

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**PEPTÍDEOS CÍCLICOS HEPATOTÓXICOS: MALDI-TOF COMO UMA  
FERRAMENTA ANALÍTICA**

**BEATRIZ BRABETZ SANDONATO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

**Março- 2014**

BEATRIZ BRABETZ SANDONATO

PEPTÍDEOS CÍCLICOS HEPATOTÓXICOS: MALDI-TOF COMO UMA  
FERRAMENTA ANALÍTICA

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área:  
Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Rio Claro  
2014

589.9 Sandonato, Beatriz Brabetz  
S218p Peptídeos cíclicos hepatotóxicos : MALDI-TOF como  
uma ferramenta analítica / Beatriz Brabetz Sandonato. - Rio  
Claro, 2014  
116 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Bacteriologia. 2. Análise de microcistinas. 3.  
Cianobactérias. 4. Microcistinas. 5. Espectrometria de massas.  
6. Quantificação. 7. Matrizes. I. Título.

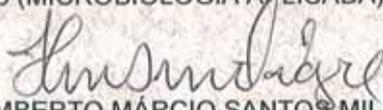
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** PEPTÍDEOS CÍCLICOS HEPATOTÓXICOS: MALDI-TOF COMO UMA FERRAMENTA ANALÍTICA

**AUTORA:** BEATRIZ BRABETZ SANDONATO

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP campus Araraquara



Prof. Dr. PAULO JOSÉ SAMENHO MORAN

Instituto de Química / UNICAMP



Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO ROSÁRIO RODRIGUES

Instituto de Química / UNICAMP

Data da realização: 12 de março de 2014.

*Dedico aos principais responsáveis por eu ter chegado até aqui,  
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas*

***Minha Família***

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos meus pais Gilberto e Elizabeth, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Agradeço por terem me dado valores e incentivos perante os desafios. Obrigada por todos os ensinamentos.

Às minhas irmãs: Débora e Luiza, responsáveis por iluminar meus dias, me dar motivos para sorrir e encher meu coração de alegria.

Aos meus irmãos de coração: Ronaldo pela amizade, pelas nossas conversas e risadas. Thiago e Lucas, meus primos queridos, obrigada pelos momentos e pelo carinho incrível que vocês me deram.

Aos meus tios: Gysele e Justino, meus segundos pais, que me derem muito carinho e força. Vocês me fizeram sorrir quando os problemas da vida me deixavam triste.

A minha tia Norah que sempre torceu muito pelas minhas conquistas. Sempre disposta a me ajudar com muito carinho.

À minha querida avó Darcy, excelente professora e educadora. Sempre com um sorriso no rosto e palavras doces para nos confortar.

Ao meu namorado Alex, companheiro e amigo em todos os momentos. Obrigada pela compreensão, pelo apoio e paciência nos momentos de inquietação e cansaço.

A Patrícia e Emerson, pessoas maravilhosas e amigos muito queridos. Obrigada por toda ajuda e apoio que nos dão.

Ao Dr David Franco, que desde a época de graduação me ajudou muito. Quero agradecer todo carinho que tem pela nossa família.

Agradeço aos meus amigos: Danilo, Demétrio, Débora e Adnivea, pessoas maravilhosas que me receberam e me acolheram em Araraquara. Me ajudaram muito com nossas conversas, dando-me palavras de conforto e ânimo.

Agradeço aos meus colegas de mestrado: Bruno, Daiane, Fernanda, Karina, Letícia, Luna, Marina, Milena, Sadala e Talitta, pelas risadas e por terem me ajudado muito com esta dissertação.

Ao Professor Humberto, a quem devo a realização deste trabalho. Obrigada pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos e por acreditar em mim.

À Professora Cíntia muito obrigada pela ajuda, ensinamentos e contribuições.

Ao Professor Marcos Eberlin e a todos do laboratório ThoMson, pelas contribuições realizadas durante este trabalho.

Ao Instituto Pasteur pelas contribuições e parcerias.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada) da UNESP de Rio Claro pelo apoio e infraestrutura.

Ao Instituto de Química de Araraquara pelo apoio e infraestrutura.

Ao Instituto de Biociências de Rio Claro pelo apoio e infraestrutura.

À FAPESP pela bolsa de mestrado, suporte financeiro, pelo incentivo e por acreditar no potencial desta dissertação.

À CAPES pela manutenção do portal de periódicos.

*“O Sentido da vida é que ela termina”*

*Franz Kafka*

## RESUMO

As cianobactérias são bactérias fotossintetizantes que podem ser encontradas nos mais variados ambientes. Algumas espécies de cianobactérias produzem toxinas denominadas cianotoxinas. As cianotoxinas denominadas microcistinas (MCs) são heptapeptídeos cíclicos hepatotóxicos produzidas durante florações de cianobactérias. Sua detecção e quantificação em mananciais são de grande importância devido aos danos a saúde humana que essas microcistinas podem causar. Atualmente, a técnica MALDI-TOF-MS tem se mostrado uma eficiente ferramenta para a análise de microcistinas, e recentes estudos tem reportado seu uso na quantificação destas. Diante do exposto, o objetivo desta dissertação foi a avaliação de diferentes matrizes e diferentes métodos de preparo de amostra para MALDI-MS visando a detecção e quantificação das microcistinas. Com a finalidade de alcançar o melhor método de quantificação das microcistinas, nove matrizes para MALDI, onze métodos de preparo de amostra mais um método que foi adaptado por nosso grupo de pesquisa, o método *Vacuum drying adaptado*, e dois padrões comerciais de microcistinas, MC-LR e MC-RR, foram utilizados. A avaliação dos métodos de preparo de amostra foi realizada utilizando como matriz o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e o peptídeo angiotensina I como padrão interno. Os métodos foram avaliados com relação aos seus coeficientes de variação (CV), suas cristalizações e espectros obtidos, utilizando a MC-RR como amostra. O método *Vacuum drying adaptado* apresentou os melhores resultados e sua curva analítica foi construída utilizando ambas as variantes de microcistinas. O limite de detecção (MLD) e o limite de quantificação (LDQ) também foram calculados. Cada curva da variante de microcistina apresentou excelente linearidade e os valores de r variaram entre 0,98-99, demonstrando que o método é adequado para a quantificação destas. Após as análises dos métodos de preparo de amostra, as nove matrizes foram avaliadas com relação ao CV, cristalização e espectros, utilizando a MC-RR como amostra. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura das matrizes ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico (CICCA). Uma curva analítica também foi construída com a matriz binária utilizando a MC-RR. Constatamos que a mistura dos ácidos HCCA e CICCA proporcionou uma melhora na linearidade da curva analítica para a MC-RR. Com todos estes resultados, obtivemos um novo método analítico uma matriz binária para a detecção e quantificação de duas variantes de microcistinas.

**Palavras-chave:** cianobactérias, microcistinas, MALDI-TOF, quantificação, matrizes

## Abstract

Cyanobacteria are photosynthetic bacteria that can be found in diverse environments. Some species of cyanobacteria produce toxins denominated cyanotoxins. The cyanotoxins called microcystins (MCs) are hepatotoxic cyclic heptapeptides produced during cyanobacterial blooms. Its detection and quantification in springs are of great importance due to damage to human health that these microcystins can cause. Currently, MALDI-TOF-MS technique has been shown to be an efficient tool for the analysis of microcystins, and recent studies have reported its use in the quantification of these. On the exposed, the aim of this thesis was to evaluate the different matrices and different methods of sample preparation for MALDI-MS aimed at the detection and quantification of microcystins. With the aim of achieving the best method of quantification of microcystins nine matrices for MALDI eleven methods of sample preparation over a method that was adapted by our research group, the *adapted vacuum drying method*, and two commercial standards of microcystins, MC-LR, and MC-RR, are used. The evaluation methods of sample preparation was performed using as matrix the  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and the angiotensin I as internal standard. The methods were evaluated with respect to their coefficients of variation (CV), their crystallization and spectra obtained using the MC-RR as a sample. The *adapted vacuum drying method* showed the best results and their analytical curve was constructed using both variants of microcystins. The limit of detection (MDL) and the limit of quantification (LOQ) were also calculated. Each curve variant of microcystin showed excellent linearity and  $r$  values ranged from 0.98 to 99, showing that the method is suitable for quantifying these. After analysis of the methods of sample preparation, the nine matrices were evaluated with respect to CV, crystallization and spectra, using the MC-RR as a sample. The best results were obtained by mixing the matrices  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid and  $\alpha$ -cyano-4-chlorocinnamic acid (CCICA). A calibration curve was also constructed with the binary matrix using the MC-RR. We found that the mixture of acids and CHCA CCICA provided an improvement in linearity of the analytical curves for MC-RR. With all these results, we obtained a new analytical method and a binary matrix for the detection and quantification of two variants of microcystin.

Keywords: cyanobacteria, microcystins, MALDI-TOF, quantification, matrices

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Cianobactérias .....	10
1.2 Florações de cianobactérias.....	14
1.3 Cianotoxinas.....	17
1.4 Legislação brasileira na qualidade de água .....	26
1.5 Métodos de análise e detecção das microcistinas.....	28
1.6 Validação de métodos analíticos .....	37
2.OBJETIVOS .....	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
3.1 Análises por MALDI-TOF-MS.....	44
3.2 Padrões comerciais e reagentes .....	44
3.3 Matrizes.....	44
3.4 Solventes .....	45
3.5 Cianobactérias .....	46
3.6 Meios de cultura.....	46
3.7 Esterilização .....	47
3.8 Cultivo e manutenção das cianobactérias.....	48
3.9 Espécies de cianobactérias adquiridas.....	49
3.10 Descarte das cianobactérias.....	50
3.11 Microscopia óptica .....	50
3.12 Limpeza da placa de MALDI.....	51
3.13 Identificação das cianotoxinas .....	52
3.14 Métodos de preparo de amostra .....	53
3.15 Procedimentos estatísticos.....	58
3.16 Análise de diferentes matrizes.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	64
4.1 Avaliação do método <i>vacuum drying adaptado</i> .....	64
4.2 Métodos de preparo de amostra para MALDI-MS .....	67

4.3 Otimização do método <i>vacuum drying adaptado</i> .....	74
4.4 Avaliação dos métodos de preparo de amostra .....	75
4.5 Análise quantitativa das microcistinas .....	79
4.6 Seleção de diferentes matrizes utilizando diferentes procedimentos no preparo da amostra.....	81
5. CONCLUSÃO .....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos ecossistemas aquáticos, através da descarga de esgotos industriais e domésticos, a extensa utilização de fertilizantes na agricultura e a falta de saneamento básico causam um enriquecimento artificial na água, que favorecem o crescimento exacerbado de cianobactérias, que é denominado de florações (AKPOR; MUCHIE, 2011; DOLMAN et al., 2012; TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 2007). As florações de cianobactérias em mananciais resultam em uma coloração visível, alterando o equilíbrio destes ecossistemas (BELTRÁN et al., 2012).

