a deteção de MCT-LR, embora vestigial, ao 45º dia e ao 70º dia de cultivo.

Tabela 6.6 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do pellet de *M. aeruginosa* PCC 7005 obtidos ao longo dos 70 dias de cultivo.

Tempo de cultivo (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
7		
17		
32		
45		
59		



Ao observar a figura 6.6 é possível verificar que ao contrário da análise do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005, a análise do *pellet* desta cianobactéria revelou sempre a detecção da microcistina LR. Embora esta nos dois primeiros tempos se tenha observado em quantidades vestigiais, ao 59º dia de cultivo foi detetada com grande intensidade ($1,30 \times 10^7$). Em termos de intensidade do sinal detetado, não é possível estabelecer uma relação clara em função do tempo de cultivo.

Comparando as intensidades do sinal registradas nos cromatogramas da tabela 6.5 com os da tabela 6.6 é possível dizer que a intensidade do sinal resultante da detecção de MCT-LR no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 é de modo geral superior à do sinal da detecção desta mesma cianotoxina no sobrenadante.

Analisando estes resultados e comparando-os com os resultados obtidos para a estirpe PCC 7820 constata-se que embora tenha sido sempre a mesma cianotoxina a ser detetada, a sua intensidade do sinal variou. No sobrenadante da estirpe

PCC 7005 a intensidade do sinal detetada mostrou ser inferior à do *pellet*, enquanto para a para a estirpe PCC 7820 se verificou o contrário.

No decorrer da monitorização da produção e libertação de microcistinas ao longo dos 70 dias de cultivo, foram sempre analisados em conjunto com as amostras dois padrões de trabalho de MCT-MIX de 50 µg/L e de 500 µg/L. Para além de estes serem um ponto de referência para a identificação e quantificação das microcistinas produzidas pelas duas estirpes de *M. aeruginosa* em estudo, serviram também como meio de avaliar a linearidade e a estabilidade de resposta do sistema LC-ESI-MS/MS ao longo de toda a monitorização. A figura 6.12, com a representação da intensidade do sinal do sistema em função da concentração de cada uma das variantes de microcistinas detetadas na análise de um padrão de MCT-MIX de 50 µg/L e um de 500 µg/L, ilustra a já referida linearidade e a estabilidade de resposta do sistema LC-ESI-MS/MS.

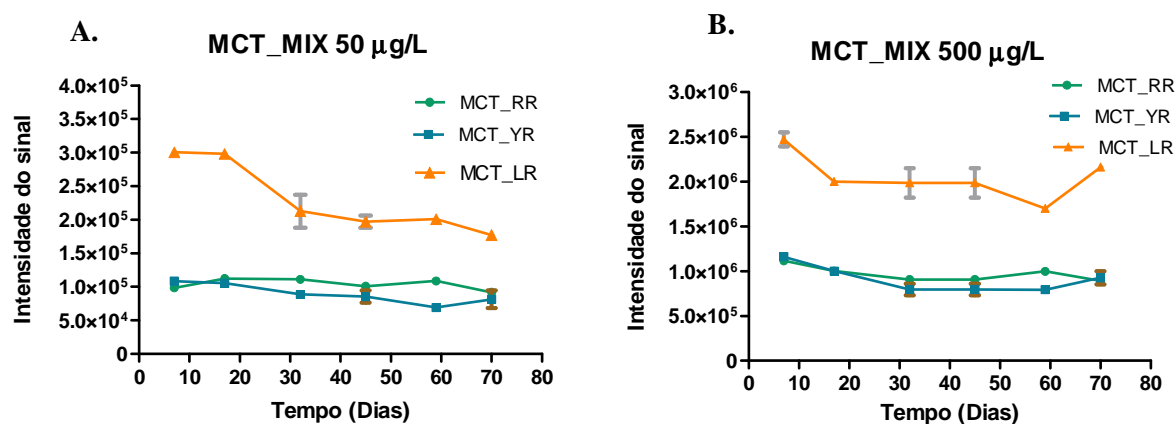


Figura 6.12 – Estabilidade do sistema de LC-ESI-MS/MS ao longo da análise de todas as amostras, determinada através da intensidade do sinal registrada em função da concentração de cada uma das variantes de microcistinas detetadas numa solução padrão de MCT-MIX de 50 µg/L (A) e de MCT-MIX de 500 µg/L (B) ao longo dos seis pontos de amostragem. Estão representados os valores médios (n=3) e os respetivos erros padrão, verificando-se em algumas situações a sua sonegação por estes serem ínfimos.

Analisando a figura 6.12 é possível verificar que o sistema de LC-ESI-MS/MS na detecção das variantes RR e YR, quer no padrão de MCT-MIX 50 µg/L quer no padrão de MCT-MIX de 500 µg/L, gerou sempre resultados dentro da mesma faixa analítica. Já a detecção da variante LR dos dois padrões em estudo, variou numa faixa analítica maior, no entanto, esta variação mostrou não ser relevante.

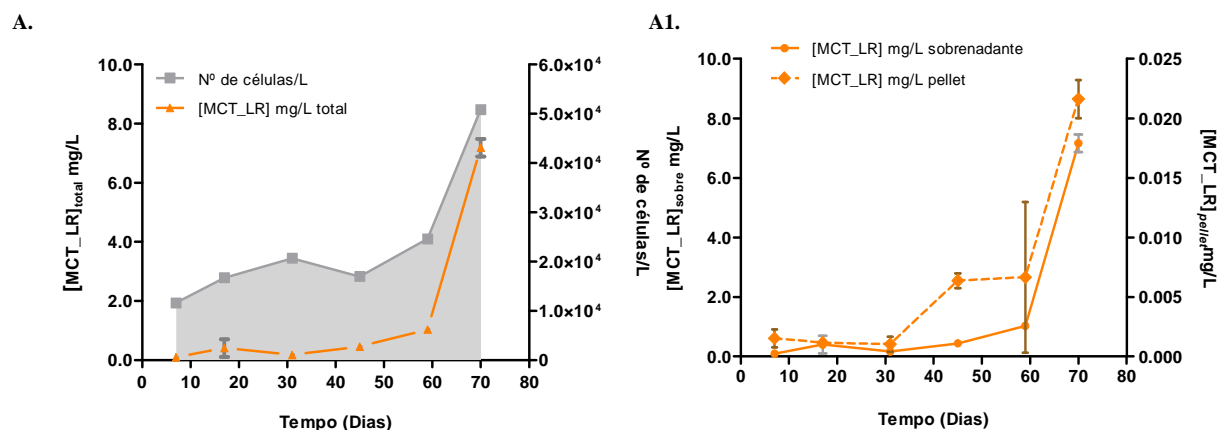
Uma vez identificada a variante LR como sendo a variante produzida e libertada ao longo dos 70 dias de cultivo das culturas de *M. aeruginosa* em estudo, procedeu-se à sua quantificação. Para tal relacionou-se, de acordo com a equação 6.1, a área do seu pico cromatográfico com a área do pico cromatográfico do seu padrão assim como com a concentração deste.

$$[MCT_{LR}]_a = \frac{A_{MCT_{LR} a}}{A_{MCT_{LR} p}} \times [MCT_{MIX}]_p \quad (6.1)$$

Em que, $[MCT_{LR}]_a$ representa a concentração de MCT-LR estimada na amostra, $A_{MCT_{LR} a}$, a área do pico cromatográfico referente à detecção de MCT-LR na amostra, $A_{MCT_{LR} p}$, a área do pico cromatográfico referente à detecção de MCT-LR no padrão e $[MCT_{MIX}]_p$, a concentração do padrão analisado paralelamente com a amostra.

Neste sentido, a figura 6.13 revela a quantidade total de MCT-LR produzida e libertada respetivamente pelas estirpes PCC 7820 e PCC 7005, ao longo de seis pontos de amostragem durante os 70 dias de cultivo. As quantidades de MCT-LR descritas nas figuras resultam da média dos três triplicados biológicos tanto para os sobrenadantes como para os *pellets*. Para comparação, apresentam-se também o número de células/L obtidos ao longo do tempo de cultivo. Os erros padrão associados estão também representados, verificando-se em algumas situações a sua sonegação por serem ínfimos.

M. aeruginosa PCC 7820



M. aeruginosa PCC 7005

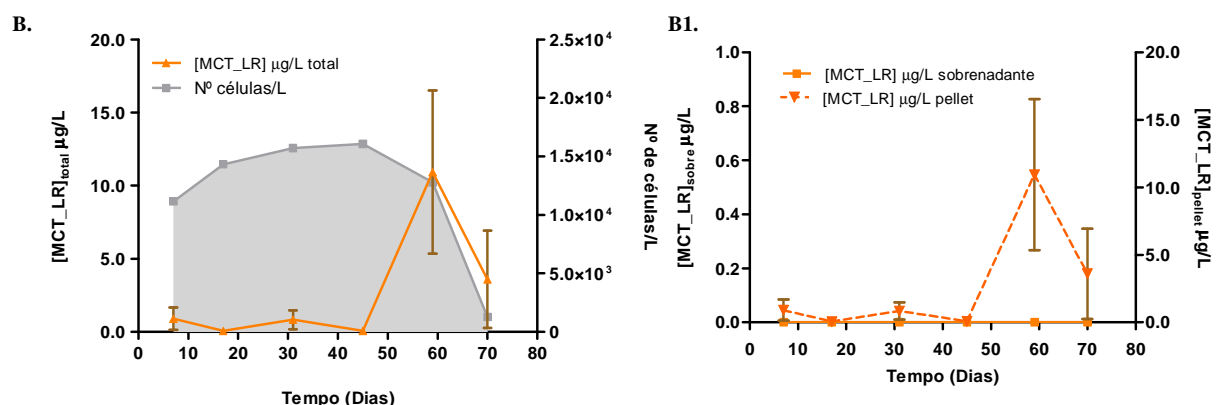


Figura 6.13 – Quantidade de MCT-LR total produzida e libertada por *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) e por *M. aeruginosa* PCC 7005 (B) ao longo de 70 dias de cultivo. e Quantidade de MCT-LR determinada no sobrenadante e no *pellet* (A1 e B1). Para comparação, apresenta-se também a d.c. estimada ao longo dos 70 dias de cultivo. Os valores representado correspondem aos valores médios (n=3) com os respetivos erros padrão, verificando-se em algumas situações a omissão dos erros padrão, visto serem ínfimos.

Observando a figura acima é possível verificar que a quantidade de MCT-LR total estimada para *M. aeruginosa* PCC 7820 aumenta ao longo do tempo de cultivo variando entre 0,09 mg/L e 7,17 mg/L. Estes valores de MCT-LR resultam da soma das quantidades de MCT-LR do sobrenadante e do *pellet*. No entanto, é claro que a quantidade de MCT-LR é fundamentalmente devida à quantidade presente no sobrenadante, por esta representar mais de 99% da quantidade total estimada.

Relativamente a *M. aeruginosa* PCC 7005, a quantidade de MCT-LR total estimada também aumenta ao longo do tempo de cultivo, variando entre 0,90 µg/L e 3,6 µg/L. Estes valores resultam sobretudo da quantidade detetada no *pellet*, uma vez que no sobrenadante não foi detetado qualquer quantidade de MCT-LR.

6.4.2. Monitorização da produção e libertação de microcistinas após infeção viral com cianófagos

A produção e libertação de microcistinas pelas estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* infetadas com cianófagos Ma-LEZ01 foram monitorizadas por LC-ESI-MS/MS antes da infeção viral e 31 dias depois da infeção viral. De notar que no sentido de facilitar a propagação dos vírus infetantes nas culturas se iniciou a experiência com uma elevada d.c., obtida por repicagem das culturas da experiência anterior, iniciando-se a infeção e respetiva monitorização ao 8º dia deste novo cultivo.

6.4.2.1. Monitorização do desenvolvimento de *M. aeruginosa*

O desenvolvimento das duas estirpes de *M. aeruginosa* mantidas nos frascos de poliestireno foi também monitorizado por d.o.. A monitorização foi efetuada através da leitura da d.o. de cada cultura a 680 nm, 730 nm e a 750 nm. Apresentam-se aqui apenas os resultados para a monitorização a 680 nm com correção, uma vez que, tal como sucedeu para a figura 6.6 A2 e B2, a monitorização da d.o. a 730 nm apresenta maior variabilidade entre os replicados biológicos.

