

MARCAÇÃO COM ISÓTOPO ESTÁVEL DE NITROGÊNIO PARA A DESREPLICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE CIANOBACTÉRIAS

Leonardo Santos de Jesus

Márcio Barczynszyn Weiss

Camila Manoel Crnkovic

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

le.s.j@usp.br

Objetivos

As cianobactérias são seres procariontes, Gram-negativos e fotossintetizantes. São organismos primitivos datados de aproximadamente 3,5 bilhões de anos, e diversificados morfologicamente, sendo encontrados em uma ampla variedade de ambientes.¹ Elas são produtoras de metabólitos secundários, também chamados produtos naturais, que são compostos orgânicos promissores no âmbito biotecnológico.¹ Para a identificação de tais compostos, a desreplicação baseada em espectrometria de massas é uma aliada promissora. Ela visa prevenir a redescoberta de compostos químicos, permitindo que o foco seja o ineditismo químico, além de evitar análises dispendiosas.¹ Um desafio na desreplicação é a determinação de fórmulas moleculares, visto em que diversos casos, mais de uma fórmula molecular pode ser calculada com base apenas em dados de massa acurada.² Assim, busca-se aprimorar a desreplicação de metabólitos secundários de cianobactérias através da marcação com isótopo estável de nitrogênio.³ Foi realizado um estudo comparativo entre cultivos marcados e não marcados da *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214, uma linhagem de cianobactéria em que compostos foram associados à bioatividade frente à *Artemia salina* e células de câncer de cólon e mama.¹ Visamos identificar o número de átomos de nitrogênio de compostos de

interesse e resultar em cálculos de fórmulas moleculares mais eficientes.

Métodos e Procedimentos

Prepararam-se meios de cultivo BG-11 e ASM-1 contendo nitrato de sódio comum e ¹⁵N NaNO₃. Os meios de cultivo foram adequados ao pH 7,4, transferidos (20 mL) para tubos de ensaio e, em seguida, autoclavados. A linhagem de cianobactéria utilizada nos experimentos foi *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 (cadastro Sisgen: A531C68). A linhagem foi cultivada por seis semanas sob irradiância de 30 μmol fótons m⁻².s⁻¹ em fotoperíodo 12-12h claro-escuro e a 25 °C. Os cultivos foram feitos em triplicata para cada condição (¹⁴N e ¹⁵N). Após esse período, a biomassa foi coletada por centrifugação, a 15 °C e 3000 g, e liofilizada. As biomassas secas foram extraídas com diclorometano/metanol 1:1 (3x). Os extratos foram secos, pesados, ressuspendidos em metanol 100% para o posterior processo de *clean-up*. Os extratos foram testados por LC-HRMS (espectrômetro de massas micrOTOF-Q II ESI-TOF (Bruker) acoplado a um HPLC Shimadzu) e os dados foram analisados pelo programa DataAnalysis.

Resultados

Os dados de LC-MS dos extratos da *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 foram analisados, buscando avaliar a diferença de unidades na relação massa/carga (*m/z*) de compostos e, conseqüentemente, o número de

átomos de nitrogênio presentes nas estruturas químicas. Inicialmente, validou-se a incorporação de nitrogênio em compostos que a desreplicação evidenciou se tratarem de peptídeos, tendo-se observado diferenças em unidades de massa entre os cultivos marcados e não marcados (Figura 1).

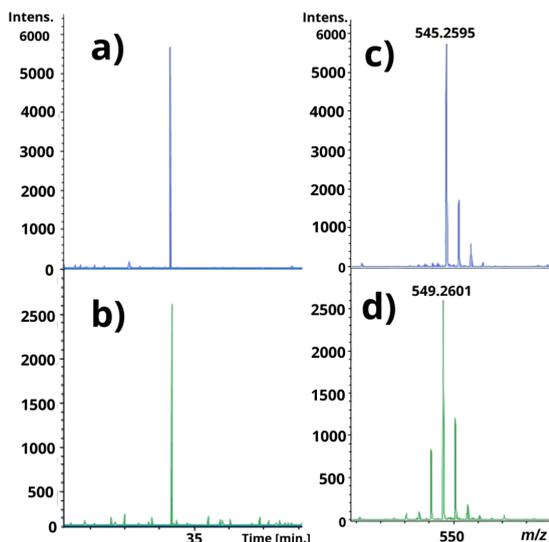


Figura 1: Peptídeo encontrado por LC-MS. a) e b) cromatogramas no tempo de retenção de 34,4 min. (^{14}N e ^{15}N); c) e d): espectros de massas (^{14}N e ^{15}N).

Analogamente, por não ser possível observar a discrepância de unidades de massa do composto de interesse (m/z 501) entre os diferentes cultivos, pode-se afirmar que o composto não possui nitrogênios em sua composição (Figura 2).

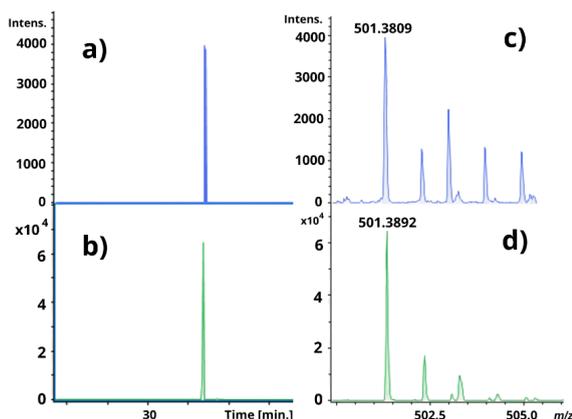


Figura 2: Composto de interesse (m/z 501) encontrado por LC-MS. a) e b) cromatogramas no tempo de retenção de 32,9 min. (^{14}N e ^{15}N); c) e d): espectros de massas (^{14}N e ^{15}N).

Conclusões

Os resultados indicaram que a observação da incorporação de isótopo estável em produtos naturais da cianobactéria *Anagnostidinema amphibium* foi viável, bem como os números de átomos de nitrogênio foram possíveis de serem analisados por LC-MS em comparação com o cultivo tradicional.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ-PIBIC e Bolsas Dow, à CAPES (bolsa Doutorado-DS) e à FAPESP (processo no. 2022/02872-4).

Referências

- 1 Weiss, M. B. Quimioprospecção de cianobactérias brasileiras utilizando metabolômica e ensaios biológicos. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.
- 2 Jones, M., *et al.* CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Res* 2021. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117017.
- 3 May, D.S, Crnkovic, M.C, Kronic, *et al.* ^{15}N Stable Isotope Labeling and Comparative Metabolomics Facilitates Genome Mining in Cultured Cyanobacteria. *ACS Chem Bio*. 2020. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00993.