As cianobactérias são micro-organismos fotossintetizantes onde algumas de suas espécies podem produzir toxinas que causam danos à saúde humana (BELTRÁN et al., 2012; HOWARD; BOYER, 2007a). Cerca de 40 dos 150 gêneros conhecidos de cianobactérias são capazes de produzir estas toxinas (BOGIALLI et al., 2013), sendo as microcistinas (MCs), as toxinas mais encontradas em sistemas de água doce (HOWARD; BOYER, 2007a).

As microcistinas são peptídeos cíclicos hepatotóxicos cuja ocorrência já foi notificada em todos os continentes, sendo a microcistina-LR (MC-LR) a mais encontrada. A MC-LR já foi detectada em rios ou reservatórios em várias regiões do mundo, como na Espanha (ABOAL; PUIG, 2005), Estados Unidos (GRAHAM et al., 2004), China (DAI et al., 2008), Turquia (GURBUZ et al., 2009), Itália (MESSINEO et al. 2009) e Brasil (CARVALHO et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um valor máximo da MC-LR em águas para consumo humano. Este valor foi estabelecido devido à preocupação com os efeitos toxicológicos crônicos das microcistinas, tornando de grande importância a análise qualitativa e quantitativa das microcistinas (HOWARD; BOYER, 2007a).

### 1.1 Cianobactérias

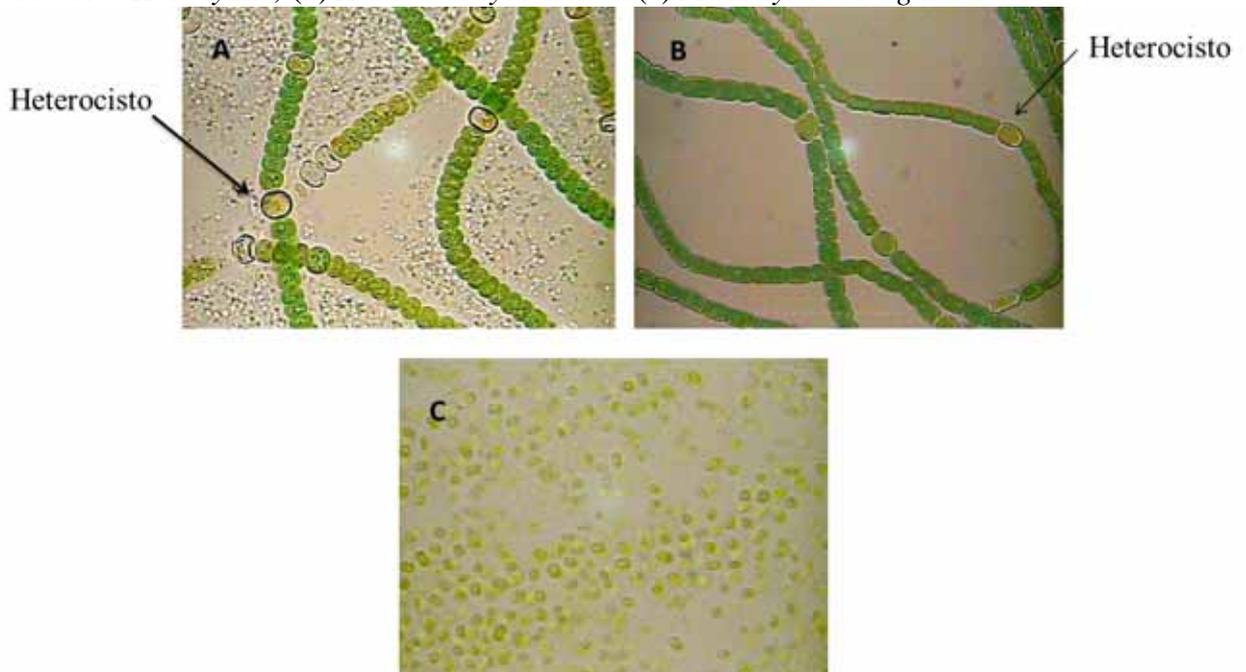
As cianobactérias pertencem ao domínio Bacteria e estão entre os organismos mais antigos do planeta Terra. Estas bactérias são consideradas fósseis vivos, pois apresentam poucas mudanças morfológicas entre as suas formas fossilizadas e a forma atual. Estudos indicam que as cianobactérias foram responsáveis na evolução da atmosfera oxidante de nosso planeta (MADIGAN et al., 2010).

As cianobactérias são micro-organismos fotossintetizantes, que apresentam os fotossistemas I e II, mas sem estes estarem organizados em cloroplastos, como nas plantas. Estas bactérias possuem a clorofila *a*, que transmite a luz verde, e o pigmento acessório ficocianina que transmite a luz azul. A vantagem dos pigmentos acessórios está na capacidade de absorver quantidades maiores de luz, aumentando a eficiência da fotossíntese (ZURAWELL et al., 2005).

Esses micro-organismos possuem uma grande diversidade morfológica, podendo ser filamentosos (*Planktothrix*, *Oscillatoria*), filamentosos com heterocistos (*Anabaena*, *Nodularia*), **Figura 1A e B**, e cocóides (*Microcystis*), **Figura 1C**, ocorrendo isoladamente ou em colônias (SHARMA; RAI; STAL, 2013).

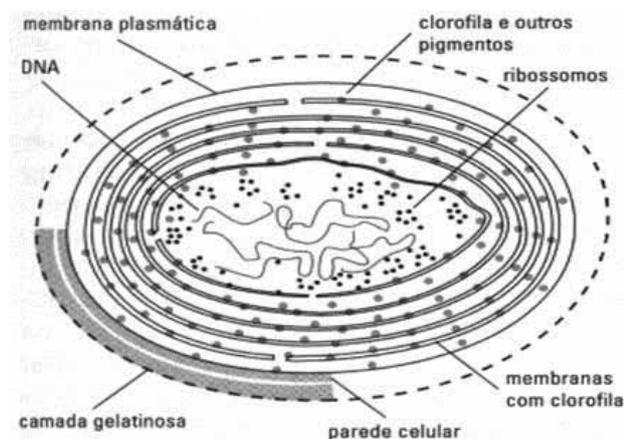
Os heterocistos são células especializadas e geralmente maiores que as células vegetativas, distribuídas ao longo ou na extremidade do filamento. Os heterocistos são responsáveis pela fixação do nitrogênio atmosférico (MADIGAN et al., 2010; CARVALHO et al., 2013). A **Figura 1** apresenta as cianobactérias que foram utilizadas nesta dissertação e suas diferenças morfológicas. As setas presentes nas **Figuras 1A e B** demonstram os heterocistos presentes nas espécies *Nodularia Harveyana* e *Anabaena cylindrica*.

**Figura 1.** Diferença morfológica das cianobactérias representada pelas espécies: (a) *Nodularia Harveyana*, (b) *Anabaena cylindrica* e (c) *Microcystis aeruginosa*.



As cianobactérias, por serem procariontes, não possuem organelas celulares como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndrias, **Figura 2**. O material genético é encontrado disperso no citoplasma, pois não possuem envoltório nuclear. A clorofila *a* fica dispersa em lamelas fotossintetizantes, que são ramificações da membrana plasmática. Estas bactérias também são constituídas de membrana plasmática, e possuem externamente uma bainha de mucilagem que promove a associação de grupos de células. (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; MADIGAN et al., 2010).

**Figura 2.** Estrutura celular de uma cianobactéria.



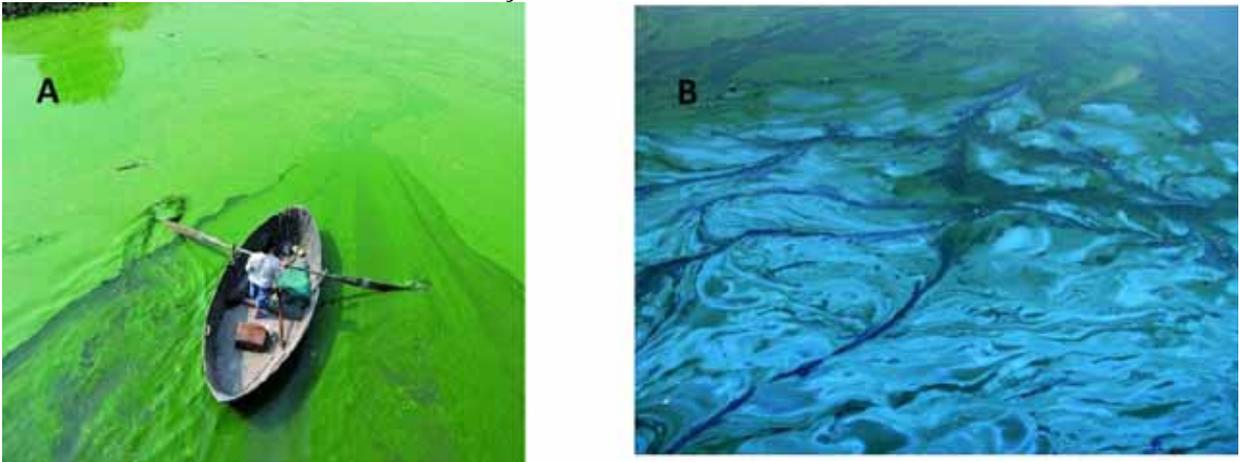
**Fonte:** Verdolin.

A ocupação das cianobactérias em diferentes ecossistemas se deve a sua elevada diversidade metabólica e algumas características fisiológicas. Algumas características como: capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, presença de pigmentos acessórios, presença de vacúolos de gás e a produção de toxinas são fatores que, no seu conjunto, podem explicar a grande adaptabilidade das cianobactérias (JODŁOWSKA; LATAŁA, 2013; ZURAWELL et al., 2005).

Devido a sua adaptação em diferentes habitats, as cianobactérias estão presentes nos mais variados ecossistemas, podendo ser encontradas nos ambientes terrestres, de água doce, salobra ou marinha, fontes termais, geleiras, e até em rochas GAO; AI; QIU, 2012; WANG et al., 2013). Mas são nos ecossistemas de água doce onde é mais comum encontrar estas bactérias, pois a maioria das espécies apresenta um melhor desenvolvimento em águas neutro alcalinas, com temperaturas entre 15 e 30°C, e com alta concentração de nutrientes, principalmente o nitrogênio e o fósforo (PAERL; OTTEN, 2013).

A proliferação das cianobactérias é um fenômeno natural, mas que tem se tornado mais frequente devido às atividades antropogênicas. A contaminação dos ecossistemas aquáticos, através, principalmente, do lançamento de esgotos e do uso de fertilizantes, faz com que haja um aumento anormal de compostos nitrogenados e fosfatado, favorecendo a formação de florações de cianobactérias (BECKER et al., 2010). A **Figura 3** apresenta algumas florações de cianobactérias em diferentes regiões do mundo.

**Figura 3.** (a) Floração de cianobactéria no lago Chao Hu, na China. (b) Lago Paterswoldsemeer, Holanda, com florações de cianobactérias.



**Fonte:** (a) Yang, 2013. (b) Schutte.

As florações de cianobactérias formam uma densa camada de células com alguns centímetros de profundidade. A presença da vesícula de gás proporciona a capacidade de flutuabilidade das cianobactérias, permitindo que esses organismos se movimentem ao longo da coluna d'água absorvendo a quantidade de luz ideal para a realização da fotossíntese (MADIGAN et al., 2010).