A figura que se segue (6.14) ilustra, pois, a monitorização a 680 nm do desenvolvimento de culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 com e sem infeção viral por cianófagos Ma-LEZ01. Como já se referiu, são apresentados os valores médios dos triplicados de cada uma das culturas e os respetivos erros padrão.

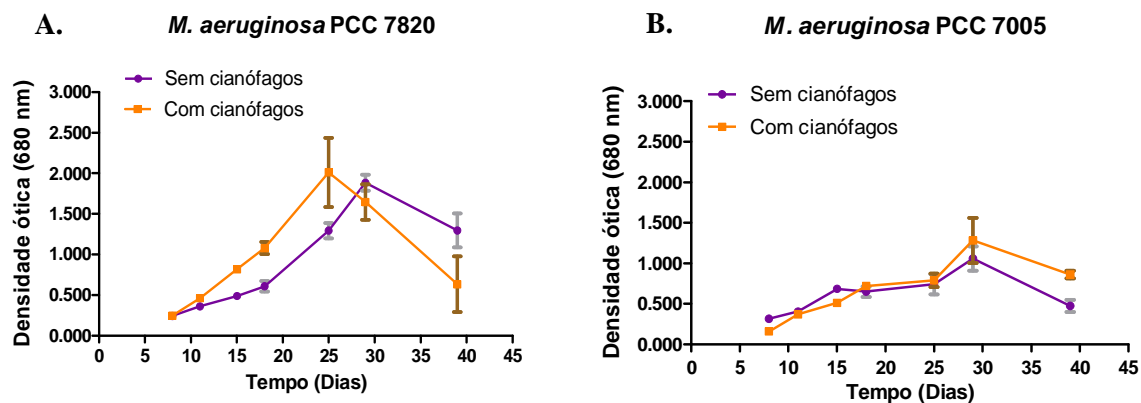


Figura 6.14 – Monitorização do crescimento a 680 nm de *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) e *M. aeruginosa* PCC 7005 (B) na presença e na ausência de cianófagos Ma-LEZ01. Estão representados os valores médios (n = 3) de d.o. e os respetivos erros padrão. Verifica-se em algumas situações a omissão dos erros padrão, visto serem ínfimos.

A monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7820 revelou que na ausência dos cianófagos Ma-LEZ01, esta estirpe cresceu gradualmente até ao 29º dia de cultivo, ainda que limitada, mas que na presença destes virus o seu crescimento terminou 5 dias antes, como verificado no gráfico da figura 6.16 A). As culturas infetadas só revelaram efeitos de lise acentuada após 21 dias decorridos desde a infeção viral, como pode ser observado através da diminuição dos valores de d.o. medidos a 680 nm.

Ao observar a figura 6.14 B) é possível também verificar que, quer na ausência quer na presença de cianófagos, a estirpe PCC 7005 cresceu lentamente até ao 29º dia de cultivo. À semelhança do que se sucedeu para a estirpe PCC 7820, este crescimento pareceu estar limitado, registando-se até alguns momentos de estagnação. Os efeitos de lise celular também só se verificaram 21 dias após a infeção viral (ao 29º dia de cultivo), sendo registados menores valores de d.o. a 680 nm para as culturas sem cianófagos.

Na tabela 6.7 indicam-se as médias e os respectivos erros padrão das taxas de crescimento e dos tempos de duplicação calculados com base nos valores de d.o. medidos a 680 nm para cada uma das culturas de *M. aeruginosa* em estudo. Para a estirpe PCC 7820, estes parâmetros biológicos foram calculados entre o 18º dia de cultivo (10 dias depois da infeção) e o 25º dia de cultivo (17 dias depois da infeção) e para a estirpe PCC 7005 entre 8º dia de cultivo (1º dia de infeção) e o 15º dia de cultivo (8 dias depois da infeção).

Tabela 6.7 – Taxas de crescimento celular e tempos de duplicação de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005 na ausência e na presença de cianófagos Ma-LEZ01.

Estirpe		Taxa específica de crescimento celular (dias ⁻¹)	Tempo de duplicação (dias)
		(Média, n=3 ± Erro padrão)	(Média, n=3 ± Erro padrão)
<i>M. aeruginosa</i> PCC 7820	Sem cianófagos	0,10 ± 0,02	7,0 ± 2,0
	Com cianófagos	0,08 ± 0,04	12,0 ± 4,0
<i>M. aeruginosa</i> PCC 7005	Sem cianófagos	0,11 ± 0,01	7,0 ± 1,0
	Com cianófagos	0,18 ± 0,05	4,0 ± 1,0

Observando a tabela é possível verificar que a presença de cianófagos parece influenciar negativamente o crescimento da estirpe PCC 7820, visto que esta na presença destes vírus revela quase o dobro do tempo de duplicação. Situação esta, que não se confirma para a estirpe PCC 7005 de *M. aeruginosa*. No entanto, o teste de hipótese *t student* aplicado aos dados emparelhados das curvas de crescimento com e sem cianófagos, revela que não são significativamente diferentes entre si, visto que $t_{\text{estatístico}}$ (Stat t) mostra ser inferior ao $t_{\text{crítico uni-caudal}}$, como é possível verificar na tabela 6.8.

Tabela 6.8 – Teste *t student* de hipóteses aplicado a dados emparelhados relativos aos tempos de duplicação calculados para *M. aeruginosa* PCC 7820 e para *M. aeruginosa* PCC 7005 na ausência e na presença de cianófagos Ma-LEZ01.

Estirpe	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7820		<i>M. aeruginosa</i> PCC 7005	
	Sem cianófagos	Com cianófagos	Sem cianófagos	Com cianófagos
Média	7,0279	11,64424	6,4591	4,4362
Variância	8,4695	41,37106	2,2254	2,9094
Observações	3	3	3	3
Correlação de Pearson	0,5970		0,349184	
Hipótese de diferença de média	0		0	
gl	2		2	
Stat t	-1,5250		1,9121	
P(T<=t) uni-caudal	0,1334		0,0980	
t crítico uni-caudal	2,9200		2,9200	
P(T<=t) bi-caudal	0,2668		0,1960	
t crítico bi-caudal	4,3027		4,3027	

Dado que para *M. aeruginosa* PCC 7820 foi possível anteriormente estabelecer uma correlação forte entre os valores de d.o. medidos a 680 nm e os de d.c., interpolou-se o seu número de células/L de acordo com a função $y = 2,4 \times 10^5 x - 2,2 \times 10^4$. Tornou-se necessária esta aproximação de valores, dada a morosidade do processo de contagem do número de células em microscopia de epifluorescência. Na tabela 6.9 apresentam-se, então os valores interpolados de d.c. de *M. aeruginosa* PCC 7820 na ausência e na presença de cianófitos Ma-LEZ01 ao longo da infecção.

Tabela 6.9 – Interpolação dos valores de d.c. de *M. aeruginosa* PCC 7820 na ausência e na presença de cianófitos Ma-LEZ01 ao longo da infecção.

<i>M. aeruginosa</i> PCC 7820				
Tempo depois da infecção (Dias)	Sem cianófitos		Com cianófitos	
	D.o. a 680 nm (Média, n=3 ± Erro padrão)	Extrapolação do N° de Células/L	D.o. a 680 nm (Média, n=3 ± Erro padrão)	Extrapolação do N° de Células/L
8	0,244 ± 0,009	1,33E+06 - 1,44E+06	0,245 ± 0,013	1,33E+06 - 1,44E+06
11	0,361 ± 0,016	1,97E+06 - 2,08E+06	0,461 ± 0,010	2,61E+06 - 2,72E+06
15	0,488 ± 0,012	2,72E+06 - 2,83E+06	0,819 ± 0,025	4,75E+06 - 4,86E+06
18	0,608 ± 0,065	3,47E+06 - 3,57E+06	1,079 ± 0,074	6,36E+06 - 6,46E+06
25	1,293 ± 0,095	7,64E+06 - 7,75E+06	2,011 ± 0,426	1,19E+07 - 1,20E+07
29	1,884 ± 0,098	1,12E+07 - 1,13E+07	1,647 ± 0,221	9,78E+06 - 9,88E+06
39	1,296 ± 0,201	7,64E+06 - 7,75E+06	0,634 ± 0,342	3,68E+06 - 3,79E+06

6.4.2.2. Produção e libertação de microcistinas

A produção e a libertação de microcistinas pelas culturas de *M. aeruginosa* com e sem infecção por cianófitos Ma-LEZ01 foram monitorizadas por LC-ESI-MS/MS. Nas tabelas 6.0 e 6.11 estão representados os cromatogramas e os espectros de MS/MS das variantes de microcistinas detetadas no sobrenadante (com uma diluição de 1:10, v/v) e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 no início da infecção viral (ao 8º dia de cultivo) e 31 dias após da infecção viral (ao 39º dia de cultivo). Para *M. aeruginosa* PCC 7005 estes tipos de dados estão representados nas tabelas 6.12 e 6.13. Todos os cromatogramas e espectros de MS/MS apresentados são referentes a um só replicado,

visto que os restantes apresentaram resultados muito semelhantes, tornando-se redundante a sua apresentação.

Observando as tabelas abaixo descritas, é possível verificar que a variante LR das microcistinas foi sempre detetada nas culturas PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa*, quer na ausência quer na presença de cianófagos Ma-LEZ01, com exceção do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005 no início da infeção viral. Este facto foi comprovado por comparação do espectro MS/MS obtido com o padrão de MCT-MIX 50 µg/L. Uma vez que só se detetou a variante LR, constata-se, então, que a infeção viral com cianófagos Ma-LEZ01 não desencadeou a produção de outras variantes de microcistinas.

Uma vez identificada a variante LR como sendo a variante produzida e libertada pelas culturas *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* PCC 7005 antes da infeção viral e 31 dias depois da infeção viral, procedeu-se à sua quantificação. As figuras 6.15 e 6.16 revelam a quantidade total de MCT-LR produzida e libertada pelas estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* na ausência e na presença de infeção viral. As quantidades de MCT-LR descritas nas figuras resultam da média dos triplicados biológicos tanto para os sobrenadantes como para os *pellets*. Os erros padrão associados estão também representados, sempre que se tornaram apreciáveis.

Tabela 6.10 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7820 (diluído de 1:10, v/v) antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos.