A presença de florações de cianobactérias traz sérias conseqüências para o homem, animais e para o meio ambiente. Estes micro-organismos alteram o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, através da formação de um biofilme superficial. Esta camada superficial altera a transparência da água, dificultando o crescimento de algas e plantas enraizadas que realizam a fotossíntese. Quando estas algas começam a morrer, uma grande quantidade de nutrientes fica disponível aos organismos decompositores. Estes organismos utilizam o pouco oxigênio disponível no processo de decomposição, conduzindo a desoxigenação do ambiente (BECKER et al., 2010).

Além disso, as cianobactérias são capazes de produzir toxinas (cianotoxinas) que afetam a potabilidade dos reservatórios de água e áreas recreacionais (BECKER et al., 2010). Ainda não se sabe ao certo porque essas cianotoxinas são produzidas, pois nem todas as florações de cianobactérias são compostas de espécies tóxicas. Vários pesquisadores sugerem que a produção pode estar associada a alelopatia, competição por recursos, condições de crescimento (VAN APELDOORN et al., 2007), ou por condições ambientais, como pH, nitrogênio, fósforo, luz e temperatura de crescimento (NELLAN et al., 2013).

Em 2007, duas cidades da China tiveram o abastecimento de água potável limitado devido à contaminação de seus reservatórios por cianotoxinas (TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 2007). No Brasil, em fevereiro de 1996, na cidade de Caruaru em Pernambuco, 116 dos 131 pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise começaram a apresentar sintomas de intoxicação após o tratamento. Destes, 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda e 52 vieram a falecer em dezembro do mesmo ano (AZEVEDO et al., 2002).

Os sintomas descritos pelos pacientes e o conhecimento prévio de florações de cianobactérias em reservatórios do nordeste brasileiro, levaram a hipótese de intoxicação por hepatotoxinas. Após as análises, foi confirmada a presença de microcistinas na água utilizada e em amostras de sangue e fígado dos pacientes (AZEVEDO et al., 2002).

Na cidade de Caruaru, a água era escassa e o seu fornecimento era irregular. A utilização de água transportada por caminhão pipa e sem o tratamento acabava sendo uma alternativa para contornar este problema. Devido a este problema, a água que abasteceu o reservatório da clínica não estava tratada, e estava contaminada com cianotoxinas. (CARMICHAEL et al., 1997).

Após quase 10 anos, foram realizadas mais análises nas amostras de soro e tecido hepático dos pacientes, que confirmaram as conclusões iniciais. Análises mais detalhadas da cianotoxina foram realizadas, revelando que a microcistina presente nas amostras era a MC-LR (YAUN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006).

## **1.2 Florações de cianobactérias**

As florações de cianobactérias em água doce, ecossistemas marinhos e costeiros de água salobra tem-se tornado um problema mundial, pois a frequência e a intensidade das

formações das florações têm aumentado na última década. Além dos efeitos negativos como a depleção de oxigênio durante o decaimento da biomassa, as cianobactérias são também capazes de produzir uma grande gama de compostos tóxicos que fazem mal a saúde do homem (BABICA; BLÁHA; MARŠÁLEK, 2006).

A ocorrência de florações de cianobactérias tem sido frequente nos mais variados ecossistemas do mundo: o lago Taihu, na China; o lago Grangent, na França; o lago Rotongaio, na Nova Zelândia (ROLLAND et al., 2013); mar Báltico, no Golfo da Finlândia, estuário do rio Neuse, na Carolina do Norte (EUA) (PAERL; OTTEN, 2013). Casos de florações de cianobactérias tóxicas já foram relatados em diversos reservatórios de água de água potável em diversas partes do mundo.

O reservatório hidroenergético de San Roque, em Córdoba na Argentina, é o principal fornecedor de água potável para a cidade. Este lago também é uma importante área de lazer, provocando um aumento na urbanização em seu entorno. Por cerca de 30 anos, florações de cianobactérias têm ocorrido neste reservatório, com intervalos de tempo variável e com intensidades diferentes. De outubro de 1998 a junho de 2002, amostras foram coletadas durante os eventos de floração, e a presença das MC-LR e MC-RR foram confirmadas em 97% dos casos estudados (RUIZ et al., 2013).

Na Sérvia há um problema de florações de cianobactérias e cianotoxinas, na maioria das águas doces superficiais. Estes corpos d'água são utilizados como reservatórios de abastecimento de água, sistemas de recreio, na indústria da pesca e sistemas de irrigação. Estudos realizados nos últimos 80 anos em Vojvodina, norte da Sérvia, demonstraram que em todos os ecossistemas aquáticos estudados, há condições que permitam as florações de cianobactérias. Dos 83 ecossistemas aquáticos analisados, 58 foram encontrados com condições favoráveis para a formação de florações de cianobactérias (PANTELIC' et al., 2013).

Na parte central da Sérvia, é muito arriscado ter reservatórios de abastecimento de água, pois dos 21 reservatórios que servem de abastecimento de água potável, nove foram detectados com florações de cianobactérias. As espécies de cianobactérias mais dominantes detectadas foram: *Aphanizomenon flosaquae*, *Anabaena circinalis*, *A. planktonica*, *A. flosaquae*, *Microcystis flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *Planktothrix rubescens*. Todas estas espécies produzem mais de um tipo de toxina (PANTELIC' et al., 2013).

No sul do Quebec, no Canadá, ao longo da última década, os eventos de florações de cianobactérias têm sido uma preocupação crescente em alguns lagos. O lago St Charles, é utilizado para o fornecimento de água potável para 285.000 habitantes na cidade de Quebec, onde as primeiras florações de cianobactérias foram relatadas no Outono de 2006. Desde 2006, a proliferação de cianobactérias nocivas como, *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*, vem aparecendo mais cedo no verão e persistindo por um período mais longo (ROLLAND et al., 2013).

No Brasil, espécies de cianobactérias tóxicas são amplamente distribuídas em todas as regiões. O laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Lect-IBCCF-UFRJ) realizou estudos em corpos d'água (reservatórios de abastecimento público, lagos artificiais, lagoas salobras e rios) dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Paraná, Bahia, Pernambuco e do Distrito Federal, comprovando a presença de espécies tóxicas de cianobactérias (FUNASA, 2003).

Sant'Anna & Azevedo, realizaram um estudo sobre a distribuição geográfica das cianobactérias potencialmente tóxicas, demonstrando que estas se encontram tanto na região tropical como na região subtropical do Brasil (SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000).

No Estado de São Paulo os reservatórios, Billings (região Metropolitana), Barra Bonita e Promissão, estão entre os que as florações de cianobactérias são mais frequentes (CETESB).

Em 2008, no Rio Grande do Sul, a FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler) incluiu, em pontos considerados críticos, a análise de identificação e contagem de cianobactérias no Projeto Balneabilidade. Na campanha de 2011-2012, foram realizadas análises nos balneários públicos: da Lagoa do Peixoto e da Lagoa do Horácio em Osório e em balneários da Lagoa dos Patos em Tapes e em São Lourenço do Sul. Destes, apenas foi detectada a presença de florações de cianobactérias no Balneário Prainha da Lagoa do Peixoto (município de Osório/RS). Nas análises, foi detectada a presença de microcistinas, tornando o Balneário impróprio para banho (FEPAM).

Casos de intoxicação pelo consumo oral de água contaminada com as cianotoxinas já foram descritos. Os relatos clínicos indicam que essas intoxicações acontecem como consequência do consumo acidental, falta de conhecimento ou deficiência na operação dos sistemas de tratamento da água. Muitas vezes há uma diminuição na biomassa das cianobactérias no reservatório, e quando as autoridades da saúde pública analisam, não

consideram aquela floração como um potencial de risco. A falta de conhecimento a respeito dos possíveis danos que a ocorrência de florações de cianobactérias pode causar leva a um processo de tratamento da água inadequado, expondo a população a possíveis águas contaminadas (FUNASA, 2003).

### **1.3 Cianotoxinas**

As cianotoxinas são metabólitos secundários produzidos por cianobactérias, com estruturas químicas e propriedades toxicológicas diferentes. A contaminação e a exposição a essas toxinas pode se dar de diferentes formas: práticas de esportes aquáticos, recreação em águas contaminadas, uso doméstico, consumo de água e alimentos (ŽEGURA; ŠTRASER; FILIPIČ, 2011; CAMPOS; VASCONCELOS, 2010).

As cianotoxinas são classificadas de acordo com os órgãos, tecidos ou células que afetam primariamente, sendo classificadas em: dermatotoxinas, neurotoxinas, hepatotoxinas e citotoxinas (BOCZEK et al., 2011; VAN APELDOORN et al., 2007).

#### **1.3.1 Dermatotoxinas (LPS)**

Todos os gêneros de cianobactérias possuem em sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS) que são pirogênicos e são agentes altamente inflamatórios (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013). Quando em contato com a pele ou por ingestão, estes LPS são capazes de provocar irritações (SIVONEN, 2009; VAN APELDOORN et al., 2007).

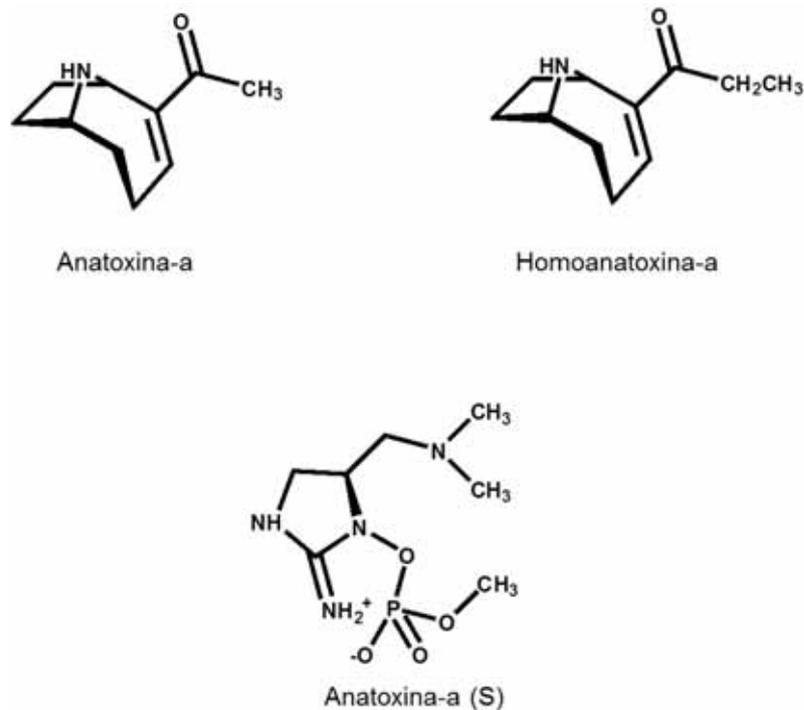
#### **1.3.2 Neurotoxinas**

As neurotoxinas interrompem a propagação normal dos impulsos nervosos para os músculos, causando paralisia e morte por insuficiência respiratória e asfixia (CARMICHAEL, 1994). Estas cianotoxinas são produzidas por cianobactérias do gênero: *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Oscillatoria* sp., *Trichodesmium* sp., *Lyngbya* sp. e *Cylindrospermopsis* sp., sendo conhecidos cinco diferentes tipos de neurotoxinas: anatoxina-a (S), anatoxina-a, homoanatoxina-a, neosaxitoxinas e saxitoxinas (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013; FUNASA, 2003; SIVONEN, 2009; VAN APELDOORN et al., 2007).

A anatoxina-a (S), **Figura 4**, se liga a acetilcolinesterase tornando-a incapaz de hidrolisar a acetilcolina, resultando na sobrestimulação das células musculares (ZURAWELL, 2005). Esta sobrestimulação das células musculares causa: fraqueza muscular, convulsões, dispnéia, seguida de morte (YAUN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006). A anatoxina-a (S) tem sido isolada das espécies *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii*, e é designada por "S", por causa do sintoma associado a salivação excessiva em vertebrados (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013).

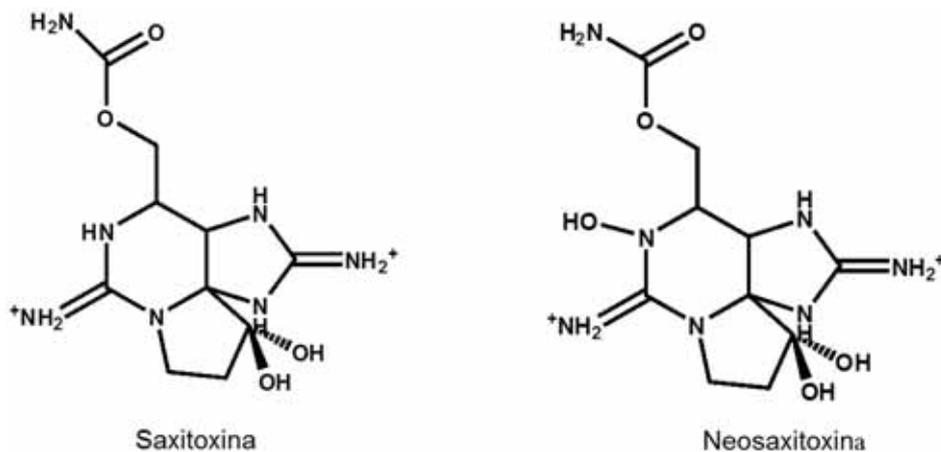
As toxinas anatoxina-a e a homoanatoxina-a, **Figura 4**, se ligam irreversivelmente aos receptores de acetilcolina, ou seja, atuam como bloqueadores neuromusculares que podem causar: paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão e morte, que pode ocorrer em poucos minutos (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013; SANT'ANNA et al., 2006; VAN APELDOORN et al., 2007). A anatoxina-a é produzida por três gêneros de cianobactérias: *Anabaena* sp., *Planktothrix* sp., e *Aphanizomenon* sp. (WESTRICK et al., 2010; ZURAWELL, 2005).

**Figura 4.** Estrutura química das neurotoxinas: anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a (S).



As saxitoxinas e neosaxitoxinas, **Figura 5**, inibem a propagação do impulso nervoso ao longo dos axônios. A entrada de íons de sódio em células nervosas através dos canais de sódio é então bloqueada, resultando na supressão dos estímulos musculares, incluindo os do sistema respiratório. Estas cianotoxinas provocam dessa forma a paralisia e falência respiratória (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013; VAN APELDOORN et al., 2007).

**Figura 5.** Estrutura química das neurotoxinas: saxitoxinas e neosaxitoxinas.



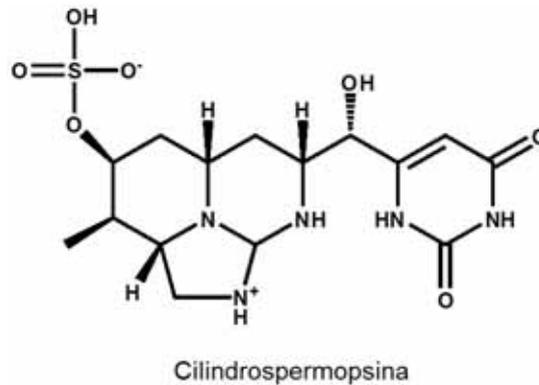
As Saxitoxinas são produzidas em vários gêneros de cianobactérias, como: *Aphanizomenon*, *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. e *Cylindrospermopsis* sp. (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013; WESTRICK et al., 2010).

### 1.3.3 Citotoxinas

As citotoxinas causam a inibição da síntese de proteínas e a quebra da cadeia de DNA, promovendo a hepatotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade nos organismos (WESTRICK et al., 2010). Os órgãos afetados por essas cianotoxinas são: fígado, rim, coração, pulmão, glândulas supra-renais, baço e timo.

A cilindrospermopsina, **Figura 6**, uma citotoxina, foi isolada das espécies: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* e *Aphanizomenon ovalisporum* (FUNASA, 2003; MOREIRA et al., 2012; SIVONEN, 2009; ŽEGURA; ŠTRASER; FILIPIČ, 2011).

**Figura 6.** Estrutura química da cilindropermopsina.

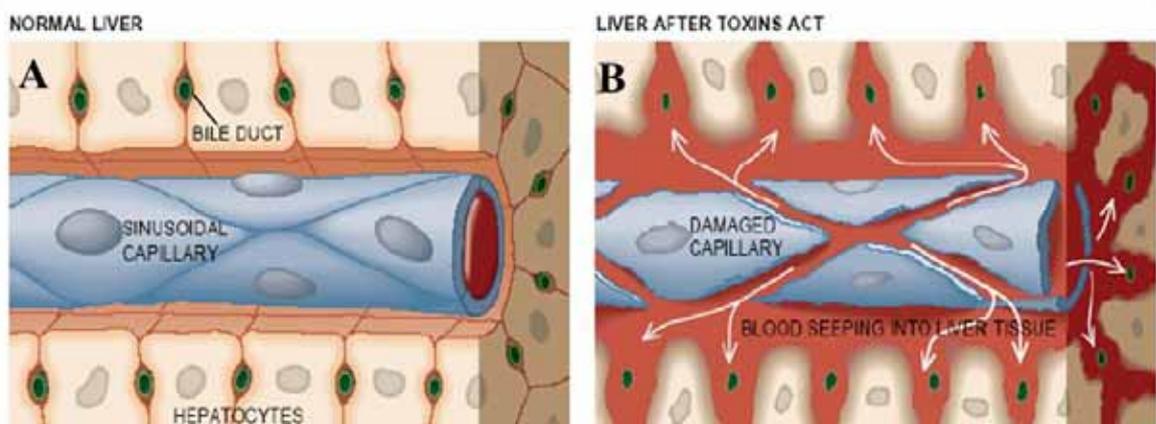


### 1.3.4 Hepatotoxinas

As Hepatotoxinas são toxinas que possuem como local de ação as células do fígado (hepatócitos), porém algumas não atuam diretamente no fígado, são apenas carregadas para este órgão, onde acabam se concentrando e tendo-o como local de ação (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013).

Estas toxinas atuam inibindo as proteínas fosfatases. Esta inibição leva a um excesso de fosforilação resultando em alterações no citoesqueleto, a perda da forma da célula com a subsequente destruição das células hepáticas, causando hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010). A **Figura 7** apresenta como a toxina age nas células hepáticas.

**Figura 7.** Células do fígado antes e após a intoxicação por hepatotoxinas.



Fonte: Carmichael, 1994.

A **Figura 7A** representa uma célula hepática normal, e a **Figura 7B** representa a alteração das células hepáticas devido a ação das hepatotoxinas, tendo como consequência a hemorragia intra-hepática devido à ação das hepatotoxinas.

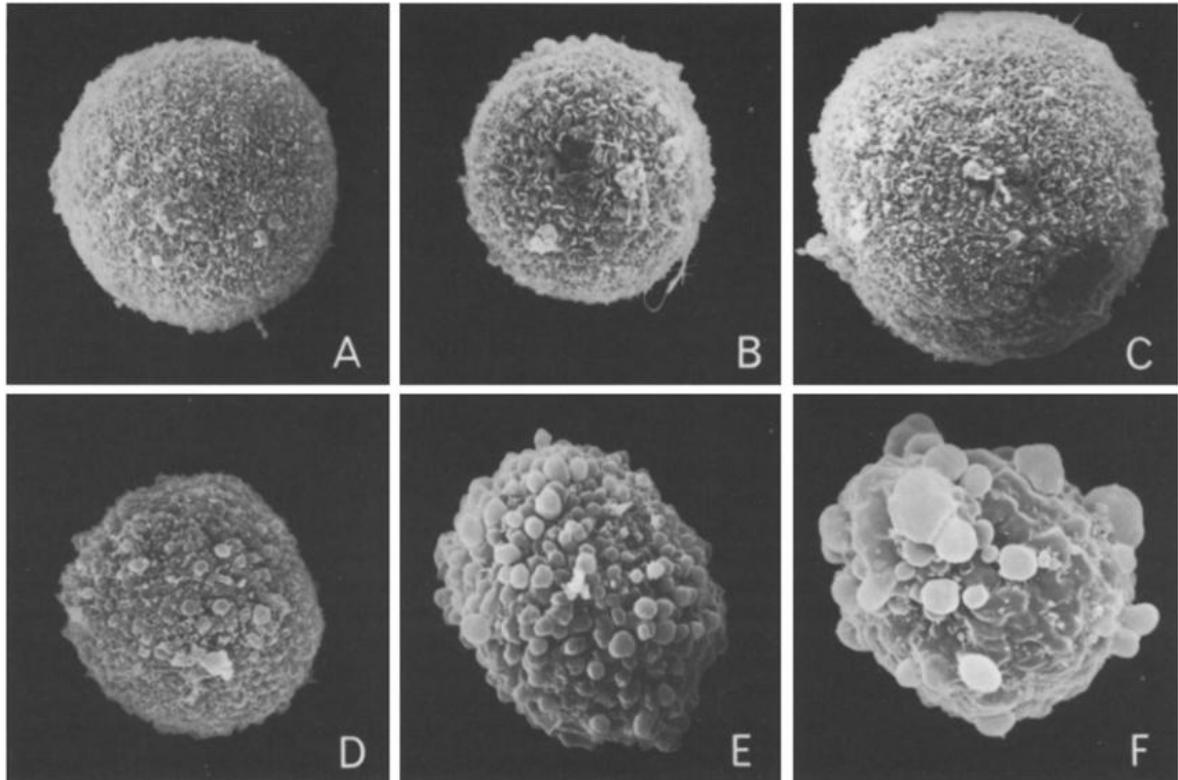
As microcistinas e as nodularinas (NODs) são as toxinas que pertencem ao grupo das hepatotoxinas (SIVONEN, 2009; VAN APELDOORN et al., 2007).