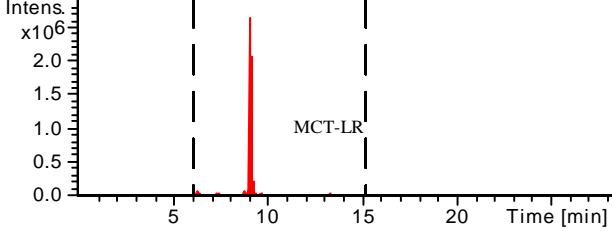
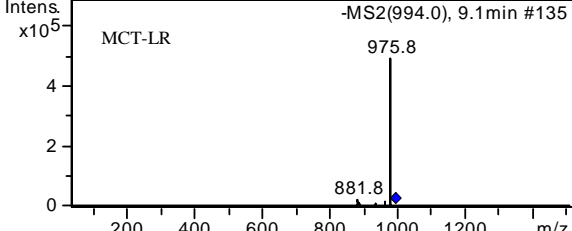
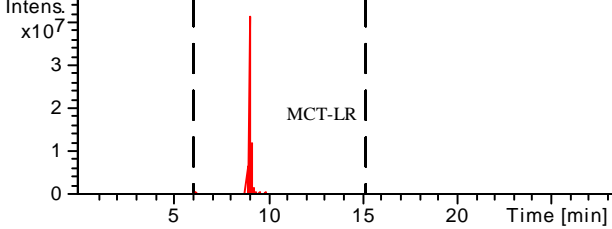
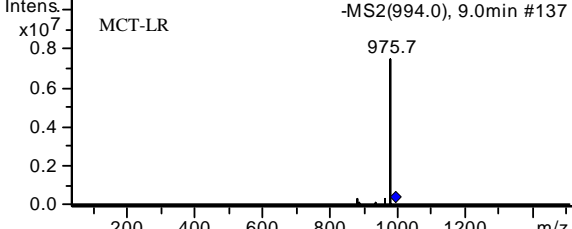
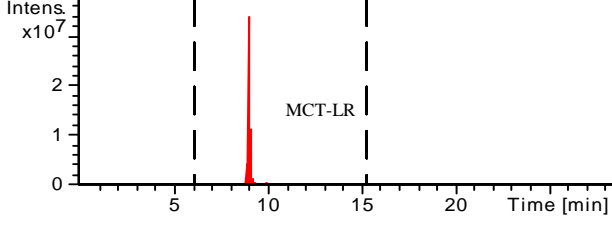
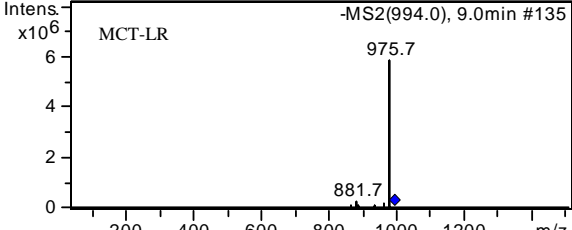
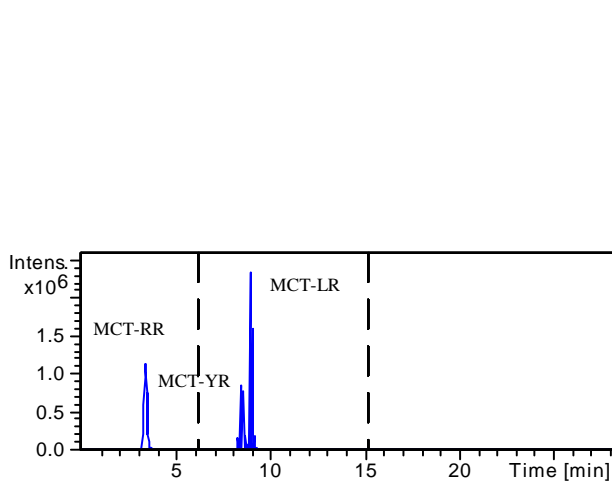
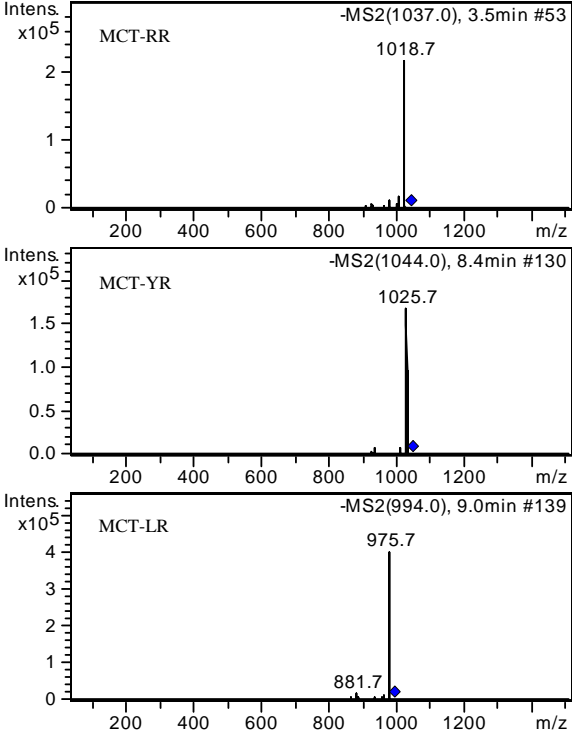
Tempo depois da infecção (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
0		
31 Sem Cianófagos		
31 Com Cianófagos		
Padrão MCT-MIX 500 µg/L		

Tabela 6.11 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos.

Tempo depois da infecção (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
0		
31 Sem Cianófagos		
31 Com Cianófagos		
Padrão MCT- MIX 50 µg/L		

Tabela 6.12 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do sobrenadante de *M. aeruginosa* PCC 7005 antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófitos.

Tempo depois da infecção (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
0		
31 Sem Cianófitos		
31 Com Cianófitos		
Padrão MCT-MIX 50 µg/L		

Tabela 6.13 – Cromatogramas e espectros de MS/MS do *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 antes e 31 dias depois da infecção viral com cianófagos.

Tempo depois da infecção (Dias)	Cromatograma	Espectro de MS/MS das variantes de MCT detetadas
0		
31 Sem Cianófagos		
31 Com Cianófagos		
Padrão MCT-MIX 50 µg/L		

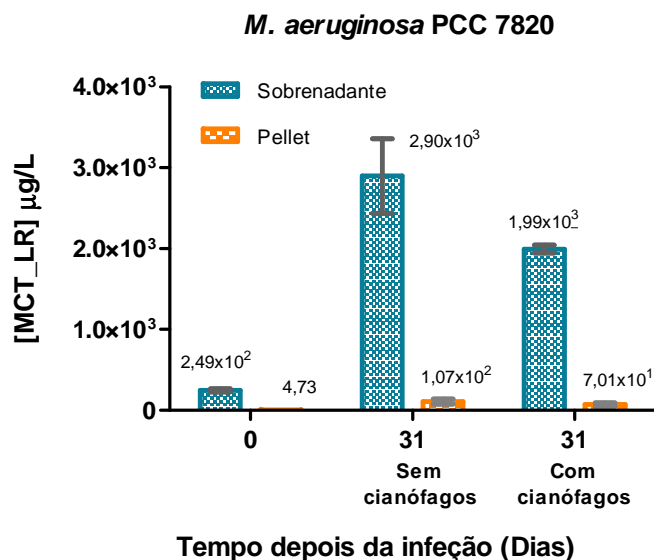


Figura 6.15 – Quantidade de MCT-LR presente no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 na ausência e na presença de cianófagos. A infecção viral foi monitorizada antes da infecção e 31 dias depois da infecção. Estão representados os valores médios (n=3) e os respectivos erros padrão verificando-se em algumas situações a sonegação dos erros padrão, visto serem ínfimos.

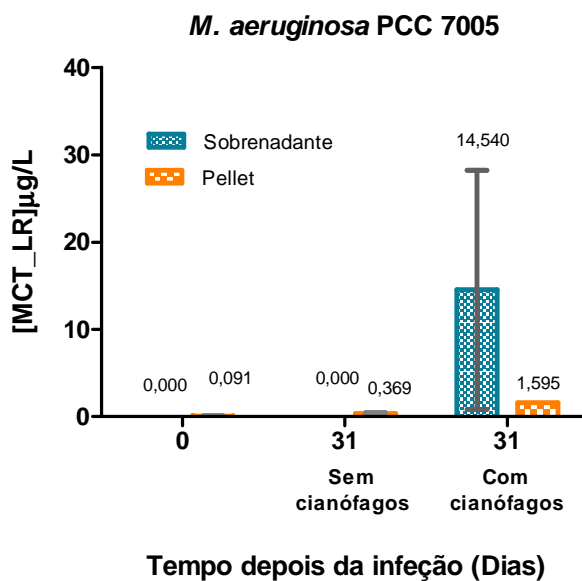


Figura 6.16 – Quantidade de MCT-LR presente no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 na ausência e na presença de cianófagos. A infecção viral foi monitorizada antes da infecção e 31 dias depois da infecção. Estão representados os valores médios (n=3) e os respectivos erros padrão, verificando-se em algumas situações a sonegação dos erros padrão, visto serem ínfimos.

Observando a figura 6.15 verifica-se que a quantidade de MCT-LR produzida e libertada por *M. aeruginosa* PCC 7820 na ausência de cianófagos Ma-LEZ01 aumentou ao longo do tempo. Sendo que no início da monitorização, a quantidade desta variante detetada no sobrenadante foi de 250 µg/L e 4,7 µg/L no *pellet*, registando-se no fim da monitorização um aumento destas quantidades em cerca de 12 vezes para o sobrenadante e de 20 vezes para o *pellet*. Na presença de cianófagos, a quantidade de MCT-LR produzida e libertada por esta estirpe, também aumentou ao longo do tempo, contudo, no fim da monitorização a quantidade determinada no sobrenadante foi de 2000 µg/L e de 7,0 µg/L no *pellet*, revelando então ser inferior à determinada na ausência de cianófagos.

Ao observar a figura 6.16 verifica-se que na ausência de cianófagos, a variante LR só foi quantificada no *pellet* da estirpe PCC 7005, não tendo sido então detetada no sobrenadante. No início da monitorização, a quantidade de MCT-LR no *pellet* era aproximadamente de 0,09 µg/L, quadruplicando no final da monitorização para uma concentração de 0,37 µg/L. Este aumento só se verificou nos replicados referentes ao *pellet*, não tendo o sobrenadante e o aumento do tempo de cultivo qualquer influência considerável na produção e libertação de MCT-LR por PCC 7005 na ausência de cianófagos. Na presença destes, no fim da monitorização, detetou-se produção e libertação de MCT-LR por PCC 7005. Este facto verificou-se quer no *pellet* quer no sobrenadante desta estirpe, no entanto, no sobrenadante verificou-se um aumento mais nítido do que no *pellet*, pois detetou-se MCT-LR em dois replicados enquanto que no *pellet* só se detectou no replicado em que não se detectou qualquer quantidade desta variante no seu sobrenadante, justificando assim o tamanho da barra do erro padrão apresentada na figura 6.16. Ao contrário do que se constatou com as culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820, a produção e libertação de MCT-LR por PCC 7005, de um modo geral, foi afetada pela introdução de cianófagos Ma-LEZ01, verificando-se um aumento em três ordens de grandeza na concentração de MCT-LR detetada no sobrenadante e de uma ordem de grandeza para o *pellet*.

Contudo, um teste de hipóteses *t student* para amostras emparelhadas por médias aplicado à quantidade total de MCT-LR estimada no fim da monitorização, revela que o $t_{\text{estatístico}}$ (*Stat t*) mostra ser inferior ao $t_{\text{crítico uni-caudal}}$ mostra ser inferior ao $t_{\text{crítico uni-caudal}}$, pelo que é possível dizer que estes não são significativamente diferentes entre si. Assim, há indícios que a quantidade de MCT-LR produzida e libertada pelas

culturas de *M.aeruginosa* em estudo não são influenciados pela presença dos cianófagos Ma-LEZ01, como é possível constatar na tabela 6.14.

Tabela 6.14 – Teste de hipóteses *t student* aplicado à quantidade de MCT-LR total produzida e libertada, no fim da monitorização, por *M. aeruginosa* PCC 7820 e por *M. aeruginosa* PCC 7005 quer na ausência quer na presença de cianófagos Ma-LEZ01.

Estirpe	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7820		<i>M. aeruginosa</i> PCC 7005	
	Sem cianófagos	Com cianófagos	Sem cianófagos	Com cianófagos
Média	2039,6	2064,1	0,3687	10,2
Variância	3170211,7	10722,8	0,0488	243,8
Observações	3	3	3	3
Correlação de Pearson	0,9486		0,4629	
Hipótese de diferença de média	0		0	
gl	2		2	
Stat t	-0,0252		-1,1004	
P(T<=t) uni-caudal	0,4911		0,1930	
t crítico uni-caudal	2,9200		2,9200	
P(T<=t) bi-caudal	0,9822		0,3859	
t crítico bi-caudal	4,3027		4,3027	

6.5. Discussão

6.5.1. Monitorização do crescimento das culturas de PCC7820 e PCC7005

Numa cultura de cianobactérias inoculada num meio de crescimento nutritivo e mantida sob condições ambientais ideais, as células viáveis aumentam de dimensão, acabando por se dividir para dar origem a novas células. Em situações de elevada densidade celular, a viabilidade de uma cultura cianobacteriana pode ficar condicionada, em resultado da aceleração do seu crescimento celular e esgotamento nutricional do meio de cultivo. Além disso, as culturas de cianobactérias são particularmente fastidiosas por o seu crescimento ser dependente da densidade, tornando-se necessário o cultivo primeiramente em pequenos volumes, com progressivo aumento de escala, o que foi feito por repicagem sucessiva numa porção de 1:20,

v/v. Como se pôde verificar neste trabalho experimental as culturas de laboratório da espécie *M. aeruginosa* não fogem a esta regra.

A monitorização inicial do crescimento das estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* decorreu durante 70 dias, não tendo este sido, tempo suficiente para que se revelassem todas as fases características do crescimento de uma cultura microbiana. *M. aeruginosa* PCC 7820 permaneceu nas fases de latência e aceleração durante 40 dias, entrando depois em fase exponencial, onde permaneceu até ao último dia da monitorização, sem que se tenha verificado uma fase estacionária ou de declínio na curva de crescimento. Contrariamente, *M. aeruginosa* PCC 7005, parece não ter-se adaptado ao meio BG11 e às condições de temperatura e intensidade de radiação a que foi exposta, nunca alcançando a fase exponencial e as restantes fases da curva de crescimento, ainda que se tenha verificado senescência celular. O envelhecimento desta cultura de cianobactérias ditou o fim da monitorização do crescimento das culturas de *M. aeruginosa* em estudo após 70 dias de cultivo. Estes resultados sugeriram desde logo diferenças significativas entre as estirpes de *M. aeruginosa* em estudo. Coloca-se ainda a questão de saber se prolongando a experiência de monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7820 durante mais tempo, se verificariam as restantes fases características de uma curva de crescimento celular. Com efeito o prolongamento durante 139 dias do cultivo destas estirpes, por repicagem para a realização das experiências com infeção por cianófagos, revelou serem necessários mais de 90 dias para que se revelassem todas as fases características do crescimento de uma cultura microbiana.

O elevado número de dias que foram necessários para que as culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820 entrassem em fase exponencial de crescimento revela que, embora permanecessem fisiologicamente ativas, não mostraram multiplicação celular relevante, estando o seu metabolismo energético dirigido certamente para a síntese de novas proteínas e enzimas fundamentais ao seu desenvolvimento. De facto, foi possível detetar um aumento substancial de 15% nas suas dimensões celulares ao longo deste período de adaptação. Embora se tenha detetado um aumento de 13% nas dimensões celulares de *M. aeruginosa* PCC 7005, o fraco crescimento destas parece indicar que algo no sistema de cultivo estava a limitar o seu crescimento, impossibilitando a entrada em fase exponencial de crescimento. Poderiam explicar este comportamento diversas condicionantes, desde: (i) a presença de uma elevada quantidade de células não-viáveis no inóculo, (ii) a ausência de nutrientes essenciais ou o rápido esgotamento de qualquer

um dos nutrientes fornecidos pelo meio de cultivo BG11, (iii) a hipótese de PCC 7005 ser auxotrófica para algum precursor orgânico, como por exemplo, aminoácidos, vitaminas, açúcares ou lípidos, que em consórcio com outras estirpes lhe seja fornecido, mas que em cultura quase axénica esteja apenas disponível na mucilagem que acompanha o inóculo, (iv) pressão competitiva pelos nutrientes disponíveis com bactérias constituintes da microbiota acompanhante, uma vez que embora unialgais, as culturas em estudo não estavam axénicas, (v) a eventual depleção em dióxido de carbono, (vi) flutuações acidentais nas condições de temperatura e/ou intensidade de radiação, (vii) proximidade relativamente a fontes de temperatura e/ou de radiação. Estas conjecturas poderiam ter sido investigados, por exemplo, pela adição em separado de pequenas quantidades das soluções *stock* que constituem o meio BG11, ou cultivo desta estirpe em meio 553 (Meio BG11 complementado com NaNO_3 e NaHCO_3), meio de cultivo sugerido pela PCC. No entanto, este tipo de ensaio, não teria sido possível de efectuar em tempo útil.

Considera-se, no entanto, como explicação mais coerente a possibilidade de a estirpe PCC 7005 ser portadora de uma infeção viral crónica ou pseudolisogénica, uma vez que deixadas a incubar por mais de um ano, nas mesmas condições e sem qualquer repicagem ou renovação do meio, as culturas de PCC 7005 atingiram periodicamente grandes densidades, para tornarem a entrar em senescência, da qual recuperaram de novo.

A monitorização dos cultivos foi registrada de forma rápida por leitura da d.o. a 680 nm, que revelou claramente valores de d.o. maiores que os da monitorização do crescimento a 730 nm, confirmando a importância relativa dos pigmentos fotossintéticos assim detetados. Com efeito, apesar de as ficocianinas serem pigmentos fotossintéticos exclusivos das cianobactérias, têm reconhecidamente apenas um papel acessório na fotossíntese. Um aumento relativo da d.o. a 730 nm comparativamente à d.o. a 680 nm poderia indicar limitações do fator luz para o crescimento, o que não se verificou para qualquer das culturas. Como referenciado acima, as culturas de *M. aeruginosa* utilizadas neste estudo, apesar de unialgais, não estavam axénicas, facto este que poderia contribuir para que a presença de outras substâncias com absorvância a 680 nm, p. ex. as ligações peptídicas, provocassem a sobrevalorização do valor de d.o. registado. Esta preocupação motivou a correção destes valores com os obtidos por leitura da d.o. a 750nm, minimizando o impacto da turvação gerada pelo crescimento celular de outras bactérias.

A monitorização do crescimento de uma cultura microbiana por d.o., é frequentemente utilizada dada a rapidez de obtenção de resultados, contudo é um método de avaliação indireto. A impossibilidade de distinção entre células viáveis e células mortas, inerente a este método suscitou que monitorização do crescimento das culturas de cianobactérias em estudo fosse também efetuada por determinação da d.c. em microscopia de epifluorescência. Neste método de monitorização de crescimento celular, a utilização de um fluorocromo como a proflavina, constitui sem dúvida uma vantagem sobre os métodos da d.o., uma vez que este fluorocromo ao intercalar-se com o DNA cianobacteriano emite fluorescência e denuncia as células vivas. Para além disso, tratando-se de culturas unialgais com capacidade de autofluorescência, a monitorização do crescimento destas estirpes por este método foi claramente facilitada.

A monitorização do crescimento de *M. aeruginosa* PCC 7820 por densidade celular revelou sempre, ao longo do tempo, um aumento do número de células/L e do seu biovolume, com uma ligeira inflexão ao 45º dia de cultivo. Este facto pode ser fundamentado por uma eventual homogeneização incorreta dos replicados das culturas aquando o processo de recolha da amostra para filtração, visto que por d.o ao 45 dia de cultivo, esta estirpe se encontrava em fase exponencial de crescimento. Não se coloca aqui a questão de que a quantidade de proflavina adicionada para visualização microscópica de epifluorescência tivesse sido insuficiente, de forma a não corar todas as células presentes na preparação, pois este argumento não é plausível, dado que as cianobactérias autofluorescem podendo ser visíveis sem qualquer fluorocromo.

Em conformidade com os resultados obtidos por d.o., a contagem do número de células de *M. aeruginosa* PCC 7005 e o cálculo do seu biovolume revelaram que esta estirpe esteve limitada em termos de crescimento, registando-se uma diminuição do número de células e do seu biovolume a partir do 32º dia de cultivo, embora tenham permanecido fisiologicamente activas, como comprovado pelo aumento das suas dimensões celulares registradas ao longo do tempo.

A taxa específica de crescimento celular e o tempo de duplicação são dois parâmetros biológicos indicadores da evolução do crescimento de uma cultura microbiana, de acordo com as condições ambientais a que essas foram sujeitas, assim como, de eventuais alterações que tenham ocorrido de forma a modificar o meio de cultura. De facto, os extensos tempos de duplicação obtidos nos três métodos de monitorização do crescimento de PCC 7820 parecem indicar que as condições de cultivo não foram as ideais para esta estirpe, uma vez que em ensaios anteriores no

laboratório, foi possível obter tempos de duplicação de 4,5 dias. De resto, como indicado na Tabela 6.7 em experiências posteriores os tempos de duplicação variaram entre 4 e 12 dias.

Embora os valores de d.o. e d.c ditem tempos de duplicação extensos, as regressões lineares efetuadas revelam que existe forte correlação entre eles, quando estes traduzem um crescimento de PCC 7820 em fase exponencial. De facto, a quase perfeita correlação entre os valores de d.o. corrigidos e a densidade celular na fase de crescimento equilibrado permitiu a substituição da monitorização da d.c. em microscopia de epifluorescência pela monitorização da d.o. nas experiências seguintes, já que o processo de contagem do número de células e de avaliação das suas dimensões ao microscópio se torna moroso e extenuante.

6.5.2. Monitorização da produção de microcistinas em cultura

A monitorização da produção e libertação de microcistinas pelas estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* em LC-ESI-MS/MS revelou que das três variantes de microcistinas em estudo, só a variante LR foi detetada ao longo dos 70 dias de cultivo.

A variante MCT-LR foi sempre detetada no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7820 desde o primeiro tempo de monitorização até ao último, registando-se um aumento gradual da quantidade detetada, em virtude do aumento temporal da concentração de MCT-LR presente na amostra. A deteção desta variante no *pellet* de PCC 7820, sugere assim a ideia que a eficiência do processo de lise celular durante a extração para esta estirpe não foi de 100%. O processo de lise celular de PCC 7005 parece também não ter sido eficaz, uma vez que foi detetado MCT-LR no *pellet* desta estirpe, sendo esta variante detetada com uma elevada intensidade de sinal ($1,30 \times 10^7$) ao 59º dia de cultivo. No sobrenadante de PCC 7005, esta variante de microcistina não foi detetada ao longo dos 70 dias em que decorreu a monitorização, com exceção do 45º dia e do 70º dia de cultivo onde se detetou quantidades vestigiais de MCT-LR. Este facto pode ser justificado se se tiver em conta que nos tempos de monitorização antecedentes, houve declínio dos valores de d.o. registados, o que significa que poderá ter ocorrido morte celular com libertação de microcistinas.

A detecção desta variante no sobrenadante e no *pellet* de *M. aeruginosa* PCC 7005 foi surpreendente, uma vez que esta estirpe é comercializada como uma estirpe de cianobactérias não produtora de microcistinas. Estirpes de *M. aeruginosa* não produtoras de microcistinas são caracterizadas pela ausência do gene *mcyG_k*. Este gene uma vez ausente não permite a formação do hidrocarboneto aromático que confere toxicidade ao grupo ADDA. Assim, a ausência do gene *mcyG_k* nas culturas de *M. aeruginosa* PCC 7005 parece não se verificar, visto ter sido detetada por LC-ESI-MS/MS a variante LR, embora em quantidades vestigiais. A ausência de produção de MCT-LR dever-se-ia então a alguma inibição deste gene, inibição que não terá sido 100% eficaz. A detecção destas pequenas quantidades poderia também resultar de alguma incorporação genómica de um ciclo viral lisogénico ou pseudolisogénico. A sensibilidade e a especificidade do método analítico utilizado nas culturas desta estirpe parece ter contribuído na detecção de MCT-LR nas culturas de *M. aeruginosa* PCC 7005, pois os métodos de detecção e quantificação usados até então para a detecção de eventuais cianotoxinas produzidas por esta estirpe caracterizam-se pela sua menor sensibilidade.

Poder-se-ia conjecturar-se que o composto com razão massa/carga 976 detetado por LC-ESI-MS/MS correspondia de facto a MCT-LR, no entanto, esta hipótese não é válida dada a sensibilidade e especificidade deste método. A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massa com detecção massa/massa permite distinguir claramente compostos uns dos outros, mesmo que estes absorvam radiação no mesmo comprimento de onda e eventualmente possuam o mesmo tempo de retenção, já que dificilmente terão a mesma razão massa/carga e o mesmo padrão de fragmentação.

De forma a ultrapassar a já referida baixa eficiência do processo de lise celular das estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa*, os processos de lise celular definidos no método de **Mekebri, A., et al (2009)** poderão ser complementados com um processo antecedente de filtração por vácuo, como alguns autores procedem. Coloca-se, então, a questão se o processo de lise celular, assim como o de extração destas cianotoxinas fosse outro que revelasse maior eficiência, se a quantidade de microcistina_LR detetada não seria maior.

6.5.3. Monitorização do impacto da infeção por cianófagos na produção e libertação de microcistinas

A produção e a libertação de microcistinas após infeção viral de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005 com cianófagos Ma-LEZ01, foram monitorizadas em culturas em frascos de poliestireno com tampa ventilada. A escolha de frascos de cultura de tecidos com tampa ventilada surgiu da necessidade de estabelecimento e manutenção das condições de cultivo axénicas. O estabelecimento e a manutenção destas condições mostraram ser imperativos, porque se objetivava compreender a influência de cianófagos na produção e libertação de microcistinas sem que o seu efeito fosse eventualmente mascarado por outros fatores biológicos.