#### 1.3.4.1 Microcistinas

As microcistinas, o grupo mais estudado das cianotoxinas, são produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp. e *Cylindrospermopsis* sp. (MAERZEC et al.; 2013). Estas hepatotoxinas são peptídeos não-ribossomais, que são sintetizados por um complexo de proteínas multifuncionais contendo enzimas sintetases de peptídeo não-ribossomal (PNR) e sintetases de policetídeos (PKS) (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010). As microcistinas agem inibindo as proteínas fosfatases 1 e 2A (NELLAN et al., 2013).

Runnegar e colaboradores analisaram o efeito de diferentes microcistinas produzidas pela espécie *Microcystis aeruginosa* em hepatócitos isolados do fígado de um rato. A **Figura 8** demonstra a seguinte sequência de análises realizadas: (A) hepatócito controle; (B) hepatócito 5 minutos após a adição de 0,05 µg/ml da toxina; (C) após 10 minutos; (D) 20 minutos depois. (E) Hepatócito 5 minutos após a incubação com 1,0 µg da toxina; (F) após 20 minutos (RUNNEGAR; FALCONER; SILVER, 1981). Estas análises demonstraram que a toxina causou a degeneração dos hepatócitos e sua necrose (RUNNEGAR; FALCONER; SILVER, 1981).

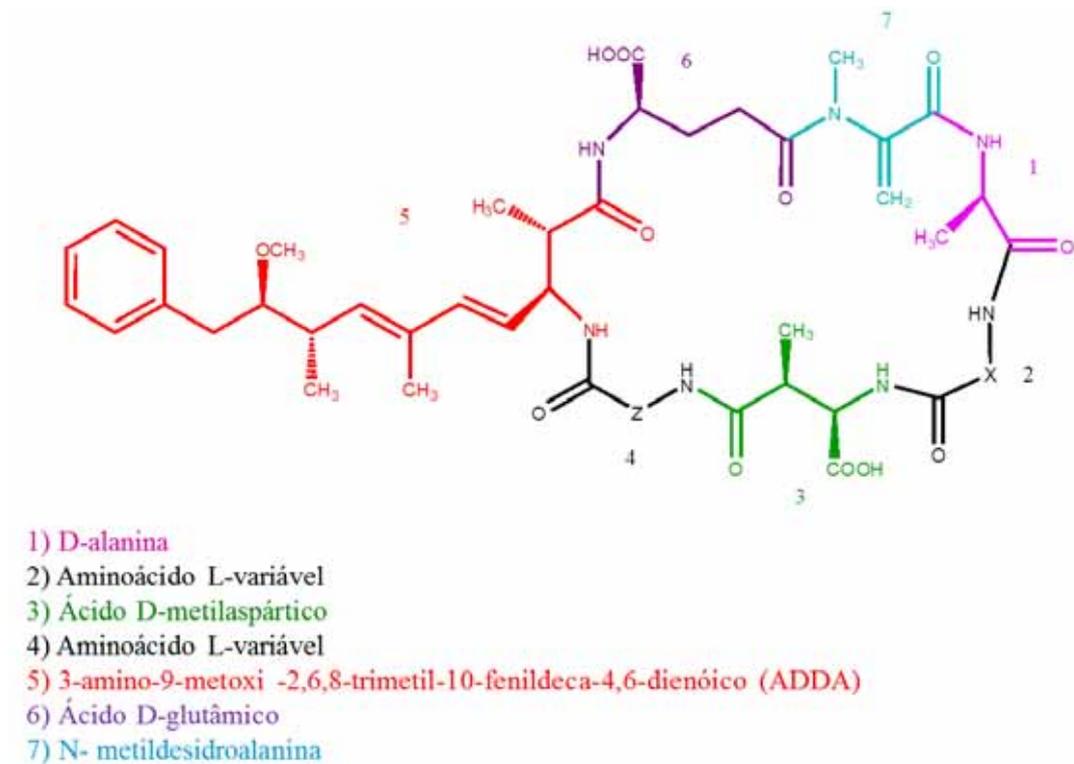
**Figura 8.** Fotografias realizadas em um microscópio eletrônico de varredura mostrando o efeito da toxina nos hepatócitos.



**Fonte:** Runnegar; Falconer; Silver, 1981.

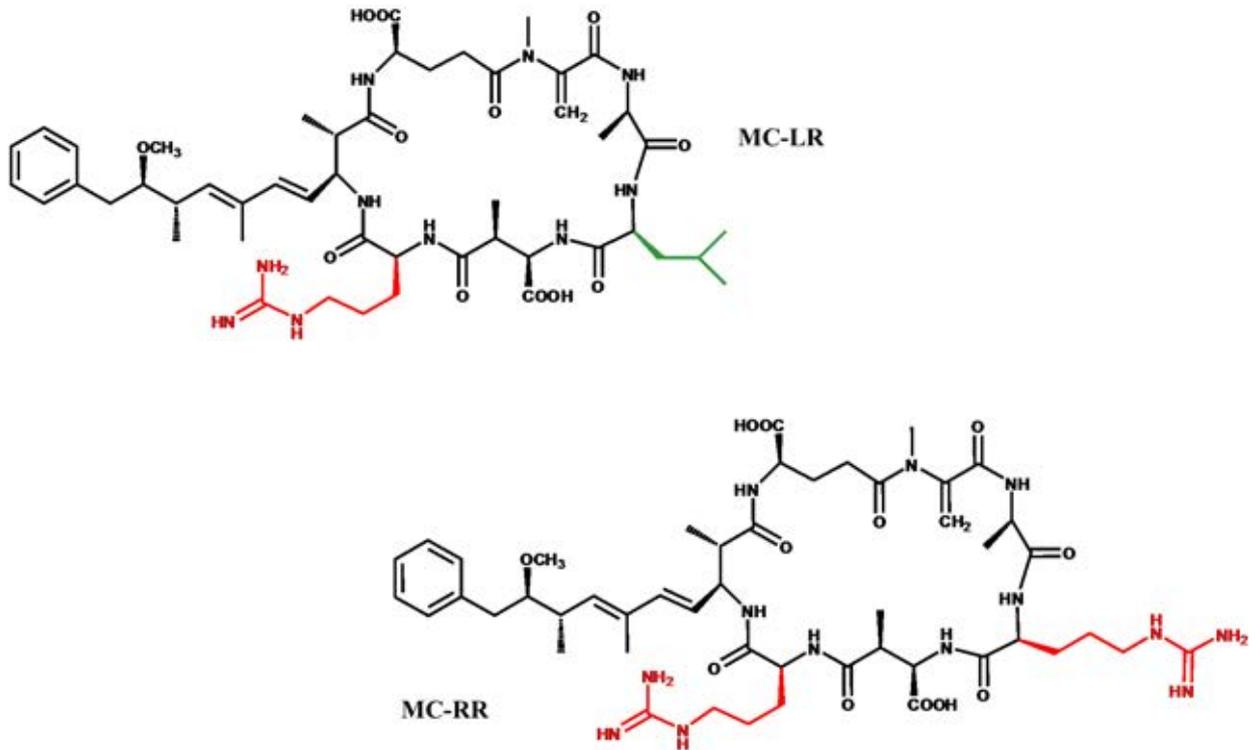
As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos formados por 5 aminoácidos não proteínogênicos e dois L-aminoácidos variáveis nas posições 2 e 4, consistindo na estrutura ciclo (D-alanina<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-glutamato<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>), **Figura 9**. O aminoácido incomum, Adda, é o ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (DEL CAMPO; OUAHID, 2010; LABINE; MINUK, 2009).

**Figura 9.** Estrutura geral das microcistinas.



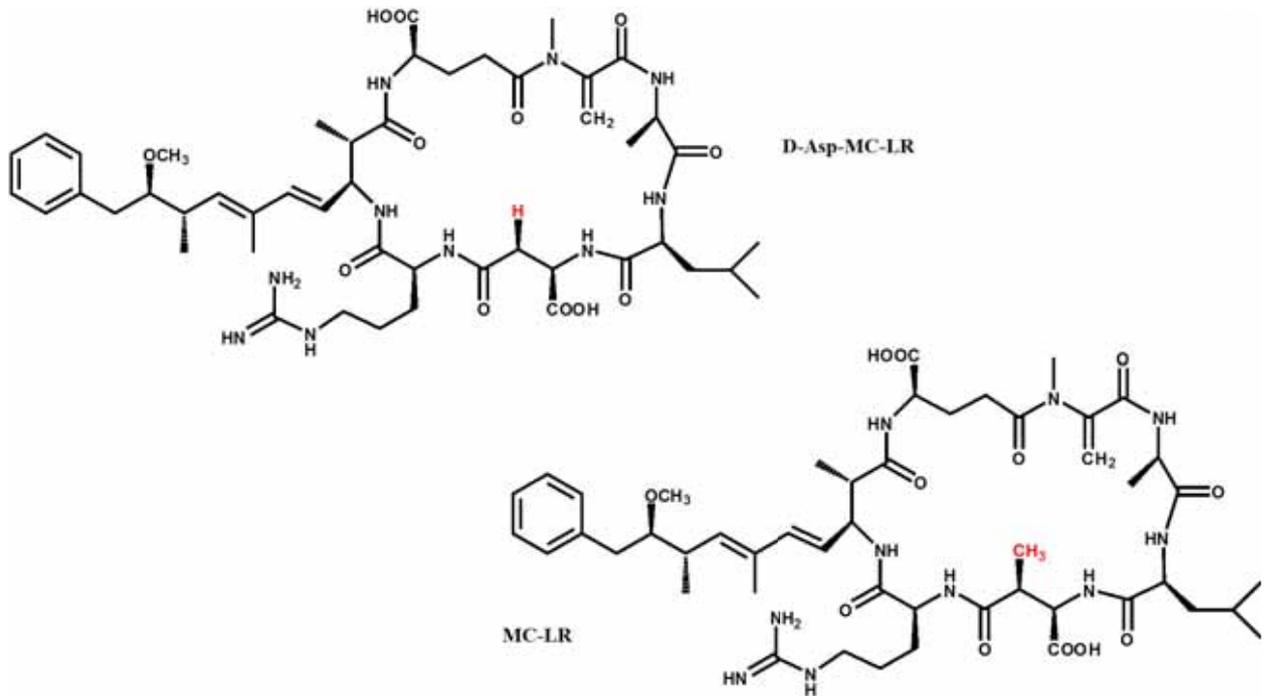
A classificação das microcistinas é baseada, principalmente, nas variações dos aminoácidos nas posições 2 e 4, **Figura 10**. Como por exemplo, a MC-LR, que na posição 2 tem uma leucina (aminoácido destacado em verde) e na posição 4 uma arginina (aminoácido destacado em vermelho). Ou a MC-RR que na posição 2 tem uma arginina e na posição 4 possui uma outra arginina.

**Figura 10.** Estruturas das microcistinas e suas variações nas posições 2 e 4.



Outras variações, que também influenciam na classificação das microcistinas, são as metilações e desmetilações (MINUK, 2009). A **Figura 11** demonstra a variação entre a D-Asp-MC-LR e a MC-LR.