A presença de uma membrana microporosa com características hidrofóbicas nas tampas dos frascos permitiu que essas condições fossem otimizadas e preservadas. Estas membranas hidrofóbicas permitiram trocas gasosas estéreis entre as culturas de *M. aeruginosa* e o exterior, sem risco de contaminação para as próprias culturas assim como para o ambiente em redor no fitoclima. Altas resistências e capacidade de transferência de luminosidade com distorção mínima de luz, também foram características preponderantes na escolha dos frascos de cultura como reservatório de cultivo das estipes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa*. Estas características associadas a uma área superficial retangular apreciável permitiu certamente uma melhor distribuição de luz pelas culturas do que em balões Erlenmeyers, isto porque estes apresentam pouca área superficial e formato cónico, dificultando a passagem de luz, podendo ter contribuído para as extensas fases de latência e de aceleração na primeira experiência de monitorização do crescimento. De facto a simples alteração dos frascos de cultivo permitiu diminuir para metade ou menos o tempo de duplicação registado (compare-se valores entre as tabelas 6.2 e 6.7). De resto, a utilização de frascos de poliestireno no cultivo e manuseamento de amostras com microcistinas têm sido recomendados por **Codd, G. & Bell, G., 1996**, desde que se verificou uma associação entre MCT-LR e superfícies de policloreto de vinil (PVC - *polyvinyl chloride*). Estes autores também recomendam a utilização de recipientes de vidro. No entanto, não se utilizou este tipo de recipientes na monitorização da produção e libertação de microcistinas após infeção viral, uma vez que se reconhece existir adsorção ao vidro

borosilicatado de outros bacteriófago o que dificultaria o processo de infecção viral (Rossi, P., 1999).

As culturas de *M. aeruginosa* PCC 7820, na ausência de cianófagos Ma-LEZ01, revelaram crescimento gradual até ao 29º dia de cultivo, registando-se posteriormente efeitos de lise celular acentuada. Graficamente, são observadas as fases de latência, aceleração, exponencial e de declínio celular características de uma curva de crescimento microbiano. Na presença destes vírus, estas fases são também reveladas para PCC 7820, sendo a fase de declínio celular assinalada a partir 21º dia de cultivo. Em termos gráficos, estes dados revelam que a presença de cianófagos Ma-LEZ01 parece proporcionar a lise celular, o que foi verificado pela recuperação de unidades formadoras de placas fágicas (PFU) em ensaios de deteção dos cianófagos (dados de Mesquita S., tese de doutoramento em preparação). Este efeito, verificou-se também quando as culturas de PCC 7005 foram infetadas com Ma-LEZ01. Embora, se tenha detetado a fase de declínio celular, a fase de latência de ambas as culturas de PCC 7005 foi pouco evidente, sendo o crescimento desta estirpe limitado, especialmente, o das culturas sem infecção viral. Facto este que sugere que a infecção viral de PCC 7005 por cianófagos Ma-LEZ01 influenciou positivamente o crescimento desta estirpe, o qual pode ser confirmado com a redução dos seus tempos de duplicação obtidos. Os tempos de duplicação obtidos para PCC 7820 na presença de cianófagos mostram-se superiores aos obtidos na ausência destes vírus, contrariando o sucedido para PCC 7005. No entanto, o tratamento estatístico efectuado através da realização de testes de hipótese *t student* revela que estas diferenças nos tempos de duplicação em resultado da presença de cianófagos Ma-LEZ01 não são estatisticamente significativas.

Independentemente do impacto da presença de cianófagos nas culturas de cianobactérias em estudo não se revelar estatisticamente significativo, colocou-se a questão de saber se um aumento da multiplicidade de infecção (MOI- *Multiplicity of infection*) dos cianófagos inoculados poderia gerar diferenças significativas entre o crescimento das culturas na ausência e presença de cianófagos. Daí terem-se realizado mais 2 conjuntos de experiências, um em que se aumentava a MOI e outro em que se transferiu sobrenadante de uma cultura não infetada da estirpe produtora PCC 7820 para a estirpe «não produtora» PCC 7005. Nestes ensaios não se detetaram PFU nos controles, mas deteram-se PFU em todos os replicados infetados ou transfetados.

A densidade celular extrapolada para *M. aeruginosa* PCC 7820 revela que, quer na ausência quer na presença de cianófagos Ma-LEZ01, o número de células desta

estirpe por litro aumentou ao longo do tempo, verificando-se graficamente uma ligeira superioridade no número de células nas culturas infetadas em relação ao número de células de PCC 7820 na ausência destes vírus. As diferenças não são, no entanto, estatisticamente significativas. A deteção de PFU a partir das culturas infetadas e a ausência de recuperação das mesmas a partir das culturas sem Ma-LEZ01 confirmam as diferenças em termos de presença e ausência de cianófagos, apesar das d.o. corresponderem a d.c. da mesma ordem de grandeza (10^6), levantando a questão de se investigar se Ma-LEZ01 é para PCC7820 um fago lisogénico ou pseudolisogénico.

À semelhança do que se verificou na monitorização da produção e libertação de microcistinas ao longo de 70 dias de cultivo, os resultados desta infeção, mostram que só a variante LR foi produzida e libertada em função da lise celular de *M. aeruginosa* PCC 7820 e de *M. aeruginosa* PCC 7005 desencadeada por cianófagos Ma-LEZ01.

A representação gráfica da quantidade total de MCT-LR estimada para *M. aeruginosa* PCC 7820 na presença de cianófagos, sugere que estes vírus não influenciam a produção e libertação de microcistinas em PCC7820. Assim, mesmo que Ma-LEZ01 seja pseudolisogénico para PCC7820, a sua eventual integração no genoma desta estirpe não terá alterado a transcrição dos genes que codificam para a MCT-LR. Não se confirmou o desenvolvimento de um ciclo totalmente lítico em *M. aeruginosa* PCC 7820, uma vez que as 6 culturas entraram quase simultaneamente em declínio.

A representação gráfica da quantidade total de MCT-LR produzida por *M. aeruginosa* PCC 7005 na presença de cianófagos Ma-LEZ01 revela claramente a influência destes vírus na libertação de microcistinas. A infeção viral das culturas desta estirpe, desencadeou a libertação das microcistinas para o exterior, que antes da infeção haviam sido detetadas no *pellet*, ou seja, no interior das células. Neste sentido, presume-se que os cianófagos provocaram alguma lise com formação de novas partículas virais e consequente libertação de microcistinas para o sobrenadante.

No entanto, o tratamento estatístico com um teste de hipóteses *t student* aplicado a estes dados, revela que as diferenças entre as quantidades totais de MCT-LR estimadas para cada uma das estirpes no início e no fim da monitorização, não são significativamente diferentes, impedindo que se aceite a influência da presença dos cianófagos Ma-LEZ01 na produção de MCT-LR.

Capítulo VII

Considerações finais e perspectivas futuras

O trabalho experimental conducente à presente dissertação propôs-se contribuir para a compreensão de alguns processos subjacentes ao desenvolvimento de florescências tóxicas de cianobactérias, através do estudo do papel da infeção viral de culturas de *M. aeruginosa* na produção e libertação de microcistinas. Para tal foi otimizado o método analítico de análise destas cianotoxinas por LC-ESI-MS/MS. Uma vez otimizado, aplicou-se à monitorização da produção e libertação de microcistinas ao longo de 70 dias de crescimento das estirpes PCC 7820 e PCC 7005 de *M. aeruginosa* antes e depois da infeção por cianófagos Ma-LEZ01. Os resultados obtidos por LC-ESI-MS/MS, revelaram a deteção de apenas uma das variantes de microcistina em estudo, a variante LR. A deteção desta variante verificou-se ao longo dos 70 dias de crescimento das culturas de PCC 7820 e de PCC 7005. Embora, a quantidade de microcistina LR detetada para PCC 7005 seja muito menor que a detetada para PCC 7820, a deteção de qualquer variante de microcistinas não era esperada, uma vez que esta estirpe é conhecida e comercializada como sendo uma estirpe de *M. aeruginosa* não produtora de toxinas. A deteção da produção e libertação desta variante na cultura de PCC 7005 também foi verificada na presença dos cianófagos Ma-LEZ01. A presença destes vírus reverteu-se numa quantificação de MCT_LR no sobrenadante superior à sua quantificação na ausência destes cianófagos. Enquanto a presença destes cianófagos na cultura *M. aeruginosa* PCC 7820 revelou efeito pouco significativo na cultura, sem diferenças significativas ao nível da quantidade de MCT_LR detetada mostra ser inferior à da detetada na ausência de cianófagos.

Os resultados parecem sugerir a possibilidade de PCC7005 produzir MCT_LR. No entanto, a sua produção parece estar reprimida e a sua libertação ser facilitada pela lise celular provocada pelos vírus. Sem infeção viral a toxina só foi detetada no pellet constituído pelos restos celulares não lisados.

Os resultados não sugerem qualquer interferência do cianófago Ma-LEZ01 na transcrição dos genes que determinam a formação de microcistina, ainda que indiquem a possibilidade de este fago ser lisogénico ou pseudolisogénico para PCC7820.

A conclusão das experiências realizadas pela análise em LC-ESI-MS/MS das amostras recolhidas das experiências de reinfeção e transfeção poderá vir a elucidar estas questões.

Estes resultados propiciam certamente novos desenhos experimentais, cujos objetivos serão possibilitar uma melhor compreensão dos processos subjacentes ao desenvolvimento de florescências de cianobactérias e de eventuais fatores condicionantes da produção de microcistinas.

Como perspetivas futuras, pretende-se completar a monitorização da produção e libertação de microcistinas não só nas amostras já obtidas mas também nas a obter em culturas isoladas de albufeiras do Algarve. Poderá ainda ser estendida a análise à deteção de outras variantes de microcistinas já conhecidas.

O LC-ESI-MS/MS poderá ser também uma ferramenta analítica bastante útil na deteção, identificação e quantificação de novas variantes de microcistinas, eventualmente presentes em amostras de água naturais, sendo para isso necessário a introdução de outras técnicas analíticas como a ressonância magnética nuclear (RMN). A monitorização da produção e libertação de microcistinas por LC-ESI-MS/MS poderá ser complementada com outros métodos de análise, como por exemplo métodos de biologia molecular, para deteção da presença de genes específicos.

Para além disto, decerto serão importantes também para a monitorização do crescimento das cianobactérias e na análise da diversidade e estrutura da microbiota acompanhante. Esta parece ter um papel preponderante no desenvolvimento de uma cultura de cianobactérias, que permanece pouco compreendido. Em termos de investigação científica futura, a realização de um estudo mais pormenorizado sobre a relação existente entre cianobactérias, microbiota acompanhante e cianófagos, seria bastante interessante permitindo avançar mais um passo na compreensão do desenvolvimento de florescências tóxicas de cianobactérias. Seria também bastante estimulante estender este tipo de estudo a outras estirpes de cianobactérias produtoras de MCT, nomeadamente a estirpes isoladas em albufeiras do sul de Portugal, e a outros cianófagos. Este estudo poderá ser complementado, estudando outras condições de infeção, como por exemplo volume de infeção, tempo de infeção e condições de manutenção das culturas de cianobactérias infetadas.

Estudos deste tipo poderão também contribuir para elucidar o modo como as microcistinas são degradadas. No ambiente, as microcistinas são frequentemente degradadas por reações fotoquímicas resultantes da exposição à radiação solar

(Wörmer, L., *et al*, 2010) ou por ação bacteriana (Imanishi, S. *et al.*, 2005; Manage, P., *et al* 2009; Manage, P., *et al*, 2010). Sabe-se que a presença de algumas espécies de bactérias em ambientes aquáticos parece resultar na biodegradação das microcistinas (Park, H., *et al*, 2001; Ou, D., *et al*, 2005; Manage, P., *et al* 2009; Manage, P., *et al*, 2010). O estudo da microbiota acompanhante e a monitorização em LC-ESI-MS/MS de variantes e subprodutos de microcistinas poderá contribuir para uma melhor compreensão das vias envolvidas na degradação bacteriana das microcistinas. Esta ocorre através da desagregação do sistema dieno no a.a Adda, pelo que ação de hidrolases quebram a ligação peptídica Arg-Adda e proporcionam a abertura da estrutura circular das microcistinas (Imanishi, S. *et al.*, 2005)..

Capítulo VIII

Referências bibliográficas

1. **Baker, A., Goddard, V., Davy, J., Schroeder C., Adams, D. & Wilson, W., 2006;** *Identification of a diagnostic marker to detect freshwater cyanophages of filamentous cyanobacteria*; Applied And Environmental Microbiology, 72(9): 5713–5719;
2. **Barco, M., Lawton, L., Rivera, J. & Caixach, J., 2005;** *Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography*; Journal of Chromatography A, 1074: 23–30;
3. **Barksdale, L. & Arden, S., 1974;** *Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions*; Annual Review of Microbiology; 28: 265- 299;
4. **Barsanti L., Passarelli V. & Gualtieri P., 1990;** *Pigment distribution in cyanobacteria: An in vivo microspectroscopie investigation*; Experientia 46; Birkhäuser Verlag; 225-256;
5. **Becker, S., 2010;** *Biotic factors in induced defence revisited: cell aggregate formation in the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806 is triggered by spent Daphnia medium and disrupted cells*; Hydrobiologia; 644:159–168;
6. **Bruker Daltonics, 2004;** *Esquire Ion Trap Training*; Esquire service training;
7. **Codd, G. & Bell, G., 1996;** *The occurrence and fate of blue-green algae in freshwaters*, National Rivers Authority Research and Development Report 29, Her Majesty's Stationery Office, London, 30;
8. **Cumming, M., 2002;** *Evaluation of microcystin enzyme-based analytic techniques and microcystin occurrence in the metrophoenix, Arizona water supply system*; A Thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the Degree; Master of Science, Arizona State University;
9. **Dass, C., 1997;** *High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*; Chapter 33 In: Settle, F., (ed); Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry; Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey; 647-664;
10. **Dass, C., 2007;** *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*; John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey;

11. **DC 2000/60/CE**; Diretiva Comunitária 2000/60/CE do parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000 – Quadro de acção comunitária no domínio da política da água – Directiva Quadro da água (DQA). Jornal oficial L 327 de 22.12.2000;
12. **Degani, A., Cass, Q. & Vieira, P., 1998**; *Cromatografia. Um breve ensaio*; Química Nova Na Escola; 7: 21-25;
13. **Diehnelt, C.W., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2005**; *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins*; TrAC Trends Anal. Chem.; 24 (7): 622–63;
14. **Edwards C., Graham, D., Fowler, N. & Lawton, L., 2008**; *Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters*; *Chemosphere* 73 (2008) 1315–1321;
15. **Ferranti, P., Fabbrocino, S., Nasi A., Caira, S., Bruno, M., Serpe, L. & Gallo P., 2009**; *Liquid chromatography coupled to quadruple time-offlight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterization of a novel variant of microcystin-RR*. Rapid Commun. Mass Spectrom, 23: 1328–1336;
16. **Frias, H., Mendes, M., Cardozo, K., Carvalho, V., Tomazela, D., Colepicolo, P. & Pinto, E., 2006**; *Use of electro- spray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event*. Biochem. Biophys. Res. Commun; 344 (3), 741–746;
17. **Fuhrman & Schwalbach, 2003**; *Viral influence on aquatic bacterial communities*; Biol. Bull. April 1, 2003vol. 204 no. 2 192-195;
18. **Galvão, H. Reis, M., Valério E., Domingues, R., Costa, C., Lourenço, D., Condinho, S., Miguel, R., Barbosa, A., Gago, C., Faria, N., Paulino, S. & Pereira, P., 2008**; *Cyanobacterial blooms in natural waters in southern Portugal: a water management perspective*, *Aquat Microb, Ecol*, 53: 129–140;
19. **Galvão, H., Reis, M., Domingues, R., Caetano, S., Mesquita, S., Barbosa, A., Costa, C., Vilchez, C. & Ribau Teixeira, M., 2012**; *Ecological Tools for the Management of Cyanobacteria Blooms in the Guadiana River Watershed, Southwest Iberia*; Chapter 7 In: Kumarasamy, M. (Eds); *Studies on water manegament issues*; InTech; 159-192;
20. **Genuário, D., Silva-Stenico, M., Welker, M., Moraes, L. & Fiore M., 2010**; *Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of Nostoc*; *Toxicon*; 55: 846–854;

21. **Gonçalves, M., 2001;** *Introdução aos métodos cromatográficos*; Capítulo 11 In: Métodos instrumentais para análise de soluções. Análise Quantitativa; 4º edição; Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa; 729-786;
22. **Hambly, E. & Suttle, C., 2005;** *The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities*; Current Opinion in Microbiology; 8:444–450;
23. **Harada, K., Kondo, F. & Lawton, L., 1999;** *Laboratory Analysis of Cyanotoxins*, Chapter 13 In: Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. London, New York;
24. **Harris, D., 2005;** *Análise química quantitativa*, LTC editora; Rio de Janeiro; Sexta edição;
25. **Hee-jin, C., Baik-ho K., Jeong-dong K. & Myung-soo H., 2005;** *Streptomyces neyagawaensis as a control for the hazardous biomass of Microcystis aeruginosa (cyanobacteria) in eutrophic freshwaters*; Biological Control; 33: 335–343;
26. **Hoffmann, E. & Stroobant V., 2007;** *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, Chichester, Uk.; Third Edition;
27. **Ibelings, B. & Chorus, I., 2007;** *Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review*. Environmental Pollution 150: 177-192;
28. **ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses;** *Virus Taxonomy: 2009 release*; Disponível em URL: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009> Página acessada a 8 de Março de 2012;
29. **Jacquet, S., Mikib T., Noblec, R., Peduzzid P. & Wilhelm S., 2010;** *Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology*; Advances in Oceanography and Limnology; 1(1): 97–141;
30. **Jezberova, J. & J. Komarkova, 2007;** *Morphological transformation in a freshwater Cyanobium sp. induced by grazers*. Environmental Microbiology, 9: 1858–1862;
31. **Kaebernick, M. & Neilan, B., 2001;** *Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production*; FEMS Microbiology Ecology; 35: 1-9;
32. **Kaebernick, M., Neilan, B.A., Börner, T. & Dittmann, E., 2000;** *Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster*. Applied and Environmental Microbiology 66 (8), 3387–3392;

33. **Kim, H. & Shin, H., 2011;** *Simple derivatization of aldehydes with D-cysteine and their determination in beverages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry;* Anal Chim Acta.; 702(2): 225-32;
34. **Kurmayer, R. & Jüttner, F., 1999;** *Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium planktothrix rubescens in lake zürich.* J. Plankton res. 21, 659–683;
35. **Lawton, L. & Edwards, C., 2001;** *Purification of microcystins;* Journal of Chromatography A; 912: 191-209;
36. **Lawton, L., Edwards, C. & Codd, G., 1994;** *Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters;* Analyst, 119: 1525-1530;
37. **Leff, A., Leff, L., Lemke, M., Heath, R., & Gao, X., 1999;** *Abundance of planktonic virus-like particles in Lake Erie subsurface waters;* Ohio J Sci; 2: 16-18;
38. **Li, C., Chu, R. & Hsieh D., 2006;** *An enhanced LC-MS/MS method for microcystin-LR in lake water;* Journal of Mass Spectrometry; J.Mass Spectrom.; 2006; 41: 169–174;
39. **Mankiewicz, J., Tarczyn, M., Walter, Z. & Zalewski, M., 2003;** *Natural toxins from cyanobacteria,* Acta biologica cracoviensia series botanica, 45(2): 9–20;
40. **Maragou, N., Thomaidis N. & Koupparis, M., 2011;** *Optimization and comparison of ESI and APCI LC-MS/MS methods: a case study of Irgarol 1051, Diuron, and their degradation products in environmental samples;* J Am Soc Mass Spectrom.; 22(10):1826-38;
41. **March, R., 1997;** *An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry;* Journal Of Mass Spectrometry; 32: 351-369;
42. **Mekebri, A., Blondina G. & Crane D., 2009;** *Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1216: 3147–3155;
43. **Mesquita, S., Miguel R., Lourenço D., Reis M.P. & Coelho M., 2002;** *Dynamics of a microcystin producing mixed Aphanizomenon flos-aquae and Microcystis aeruginosa winter bloom (Funcho-South Portugal); 8th Symposium on Aquatic Microbial Ecology Proceedings; 25-30 October Taormina, Italy;*
44. **Meyer, v., 2004;** *Practical high-performance liquid chromatography;* Fourth edition; John Wiley & Sons;

45. Mez, K., Beattie, K. A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser B., Naegeli, H. & Preisig, H.R., 1997; *Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switexland*, Eur. J. Phycol; 32: 111-117;
46. Mur I., Skulberg, O. & Utkilen, H.,1999, *Cyanobacteria in the environment*; Chapter 2 In: chorus, i. & bartram, j. (eds). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & fn spon. London, new york;
47. Neffling, M., Lance, E. & Meriluoto, J., 2010; *Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*; Environmental Pollution, 158: 948–952;
48. Nunes, G., 2005; *Métodos imunológicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas*; Quim. Nova; 28 (3): 462-471;
49. Orange Scientific, Marketing; Acedida a 25 de Março de 2012; Disponível em URL: <http://www.orangesci.com/pageview.asp?structureID=313>;
50. Ou, D., Song, L., Gan N., & Chen W., 2005; *Effects of microcystins on and toxin degradation by Poterioochromonas sp.*; Environ Toxicol; 20(3):373-80;
51. Padan, E. & Shilo, M., 1973; *Cyanophages-Viruses Attacking Blue-Green Algae*; Bacteriological Reviews; 37(3): 343-370;
52. Padan, E., Rimon, A, Ginzberg, D., & Shilo, M.,1971; *A thermosensitive cyanophage LPP1-G attacking the blue green alga Plectonema boryanum*; Virology; 45: 773–776;
53. Park, H., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A. & Kato, K., 2001; *Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by a New Bacterium Isolated from a Hypertrophic Lake*; Environ Toxicol, 16: 337-343;
54. Paul, J. & Jiang, S., 2001; *Lysogeny and Trasduction*, Chapter 7 In: Paul, J. (Eds); *Methods in Microbiology – Marine Microbiology*, v.30, Academic Press, San Diego, E.U.A. 105-125;
55. Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A., 2004. *Inactivation of an ABC transporter gene, mcyH, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806*. Applied and Environmental Microbiology 70 (11), 6370–6378;
56. Pollard, P. & Young, L., 2010; *Lake viruses lyse cyanobacteria, Cylindrospermopsis raciborskii, enhances filamentous-host dispersal in Australia*; Acta Oecologica; 36: 114-119;

57. Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R., Barreto, V., Ward C., Preiser W., Poon G., Neild G. & Codd, G., 1998; *Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil*; Lancet; 352(9121):21-6;
58. Rantala, A., Fewer, D., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T. & Sivonen, K., 2004; *Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis*; Proceedings of the National Academy of Sciences USA; 101: 568–573;
59. Rastogi, R. & Rajeshwar, S., 2009; *Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites*; Biotechnology Advances; 27: 521–539;
60. Reis, M., 2005; *Dinâmica das florescências de cianobactérias na Albufeira do Funcho (Algarve – Portugal), Uma análise Multifuncional*, Tese de doutoramento, Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente, Faro, Portugal;
61. Rosenberg, d., 2000; *Global-scale environmental effects of hydrological alterations. A special issue devoted to hydrological alterations*, Bioscience, 2000;
62. Rossi, P., 1999; *Advances in biological tracer techniques for hydrology and hydrogeology using bacteriophages*. PhD Thesis, University of Neuchatel, Switzerland
63. Rouessac, F., Rouessac, A., 2000; *High performance liquid chromatography*; Chapter 3 In: Chemical Analysis. Modern Instrumentation. Methods and Techniques; English Edition; John Wiley & Sons, LTD;
64. Sadek, P., 2004; *Illustrated pocket dictionary of chromatography*; John Wiley & Sons, Inc.; 52;
65. Safferman, R. & Morris, M, 1963; *Algal Virus: Isolation*; Science 10; 140 (3567): 679-680;
66. Sangolkar, L.; Maske S. & Chakrabarti, T., 2006; *Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria*, Water Research; 40: 3485 – 3496;
67. Sangolkar, L.; Maske, S.; Muthal, P.; Kashyap, S. & Chakrabarti, T., 2009; *Isolation and characterization of microcystin producing Microcystis from a Central Indian water bloom*; Harmful Algae 8; 674–684;
68. Scott, R., 2003; *Principles and Practice of Chromatography*, Book 1 In: Chrom-Ed Book Series. Disponível em URL: <http://faculty.ksu.edu.sa/Dr.almajed/Books/practical%20HPLC.pdf>;
69. Sigeo, D., Glenn, R., Andrews, M., Bellinger, Butler, E., Epton, H. & Hendry, D, 1999; *Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities*; Hydrobiologia 395/396: 161–172;