**Figura 11.** Variação nas estruturas das microcistinas: D-Asp-MC-LR e a MC-LR.

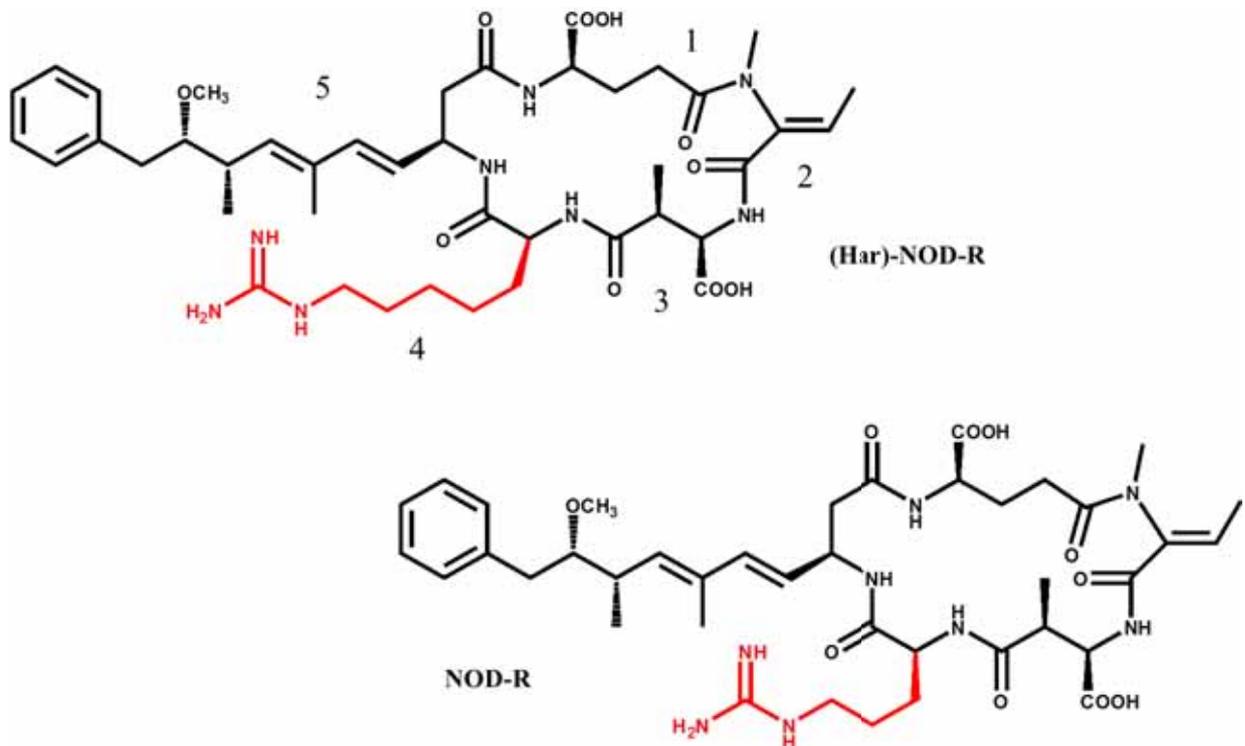


A D-Asp-MC-LR possui uma desmetilação no ácido aspártico na posição 3, quando comparada com a MC-LR. Essas variações na estrutura das microcistinas têm como resultado um conjunto de mais de 85 variantes de MCs (NELLAN, 2013).

#### 1.3.4.2 Nodularinas

As nodularinas são pentapeptídeos cíclicos, geralmente, isoladas da espécie *Nodularia spumigena*. Estas hepatotoxinas também são classificadas de acordo com o aminoácido variante e diferentes graus de metilação. A **Figura 12** apresenta a (Har)-NOD-R com suas posições numeradas, e sua diferença com relação à NOD-R. A (Har)-NOD-R possui um homólogo da arginina na posição quatro.

**Figura 12.** Diferentes Nodularinas: (Har)-NOD-R e NOD-R e suas variações (destacado em vermelho).



Aproximadamente 8 variantes de nodularinas já foram caracterizadas (DITTMANN; FEWER; NELLAN, 2013; LABINE; MINUK, 2009; SIVONEN, 2009).

#### 1.4 Legislação brasileira na qualidade de água

Em função dos riscos potenciais à saúde, à preservação da vida aquática, e o aumento de florações de cianobactérias em diversas regiões brasileiras, o gerenciamento e o controle destes organismos em ambientes aquáticos vem ganhando espaço na legislação nacional (CARVALHO et al., 2013).

A legislação brasileira de qualidade de água para consumo humano, Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, determina as ações específicas relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, assim como o seu padrão de potabilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

De acordo com a Portaria 2914/2011, quando o número de células de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL, o monitoramento da qualidade de água de sistemas de

abastecimentos, deve ser realizado mensalmente. E quando esse valor for excedido, o monitoramento deve ser realizado semanalmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Análises semanais de cianotoxinas na água de saída do tratamento e nas entradas (nas indústrias de injetáveis e hidrômetros das clínicas de hemodiálise), também são exigidas, quando o número de cianobactérias na água do manancial exceder 20.000 células/mL. O uso de algicidas, ou qualquer intervenção no monitoramento que provoque a lise celular, também é vetado, quando o número de cianobactérias exceder 20.000 células/mL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A concentração máxima aceitável de algumas cianotoxinas também são requisitos para o controle da qualidade da água. Estudos de toxicidade oral foram realizados em camundongos e porcos (FAWELL et al., 1994; FALCONER et al., 1994), onde através dos resultados obtidos, foi estabelecido um valor de ingestão diária aceitável para a MC-LR de 0,04 µg/Kg (CHORUS; BARTRAM, 1999). A partir desse valor, foi adotado um limite máximo, pela Organização Mundial da Saúde, de 1µg/L de MC-LR na água potável. Este valor também foi incluído na Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde. (CARVALHO et al., 2013).

Outras cianotoxinas como as saxitoxina e cilindrospermopsina, também possuem um limite máximo admissível pela legislação brasileira. O limite estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde para a saxitoxina é de 3,0 µg/L e para a cilindrospermopsina o valor é de 1,0 µg/L. A anatoxina-a (S) não possui um limite máximo admissível, porém há uma recomendação para a detecção dessa toxina quando for identificada a presença de cianobactérias com potencial para produzir essa cianotoxina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A ocorrência das cianotoxinas já é constatada em todo o mundo, tornando de grande importância a sua detecção antes do fornecimento água para a população. As ações de controle e monitoramento da qualidade são precárias para muitos municípios brasileiros, dificultando o controle das florações de cianobactérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O desenvolvimento de metodologias para a detecção e quantificação dessas cianotoxinas é de grande importância no auxílio e controle da qualidade da água para as populações.

## 1.5 Métodos de análise e detecção das microcistinas

As técnicas convencionais de observação em microscópio ótico, isolamento e cultivo de micro-organismos, geralmente, são as técnicas mais utilizadas para identificar as espécies responsáveis pelas florações de cianobactérias (BOUVY et al., 1999; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013) porém, linhagens de uma mesma espécie que possuem a mesma morfologia, podem apresentar diferenças em relação à sua toxicidade. A espécie *Microcystis aeruginosa*, por exemplo, possui linhagens que produzem toxinas e outras não (MEISSNER; DITTMAN; BÖRNER, 1996).

Devido à necessidade de monitorar os ecossistemas aquáticos e desde que a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) estipulou que o padrão para MCs em águas de abastecimento é de 1µg/L, muitas técnicas foram aplicadas para a detecção e quantificação de cianotoxinas na água (GAMBARO et al., 2012; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013), dentre elas: cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), ensaios de inibição da proteína fosfatase (Protein Phosphatase Inhibition Assay - PPIA), testes imunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) (PUDDICK et al., 2012; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013; VIEIRA et al., 2012), bioensaios em camundongos (WHITTON; POTTS, 2000; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013) e reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (AL-TEBRINEH et al., 2011).

### 1.5.1 Testes imunoenzimáticos

O teste imunoenzimático ELISA, é um teste bioquímico que mede a concentração de uma substância em uma amostra, utilizando a reação de um anticorpo ou anticorpos para os seus antígenos (BIRUNGI; LI, 2009; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013). Estes ensaios foram desenvolvidos utilizando anticorpos policlonais e monoclonais, onde vários Kits ELISA já estão disponíveis comercialmente (MCELHINEY; LAWTON, 2005).

Estes ensaios consistem basicamente nas reações entre anticorpo e antígeno, onde após um tempo de incubação, procede-se a análise por absorção espectrofotométrica a 450 nm. A coloração resultante é inversamente proporcional à concentração da toxina presente na amostra analisada (MCELHINEY; LAWTON, 2005).

O método ELISA tem se mostrado útil na triagem de amostras de água e de cianobactérias, mas este método é limitado na identificação das variantes de microcistinas. A maioria destes ensaios empregam anticorpos contra uma microcistina específica. Como resultado, muitas variantes que ocorrem naturalmente não são detectadas (LAWTON; EDWARDS, 2008; PUDDICK et al., 2012).

### **1.5.2 Ensaios de inibição da proteína fosfatase**

As microcistinas são toxinas que inibem as proteínas fosfatases PP1 e PP2A responsáveis pela defosforilação de proteínas celulares (COVACI et al., 2012). O método PPIA é um método sensível para a triagem de microcistinas, que utiliza a atividade bioquímica dessas toxinas para a detecção e quantificação.

Este ensaio quantifica o fosfato que é liberado pelas proteínas fosforiladas, comparando a taxa de inibição das proteínas com uma curva padrão já conhecida. No entanto, esta reação inibitória não possibilita identificar as variantes de microcistinas presentes na amostra e pode ter interferência de outros inibidores naturais da fosfatase, gerando um resultado falso positivo para microcistinas (ANN; CARMICHAEL, 1994; NICHOLSON; BURCH, 2001; RAPALA et al., 2002).

### **1.5.3 Bioensaios em camundongos**

Os camundongos são os animais mais utilizados para os testes de toxicidade para cianotoxinas. A toxicidade é testada através de uma injeção intraperitoneal de uma suspensão de células de cianobactérias preparadas, que sofreram a lise celular (HARADA, KONDO; LAWTON, 1999).

O bioensaio em camundongos é um método pouco sensível e não adequado para a quantificação devido ao elevado número de ratos envolvidos e, geralmente, é necessário uma licença para utilizá-los (BIRUNGI; LI, 2009; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013). Este ensaio sofreu também uma crescente oposição pública devido a utilização de animais em testes de toxicidade (MCELHINEY; LAWTON, 2005).

#### 1.5.4 Reação em cadeia da polimerase

Com o desenvolvimento de métodos para a detecção e caracterização dos ácidos nucleicos, novas abordagens para o monitoramento ambiental de florações de cianobactérias estão surgindo (AL-TEBRINEH et al., 2011).

A técnica reação em cadeia da polimerase fornece uma abordagem na detecção de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas através do uso de marcadores moleculares taxonômicos em genes envolvidos na biossíntese das toxinas (AL-TEBRINEH et al., 2011; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013).

Estudos relatam que as células de cianobactérias com a presença dos genes *mcy*, está correlacionada com sua habilidade para sintetizar microcistinas. Essa informação auxilia muito quando se estuda esta região do genoma na identificação de espécies tóxicas presentes no meio ambiente (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013; SANGOLKAR; MASKE; CHAKRABARTI, 2006).

#### 1.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica que possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.

Nas análises por HPLC, os detectores de ultravioleta (UV) são os mais utilizados para a detecção de cianotoxinas (MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006; SANGOLKAR; MASKE, CHAKRABARTI, 2006).

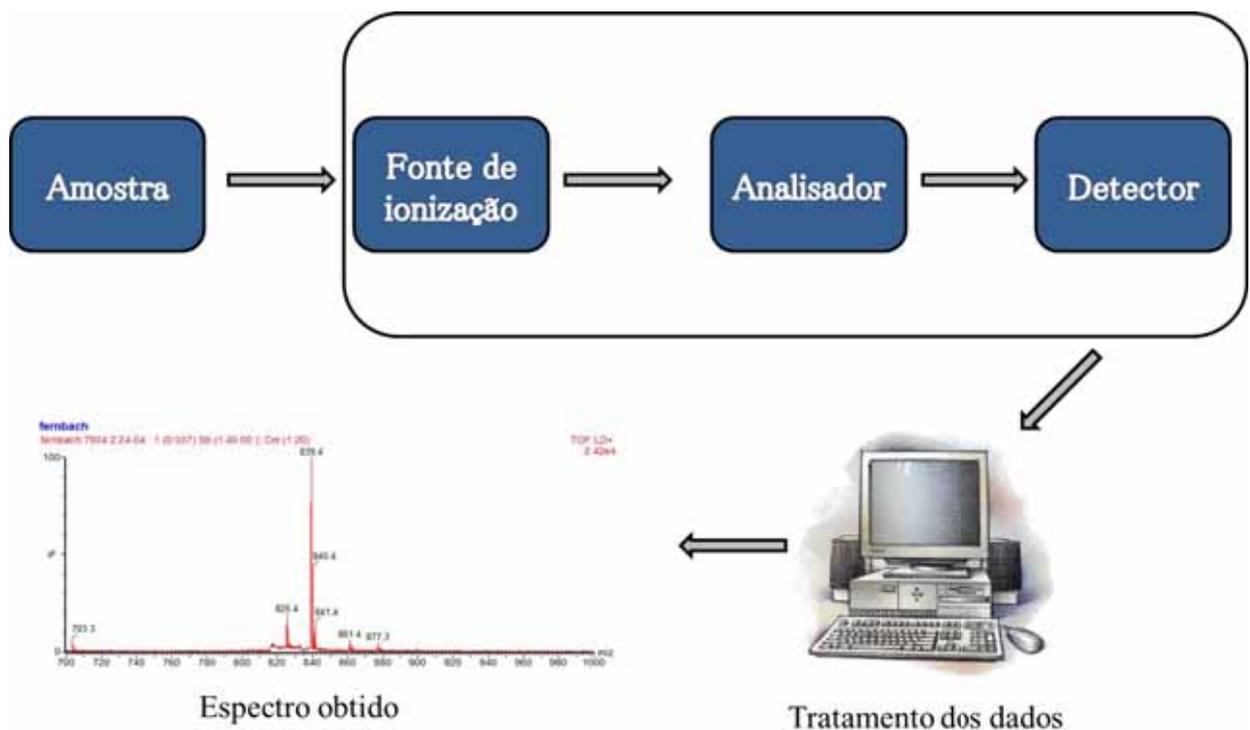
Uma limitação dessa técnica é o tempo necessário no preparo de amostra, o tempo de análise e suas influências nos resultados. Os processos de pré-tratamento da amostra, tais como: extração, concentração e purificação, assim como os solventes utilizados, apresentam significativa diferença na quantificação de algumas variáveis de microcistina (MCELHINE; LAWTON, 2005; RAPALA et al., 2002). A determinação quantitativa também é problemática devido a diferença nos coeficientes de absorção das variantes das MCs (HOWARD; BOYER, 2007b; YEN; LIN; LIAO, 2011).

Uma forma de se utilizar a técnica HPLC é hifená-la a um espectrômetro de massas. Essa técnica além de permitir monitorar massas específicas e identificar por tempo de retenção (MILES et al., 2012; PUDDICK et al., 2012; SANGOLKAR; MASKE; CHAKRABARTI, 2006), é conhecida pela sua alta sensibilidade e especificidade na análise de cianotoxinas (CESARINO; SALMASO, 2012; SHAN et al., 2011).

### 1.5.6 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) é atualmente uma das técnicas analíticas mais versáteis e sensíveis, com aplicação em diversas áreas e estudos. O espectrômetro de massas é composto de três partes essenciais: fonte de ionização, analisador e detector, **Figura 13** (WELKER et al., 2002).

**Figura 13.** Componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: **Milagre**

A análise por MS consiste na geração de íons através de uma fonte de ionização. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga ( $m/z$ ) em um analisador

de massas e detectados. A magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (WELKER et al., 2002).

Inicialmente, a técnica MS era restrita à análise de gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis, limitando os tipos de análise. Com o desenvolvimento de técnicas como: Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) (CARROLL et al., 1975), Electrospray Ionization (ESI) (FENN et al., 1989), Matrix-Assisted Laser Desorption (MALDI) (KARAS; HILLENKAMP, 1988), Sonic Spray Ionization (SSI) (HIRABAYASHI; SAKAIRI; KOIZUMI, 1995), Desorption Eletrospray Ionization (DESI) (TAKATS et al., 2004) e Easy Ambient Sonic-spray Ionization (EASI) (HADDAD; SPARRAPAN; EBERLIN, 2006), houve uma extensão na aplicação da MS no estudo e análise de todos os tipos de moléculas, inclusive análise de metabólitos secundários, proteínas, enzimas de organismos distintos e identificação de micro-organismos (GAMBARO et al., 2012; GAZZAH et al., 2013; SINGH; VERMA, 2012; VAN OUDENHOVE; DEVREESE, 2013).

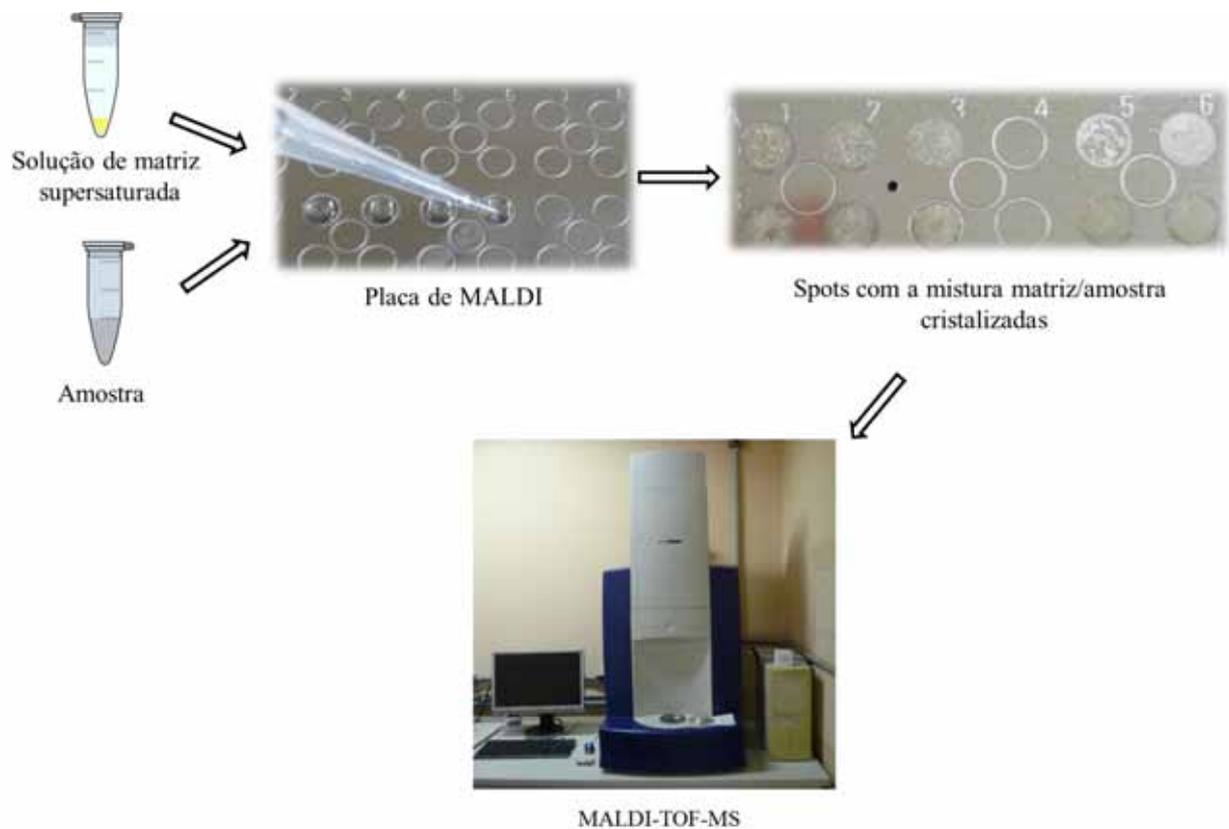
### 1.5.7 Matrix-Assisted Laser Desorption – Mass Spectrometry (MALDI-MS)

A ionização/dessorção a laser assistida por matriz - MALDI foi desenvolvida por Karas e Hillenkamp em 1988. Esta técnica permite a ionização na fase gasosa de compostos de alta massa molecular e não voláteis, como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos que são difíceis de serem ionizadas (JASKOLLA; KARAS, 2011; WELKER et al., 2002).

Na ionização por MALDI uma solução com uma matriz supersaturada é preparada e adicionada com a amostra no spot da placa de MALDI. Existem diversos métodos de preparo de amostra para MALDI-MS na literatura, onde cada método possui uma solução de matriz supersaturada e um procedimento para a aplicação da solução de matriz e da amostra na placa.

Após a evaporação do solvente, essa mistura matriz/amostra irá cristalizar, e a placa será então inserida no espectrômetro de massas e analisada. A **Figura 14** representa uma sequência, simplificada, de como as análises são realizadas por MALDI-MS.

**Figura 14.** Esquema simplificado de um procedimento para uma análise por MALDI-MS.



Fonte: [Milagre](#)

As matrizes utilizadas em uma análise por MALDI-MS, geralmente, são ácidos orgânicos aromáticos de baixa massa molecular (HOSSAIN; LIMBACH, 2010). Para um composto ser utilizado como matriz deve possuir algumas características como:

- a) Ser solúvel em solventes compatíveis com o analito;
- b) Absorver no comprimento de onda do laser, o que permite que a energia seja absorvida pela matriz e não no analito;
- c) Não reagir com o analito;
- d) Dever ser estável em condições de vácuo;
- e) Deve promover a co-dessorção do analito em resposta a irradiação do laser (COLE, 2010).