- 70. Sigma-Aldrich Co., 1998;** *Guide to Solid Phase Extraction*; Suplenco, Bulletin 910; Disponível em URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>;
- 71. Singh, P., Singh, S., Srivastava, A., Singh, A. & Mishra, A., 2012;** *Structural, functional and molecular basis of cyanophage-cyanobacterial interactions and its significance* – Review; African Journal of Biotechnology; 11(11): 2591-2608;
- 72. Sivonen, K., & Jones, G., 1999;** *Cyanobacterial toxins*, Chapter 3 In: Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. London, New York;
- 73. Skoog, D., Holler, F. & Nieman T., 2001;** *Principios de análisis instrumental*; Quinta Edición; MC Graw Hill; Madrid;
- 74. Snyder, L., Kirkland, J. & Glajch, J., 1997;** *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed, New York, John Wiley & Sons;
- 75. Sobrino, C., Matthiensen, A., Vidal, S. & Galvão, H., 2004;** *Occurrence of microcystins along the Guadiana estuary*; Limnetica; 23 (1-2): 133-144;
- 76. Souza, L., 2008;** *Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular*; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná; Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Paraná, Brasil;
- 77. Spoof, L., Vesterkvist P., Lindholm, T. & Meriluoto, J., 2003;** *Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry*; Journal of Chromatography A; 1020: 105–119;
- 78. Stanier, R., Kunisawa R., Mandel M. & Cohenbazire G., 1971;** *Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales)*; Bacteriol. Rev.; 35: 171- 205;
- 79. Suttle C., 2000;** *Cyanophage and their role in the ecology of cyanobacteria*, Chapter 20 In: Whitton, B. & Potts M. (Eds). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands;
- 80. Svircev, Z.; Krstic, S.; Miladinov-Mikov, M.; Baltic, V.; Vidovic, M., 2009;** *Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia*; J. Environ. Sci. Health C Environ; Carcinog. Ecotoxicol.; 27: 36–55;
- 81. Thingstad, T. & Lignell, R., 1993;** *Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand*, Aquat. Microb. Ecol. 13 ;19–27;

82. **Tonhi, E., Collins, K., Jardm, I. & Collins C., 2002;** *Líquida de alta eficiência em fase reversa (clae-fr) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados;* Quím. Nova; 25 (4): 616-623;
83. **Triantis, T., Tsimeli, K., Kaloudis, T., Thanassoulis N., Lytras, E. & Hiskia, A., 2010;** *Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters;* Toxicon; 55: 979–989;
84. **van Apeldoorn, M., Egmond, H., Speijers, G., & Bakker, G.,2007;** *Toxins of cyanobacteria – Review,* Mol. Nutr. Food Res., 51: 7 – 60;
85. **Vasconcelos, V., 1999a;** *Ecotoxicologia de cianobactérias: impacte dos seus “blooms” nas comunidades animais e sua aplicação na gestão da qualidade de água.* Trabalho apresentado para Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Porto;
86. **Vasconcelos, V., 1999b;** *Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health;* Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 32: 249-254;
87. **Wang, K. & Che, F., 2004;** *Genetic diversity and population dynamics of cyanophage communities in the Chesapeake Bay;* Aquat Microb Eco; 34: 105–116;
88. **Waters Marketing;** LC/MS booklet; Acedida a 05 de Março de 2012; Disponível em URL: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Waters%20LC-MS%20primer.pdf>;
89. **Weinbauer, M., 2004;** *Ecology of prokaryotic viruses;* FEMS Microbiology Reviews; 28: 127-181;
90. **Welker, M. & von Döhren, H., 2006;** *Cyanobacterial peptides -Nature’s own combinatorial biosynthesis;* FEMS Microbiol Rev 30: 530–563;
91. **WHO - World Health Organization, 1998;** *Guidelines for Drinking Water Quality: Addendum to Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information;* W.H.O., Geneva, 2nd Ed;
92. **Wolk, C., 1973;** *Physiology and Cytological Chemistry of Blue-Green Algae;* Bacteriological Reviews; 37(1) :32-101;
93. **Wörmer, L., Huerta-Fontela, M., Cirés, S., Carrasco, D. & Quesada, A., 2010;** *Natural Photodegradation of the Cyanobacterial Toxins Microcystin and Cylindrospermopsin;* Environ. Sci. Technol., 44, 3002–3007;
94. **Wu, L., Xie, P., Chen, J., Zhang, D. & Liang, G., 2010;** *Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantitation of microcystin-RR and its metabolites in fish liver;* Journal of Chromatography A, 1217: 1455–1462;

95. Yen, H., Lin, T. & Liao, P., 2011; *Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry*; *Toxicon* 58: 209–218;
96. Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N., & Hiroishi, S., 2007; *Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing Microcystis populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake*; *FEMS microbiology letters*; 266: 49-53;
97. Yoshida, T., Takashima, Y., Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., Hiroishi, S. & Nagasaki, K., 2006; *Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa*; *Applied And Environmental Microbiology*; 72 (2): 1239–1247;
98. Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Watanabe, M. & Rinehart, K., 1999; *Electrospray ionization mass spectrometric analysis of Microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and $[M - H]^-$ to $[M - Na]^-$ Ratio*; *J Am Soc Mass Spectrom*; 10, 1138–1151;

Protocolos experimentais

Preparação do meio nutritivo BG11 (STANIER *et al.*, 1971)

1. Preparar soluções *stock* de nutrientes de acordo com a seguinte tabela I:

Tabela I.1: Preparação das soluções *stock* de nutrientes que constituem o meio BG11.

Nutrientes	Solução <i>stock</i> (g/mL)
1. NaNO ₃	75g em 500 mL de H ₂ O destilada
2. K ₂ HPO ₄	3g em 500 mL de H ₂ O destilada
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5g em 500 mL de H ₂ O destilada
4. CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6g em 500 mL de H ₂ O destilada
5. Na ₂ CO ₃	2g em 500 mL de H ₂ O destilada
6. Ácido cítrico	0,6g em 500 mL de H ₂ O destilada
7. Citrato de ferro III	0,6g em 500 mL de H ₂ O destilada
8. EDTA	0,1g em 500 mL de H ₂ O destilada
9. Solução de metais traço:	
H ₃ BO ₃	0,286g em 100 mL de H ₂ O destilada
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,181g em 100 mL de H ₂ O destilada
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0222g em 100 mL de H ₂ O destilada
NaMo ₄ .5H ₂ O	0,0390g em 100 mL de H ₂ O destilada
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0079g em 100 mL de H ₂ O destilada
Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0049g em 100 mL de H ₂ O destilada

2. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos cada uma das soluções *stock*, exceto as soluções *stock* 5 e 7 e deixar arrefecer;

3. Na câmara de fluxo laminar vertical, adicionar ordenadamente as soluções *stock* a 1L de água destilada estéril de acordo com a tabela II:

Tabela I.2: Lista de ordem de adição dos nutrientes que constituem o meio BG11 e os respetivos volumes a adicionar.

Nutrientes	Volume de solução <i>stock</i> (mL/L)
1. NaNO ₃	10
2. K ₂ HPO ₄	1
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	1
4. CaCl ₂ .2H ₂ O	1
5. Na ₂ CO ₃ *	1
6. Ácido cítrico	1
7. Citrato de ferro III*	1
8. EDTA	1
9. Solução de metais traço	1

*As soluções *stock* n° 5 e 7, antes de serem adicionadas, devem ser filtradas por um acrodisc de 0,2 µm de poro (Whatman).

4. Acertar pH entre 7,0 e 7,2;
5. Armazenar o meio BG11 à temperatura ambiente e as soluções *stock* a 4°C.

Traçado do espetro de absorção

1. Na câmara de fluxo laminar vertical, retirar 300 µL de meio BG11 estéril e colocar em triplicado numa placa de 96 poços (Sarstedt), de modo a obter o controlo negativo do espetro de absorção;
2. Em triplicado, colocar na placa 300 µL de cada um dos replicados das culturas em estudo. As culturas devem ser previamente homogeneizadas em movimentos circulares de forma a não provocar a destruição das células e à semelhança do meio BG11 devem ser retiradas na câmara de fluxo laminar vertical;

3. Colocar na placa, em triplicado, uma amostra de 300 μ L de cada um dos replicados das culturas diluídos com meio BG11 estéril de 1:2;
4. Proceder de imediato à leitura espectralométrica dos replicados, traçando um espectro de absorção entre 350 nm e 800 nm.

Traçado das curvas de crescimento

1. Na câmara de fluxo laminar vertical, retirar 2 mL de meio BG11 estéril e colocar numa cuvete.
2. Retirar, na câmara de fluxo laminar vertical, 2 mL de cada um dos replicados das culturas em estudo e colocar numa cuvete devidamente identificada;
3. Proceder de imediato à leitura da densidade ótica de cada um dos replicados contra o branco de meio BG11 estéril, aos comprimentos de onda de $\lambda = 680$ nm, $\lambda = 730$ nm e $\lambda = 750$ nm. Antes de efetuar a leitura das densidades óticas, homogeneizar bem as cuvetes com ajuda de parafilm M (Parafilm, Pechiney) e limpar as faces das mesmas de modo a evitar resultados erróneos;

Preparação das culturas de *M. aeruginosa* para contagem do número de células e do biovolume (Haas, L., 1982)

1. Com o auxílio de uma pinça estéril, colocar uma membrana de suporte no kitasato de filtração. A membrana deverá ser humedecida com umas gotas de água destilada estéril e fixada à base da torre de filtração acionando a bomba de vácuo;
2. Sobre a membrana de suporte, colocar com auxílio da pinça uma membrana de policarbonato corada de negro Irgalão de 0,4 μ m (Whatman) e fixar a torre;
3. Adicionar 200 μ L da amostra em estudo fixada com gluteraldeído a 25% (para Microscopia, Merck), previamente descongelada e homogeneizada, e perfazer com água destilada estéril até um volume de 1 mL;
4. Adicionar 10 μ L de proflavina (Fluka) e deixar em contacto no escuro durante 10min;

5. Filtrar a amostra até a membrana de policarbonato ficar seca, de modo a que a pressão de filtração não ultrapasse os 50 mmHg de modo a prevenir a destruição das células;
6. Com a pinça, colocar a membrana seca sobre uma gota de óleo de imersão não fluorescente específico para epifluorescência (Cargylle tipo A), numa lâmina devidamente identificada;
7. Colocar uma gota de óleo de imersão sobre a membrana e cobrir com uma lamela;
8. Com recurso a papel absorvente estéril, pressionar suavemente a preparação de modo a retirar o excedente de óleo;
9. Proceder de imediato à observação da preparação e/ou reservar no frio a -4°C .

Nota: Entre cada filtração dos replicados das culturas, a torre de filtração deverá ser bem lavada com água destilada estéril.

Contagem do número de células de *M.aeruginosa*

A estratégia adotada para a contagem do número de células de *M. aeruginosa* foi a contagem por retículo (quadrícula) sob incidência de luz verde no microscópio de epifluorescência. Esta estratégia consiste:

1. Contar células de *M. aeruginosa* até completar um total de 500 unidades, contando pelo menos 20 campos. A escolha dos campos a contar deverá ser aleatória;
2. Contar apenas as células que estão no interior um retículo instalado numa das oculares e as que cruzem *as linhas* de cima e da direita, como mostra a figura I.1:

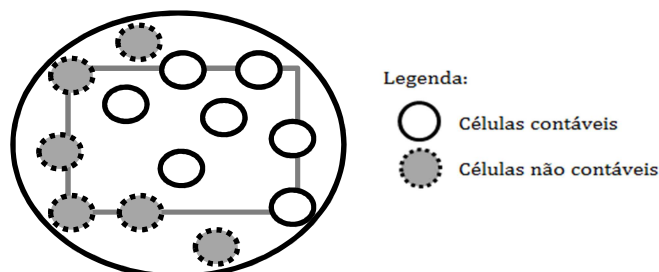


Figura I.1 - Exemplo de uma estratégia de contagem de células. Os círculos a cheio representam as células contáveis e os a tracejado as não contáveis.

Posteriormente, o número total de células de *M. aeruginosa* será calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$NT \text{ (cél./mL)} = \frac{x.A.d}{a.n.v} \quad (\text{I.1})$$

NT representa o número total de células por volume de amostra, *x* número de células contadas por campo, *A* a área da chaminé de filtração (mm^2), *d* o fator de diluição ou de concentração da amostra, se aplicável ($d = 2$, se 1x diluído; $d = 0,5$ se 1x concentrado), *a* a área do campo de contagem (mm^2), *n* o número de campos contados e *v* o volume da amostra filtrado (mL).

Cálculo do biovolume de *M. aeruginosa*

A estratégia adotada para o cálculo do biovolume de *M. aeruginosa* foi a medição das dimensões das cianobactérias por retículo, sob incidência de luz verde no microscópio de epifluorescência. Esta estratégia consiste:

1. Com a objetiva de 63x medir as dimensões lineares de 20 células de cianobactérias em campos diferentes;
2. Calcular o volume de cada célula recorrendo à fórmula geométrica da esfera:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (\text{I.2})$$

3. Determinar o volume médio das células;
4. Multiplicar o volume médio pela densidade de células de *M. aeruginosa*, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Biovolume (mm}^3\text{/L)} = \text{Volume médio (mm}^3\text{)} \times \text{Número de células/L} \quad (\text{I.3})$$

Parâmetros biológicos indicadores da evolução do crescimento

A taxa específica de crescimento celular de uma população de células microbianas, em crescimento exponencial, é dada pela equação I.4 resultante da variação do número de células em função do tempo de crescimento.

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{T} \quad (\text{I.4})$$

N_t representa a concentração de células no tempo t , N_0 a concentração de células no início do crescimento celular e T o tempo de crescimento.

A taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação estão inversamente ligados entre si. A partir da taxa específica de crescimento dada pela equação I.4 é possível determinar o tempo que a população microbiana demora a duplicar o seu número de células, ou seja, o tempo que demora a formar duas células a partir de uma. O tempo duplicação pode ser calculado através das equações I.5 e I.6.

$$td = \frac{T \times \ln 2}{\ln N_t - \ln N_0} \quad (\text{I.5})$$

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{I.6})$$

Estimativa do número de partículas semelhantes a vírus (VLP) através da coloração por SyBR Green (Noble, R. & Fuhrman, J., 1998)

- **Preparação da solução mãe de SyBR Green a 10%:**

1. Retirar 10 μL da solução *stock* de SyBr Green (10,000x conc. Molecular Probes Eugen Oregon) e colocar num eppendorf estéril de 1,5 mL;
2. Diluir a amostra de solução *stock* em 990 μL de H_2O estéril filtrada a vácuo em membrana de fibra de vidro (Whatman Anodisc) com 0,02 μm de poro;
3. Homogeneizar a solução mãe no vórtex;
4. Embrulhar em papel de alumínio e reservar no congelador a -20°C .

Nota: Todo este procedimento deverá ser efetuado na *hotte* e às escuras, uma vez que o SyBR green é sensível à luz.

• **Preparação da solução de trabalho de SyBR Green:**

1. Preparar uma solução de trabalho de SyBr Green, de acordo com o que está descrito na seguinte tabela I.3;
2. Homogeneizar a solução de trabalho no vórtex;
3. Embrulhar em papel de alumínio e reservar no congelador a -20°C.

Tabela I.3: Preparação da solução de trabalho de SyBR Green de acordo com o número de amostras a analisar.

Número de amostras	Volume de solução <i>stock</i> de SyBr Green a 10% (µL) *	Volume de H ₂ O estéril filtrada a vácuo (µL) *
6	18	683
12	33	1268
20	53	2048
40	103	3998
60	163	5948

*A relação entre número de amostras e volume de solução *stock* de SyBR Green e de H₂O estéril a adicionar foi estabelecida de acordo com trabalhos experimentais anteriormente realizados.

Nota: À semelhança do procedimento acima descrito, este deverá ser também efetuado na *hotte* e às escuras.

• **Preparação da solução mãe de p-fenilenodiamina a 10% e da mistura tampão fosfato/glicerol (50/50,v/v):**

1. Pesar 0,1 g p-fenilenodiamina dihidroclorato (Sigma Aldrich, P-6001) e colocar num eppendorf estéril de 2 mL;
2. Diluir em 1 mL H₂O estéril filtrada a vácuo em membrana de fibra de vidro (Whatman Anodisc) com 0,02 µm de poro;
3. Homogeneizar a solução p-fenilenodiamina dihidroclorato a 10% no vórtex;
4. Embrulhar em papel de alumínio e reservar no frio até posterior utilização;

5. Retirar 5 mL de glicerol e colocar num *falcon* estéril de 15 mL;
6. Adicionar 5 mL de solução tampão fosfato, PBS (Sigma-Aldrich, Ref. PBS1);
7. Homogeneizar a mistura no vórtex e reservar no frio até posterior utilização.

• **Preparação da solução de trabalho de anti-fade:**

1. Preparar uma solução de trabalho de anti-fade, de acordo como está descrito na seguinte tabela I.4;
2. Homogeneizar a solução de trabalho no vórtex;

Tabela I.4 - Preparação da solução de trabalho de anti-fade de acordo com o número de amostras a analisar.

Número de amostras	Volume de solução <i>stock</i> de <i>p</i> -fenilenodiamina a 10% (μ L) *	Volume de mistura PBS/Glicerol (50/50, v/v, μ L) *
6	10	990
12	10	990
20	10	990
40	13	1218
60	19	1812

*A relação entre número de amostras e volume de solução *stock* de *p*-fenilenodiamina e de mistura de PBS/Glicerol a adicionar foi estabelecida de acordo com trabalhos experimentais anteriormente realizados.

Nota: A solução de trabalho de anti-fade deverá ser obrigatoriamente preparada no dia da contagem do número de VLP.

• **Preparação do lisado celular bruto de cianófagos:**

1. Retirar uma amostra de 200 μ L do lisado celular bruto de cianófagos Ma-LEZ01 e colocar num eppendorf estéril de 1,5 mL;
2. Diluir a amostra de 1:5 em H₂O estéril filtrada a vácuo por 0,02 μ m de poro;
3. Homogeneizar a amostra no vórtex e centrifugar a 8.000g (5.939 rpm) durante 20 minutos com curva de descida no mínimo;

4. Recolher o sobrenadante noutra eppendorf estéril de 1,5 mL e centrifugar mais uma vez nas condições acima descritas, exceto a curva de descida que deverá ser no máximo;
5. Descartar o *pellet* e reservar o sobrenadante;
6. Colocar uma membrana de suporte (Millipore) no kitasato de filtração, com o auxílio de uma pinça estéril e humedecer com 4 gotas de água estéril filtrada por 0,02 μm ;
7. Colocar uma membrana Anodisc de 0,02 μm de poro sobre a membrana de suporte e fixar as duas membranas à base da torre de filtração acionando a bomba de vácuo;
8. Filtrar 100 μL do sobrenadante;
9. Retirar a membrana Anodisc para uma caixa de Petri estéril e deixar a secar durante 10 min em pedaços de papel absorvente, previamente esterilizados por Uv;
10. Colocar a membrana devidamente seca numa caixa de Petrie estéril revestida por papel de alumínio, adicionar 100 μL de solução de trabalho de SyBR Green e incubar num local seco e escuro durante 15 minutos;
11. Retirar a membrana para uma caixa de Petri estéril e deixar a secar durante 5 min em pedaços de papel absorvente estéril;
12. Colocar a membrana sobre uma lâmina devidamente identificada;
13. Colocar 30 μL de solução de trabalho de anti-fade sobre a membrana e cobrir com uma lamela;
14. Proceder à visualização microscópica e estimar, de forma geral, o número de VLP.

Estimativa do número de VLP - *Coloração rápida por SyBR Green*

1. Na câmara de fluxo laminar vertical, retirar uma amostra de 10 μL de amostra de lisado celular bruto de cianófitos Ma-LEZ01 diluída de 1:5 em H₂O estéril filtrada por 0,02 μm de poro e colocar sobre uma lâmina devidamente identificada;
2. Adicionar 5 μL de solução de trabalho de SyBR Green diretamente sobre a amostra;
3. Colocar a lâmina numa caixa de Petrie estéril e devidamente envolvida em alumínio e incubar num local seco e escuro durante 15 minutos;

4. Colocar a lamela sobre a amostra, observar rapidamente ao microscópio e estimar o número de VLP.

Nota: A visualização microscópica e a estimativa do número de VLP da amostra deverão ser efetuadas de forma rápida, uma vez que na ausência da solução fixante anti-fade a iluminação da preparação provoca um decaimento rápido da fluorescência.

Infeção viral das células de *M. aeruginosa* com cianófagos Ma-LEZ01

1. Na câmara de fluxo laminar vertical, retirar uma amostra de 50 mL do concentrado viral bruto e colocar num *falcon* estéril de 50 mL;
2. Centrifugar a amostra a 8.000g (5.939 rpm) durante 20 minutos com curva de descida no mínimo;
3. Recolher o sobrenadante noutra *falcon* estéril de 50 mL e centrifugar mais uma vez nas condições acima descritas, exceto a curva de descida que deverá ser no máximo;
4. Descartar o *pellet* e reservar o sobrenadante;
5. Colocar 8 mL do sobrenadante do concentrado viral em cada replicado das duas culturas de *M. aeruginosa* repicadas para os frascos de cultura;
6. Homogeneizar vigorosamente as culturas com movimentos circulares;
7. Manter as culturas no fitoclima à temperatura de 25°C e intensidade de radiação média de 15 μ mol.min⁻¹ durante 16 horas/dia.

Extração das microcistinas

1. Descongelar a amostra em estudo à temperatura ambiente e homogeneizar no vórtex durante 5 min;
2. Transferir a amostra para tubos específicos de centrifugação e centrifugar a 15.000g (11.136 rpm) durante 15 minutos a 24°C. A centrifugação deverá iniciar com aceleração máxima e terminar lentamente;
3. Recolher o sobrenadante num balão volumétrico de 100 mL e perfazer com água Milli-Q.
4. Transferir, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco de vidro âmbar com rosca e reservar no frio a 4°C até à extração em fase sólida;
5. Ao *pellet*, adicionar 30 mL de uma mistura de metanol/água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e 0,05% ácido trifluoracético (TFA), 90:10 v/v, homogeneizar vigorosamente durante 5min e sonicar durante 10 min num banho de ultrassons;
6. Centrifugar o sonicado a 12.000g (8.908 rpm) durante 15 minutos a 24°C. À semelhança da primeira centrifugação, a centrifugação deverá começar com uma aceleração máxima e terminar lentamente;
7. Descartar o *pellet* e transferir o sobrenadante para um balão de fundo redondo de 100 mL;
8. Evaporar o sobrenadante a 50°C num evaporador rotativo até um volume aproximado de 5 mL;
9. Cuidadosamente, transferir o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL;
10. Lavar o balão de fundo redondo com 50 mL água Milli-Q, de modo a arrastar todas as cianotoxinas que eventualmente tenham ficado aderidas ao balão;
11. Verter a água de lavagem para o balão volumétrico que contém o sobrenadante e perfazer com água Milli-Q até um volume de 100 mL;
12. Transferir, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco de vidro âmbar com rosca e reservar no frio a 4°C até à extração em fase sólida;

Clean up das microcistinas

1. Condicionar os cartuchos de extração em fase sólida num sistema de extração a vácuo com 5 mL de metanol e com 5 mL de água Milli-Q. O condicionamento com metanol deverá efetuar-se obrigatoriamente sob ação da gravidade enquanto o com água Milli-Q por vácuo;
2. Passar a amostra pelos cartuchos de extração através de tubos de politetrafluoretileno (PTFE) a uma pressão inferior a 20 mmHg de modo a não exceder um fluxo de 10 mL/min;
3. Sob vácuo, lavar os cartuchos com 5mL de água Milli-Q e deixar secar durante 30 minutos a uma pressão de 70 mmHg;
4. Eluir as cianotoxinas, sob ação da gravidade, com 5 mL de CH₃OH com 1% de TFA, recolhendo o eluato em tubos de ensaio de vidro;
5. Secar o eluato sob um fluxo de azoto a 40°C. Os tubos com o eluato devem estar devidamente cobertos por papel de alumínio a fim de manter a temperatura e evitar possíveis contaminações;
6. Ressuspender o eluato seco em 1 mL de CH₃OH a 70%, tendo o cuidado de passar o solvente pelas paredes do tubo de modo a arrastar todas as cianotoxinas que eventualmente tenham ficado aderidas ao tubo;
7. Sonicar durante 10 min e transferir a amostra para vial de vidro âmbar de 2 mL;
8. Reservar a amostra no frio a -20°C até à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nota: Para cada replicado das culturas em estudo, utilizou-se um cartucho de extração em fase sólida.