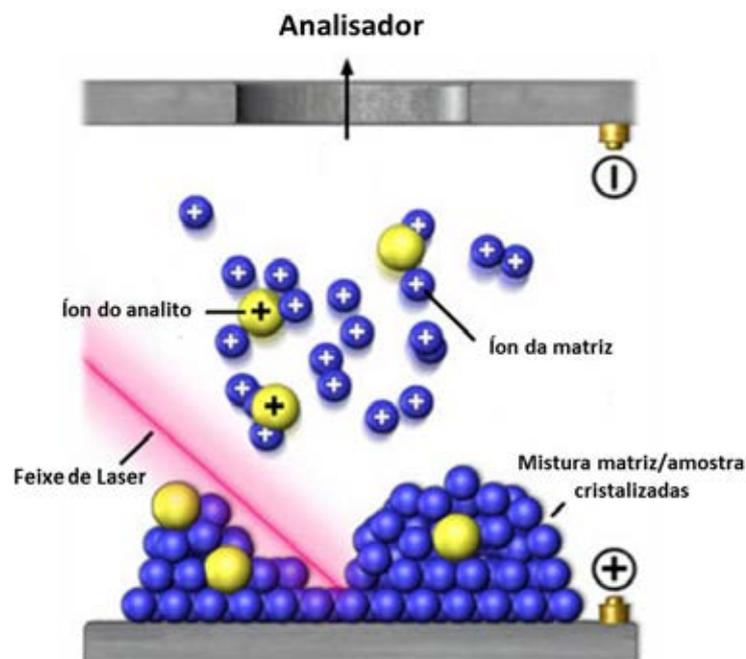
A **Tabela 1** demonstra algumas matrizes utilizadas para MALDI-MS.

**Tabela 1.** Matrizes utilizadas nas análises para MALDI-MS.

Matrizes	Analito
<b>Ácido <math>\alpha</math>-ciano-4-hidroxicinâmico</b>	Proteínas, Peptídeos, Polissacarídeos
<b>Ácido Gentísico</b>	Proteínas, Peptídeos, Lipídeos, Polissacarídeos, Polímeros
<b>Ácido Sinapínico</b>	Proteínas, Peptídeos
<b>Ácido Caféico</b>	Proteínas, Peptídeos

Fonte: Sigma Aldrich, 2012.

As matrizes utilizadas nas análises por MALDI-MS devem absorver energia no comprimento de onda do laser. Esta energia absorvida pela matriz irá fazer com que a mistura matriz/amostra seja ‘lançada’ para o analisador. (DREISEWERD, 2003). A **Figura 15** representa o laser incidindo sobre a mistura matriz/amostra no spot, e “lançando” o analito para o analisador. Para o analito ser analisado por MALDI-MS, tem que ocorrer uma incorporação homogênea do analito na estrutura cristalina da matriz.

**Figura 15.** Esquema representando o processo de ionização/dessorção por MALDI-MS.

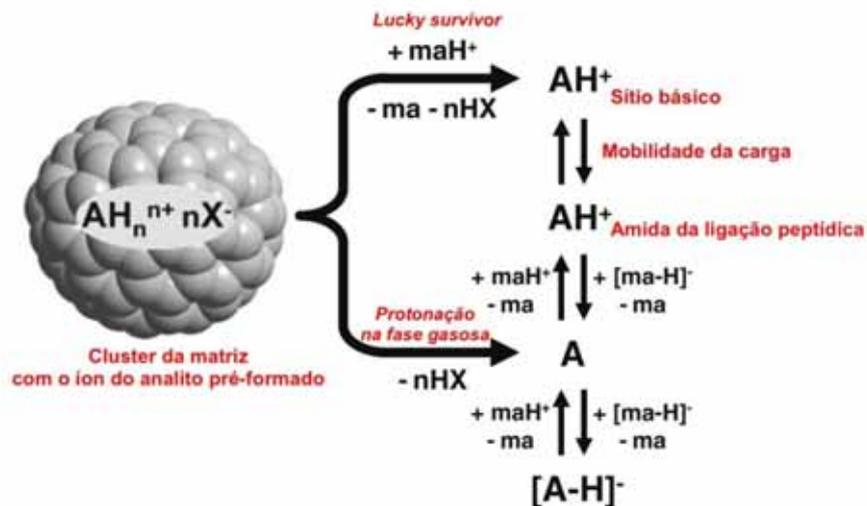
Fonte: Hendrickson, 2014.

O processo de ionização por MALDI ainda não é completamente elucidado, existindo dois modelos que sugerem o princípio desse processo: “protonação da fase gasosa” e “lucky survivor”. O modelo “protonação da fase gasosa” propõe que um feixe de laser incida sobre a mistura matriz/amostra induzindo a vaporização do analito incluso na matriz. A formação de íons ocorre pela transferência de carga (protonação ou desprotonação) das moléculas da matriz para o analito. As moléculas ionizadas são então aceleradas e detectadas na forma de íons (KNOCHENMUSS, 2006), **Figura 15**.

O modelo “lucky survivor” postula que em condições típicas de preparação, as classes de analito preferencialmente investigadas, já estão carregadas e seriam, portanto, incorporadas nos cristais da matriz como analitos previamente carregados junto com os seus contraíons. Com a ablação dos clusters, produzido pelo pulso de laser, a maioria das moléculas são re-neutralizadas e somente aquelas que permaneceram carregadas são detectadas (JASKOLLA; KARAS, 2011).

Karas e Thorsten realizaram um estudo para uma compreensão mais profunda sobre esses dois modelos, **Figura 16**, e além de verificar que as duas propostas contribuem no processo de ionização por MALDI, vários parâmetros como, intensidade do laser, preparo de amostra, composição do analito e matriz influenciam na ionização (JASKOLLA; KARAS, 2011).

**Figura 16.** Mecanismo unificado de protonação do analito por MALDI.

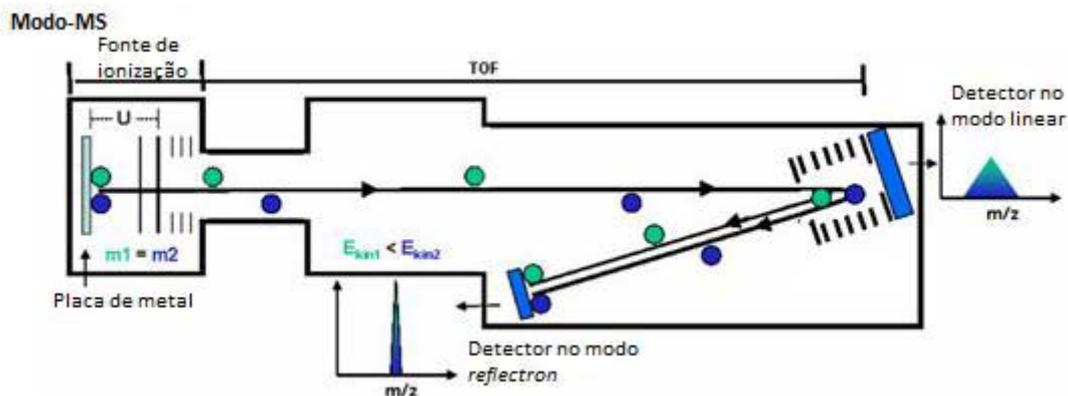


Fonte: Jaskolla; Karas, 2011.

O analisador utilizado no MALDI-MS geralmente é do tipo tempo de voo (TOF- Time Of Flight), o qual identifica a molécula ionizada pelo seu tempo de voo em um tubo de vácuo até chegar ao detector, ou seja, uma vez que a amostra foi ionizada, será acelerada por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo onde será separada em função da sua massa molécula e sua carga ( $m/z$ ).

Existem dois modos de analisadores TOF: linear ou reflectron, **Figura 17**. No modo linear os íons percorrem uma trajetória linear até chegar ao detector localizado no final do tubo. Esse modo é utilizado para analisar moléculas de grande massa molecular. No modo reflectron essa trajetória é alterada pela presença de um espelho no final do tubo, aumentando o caminho percorrido pelos íons até chegarem a outro detector. O modo reflectron é utilizado para moléculas de baixa massa molecular.

**Figura 17.** Esquema geral de um espectrômetro de massas MALDI-TOF.



**Fonte:** Fraunhofer, 2007.

A técnica MALDI-TOF MS tem se mostrado uma eficiente ferramenta na detecção de microcistinas devido ao rápido tempo de análise e preparo de amostra, pela identificação de muitas variáveis de MCs e por ser também adequada na automatização do preparo de amostra e na aquisição de dados (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008), se tornando a tecnologia ideal para analisar rapidamente um grande número de amostras com microcistinas.

## 1.6 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico ou a adaptação de um método já conhecido envolve diversos parâmetros que avaliem o bom desempenho desse método. Essa avaliação é denominada validação (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

A validação de um método analítico tem por finalidade comprovar e assegurar o seu desempenho. Na validação será constatada a confiabilidade, a qualidade e a aplicabilidade dos seus resultados obtidos (ANVISA, 2003). Um processo de validação tem início no seu planejamento, e prossegue ao longo de seu desenvolvimento e, se for bem documentado e definido, oferece evidências às agências reguladoras que é adequado, e que o laboratório tem competência técnica para executar as análises (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, os órgãos que credenciam a validação de métodos analíticos, são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de método analíticos.

Ao validar uma determinada metodologia deve-se considerar, quando aplicável, alguns parâmetros, como: especificidade, seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, etc. A similaridade e a diferença entre esses parâmetros de validação estabelecidos pelo INMETRO e pela ANVISA, podem ser visualizadas na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Parâmetros de validação da ANVISA e do INMETRO, segundo respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/05/20034 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/200311.

<b>ANVISA</b>	<b>INMETRO</b>
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Intervalos da curva de calibração	Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho
<b>Linearidade</b>	<b>Linearidade</b>
Curva de Calibração	-
<b>Limite de Detecção (LD)</b>	<b>Limite de Detecção (LD)</b>
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
-	Sensibilidade (inclinação da curva)
Exatidão	Exatidão e tendência (bias)
<b>Precisão</b>	<b>Precisão</b>
Repetibilidade (precisão intra-corrída)	Repetitividade
Precisão intermediária (precisão inter-corrída)	Precisão Intermediária
Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)	Reprodutibilidade
<b>Robustez</b>	<b>Robustez</b>
-	Incerteza de medição

**Fonte:** Ribani et al, 2004.

Diversos artigos e revisões descrevem procedimentos a respeito de validação de métodos analíticos. É possível distinguir, dentro de um contexto geral, dois tipos de validação: validação no laboratório (“in house validation”) e validação completa (“full validation”) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Considerada como preliminar à validação completa, a validação no laboratório é realizada em um único laboratório. Todas as etapas e parâmetros, seja de um método novo ou de um já existente na literatura, são validados sob as condições desse laboratório (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A validação completa estabelece a reprodutibilidade da metodologia. Essa validação envolve laboratórios distintos, com o objetivo de comparar e verificar como a metodologia se comporta em diferentes condições. Dessa forma, é possível avaliar o seu desempenho e tomar as ações de melhorias necessárias (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para um método analítico, com uma determinada aplicação, ser aceito como um método oficial, precisa ter a validação completa. Os protocolos, Harmonizado Internacional (HORWITZ, 1995; RIBANI et al., 2004) e o procedimento ISO (“International Standard Organization”) (ISO, 1994; RIBANI et al., 2004), são aceitos internacionalmente e têm sido convencionados para a validação completa. No Brasil, através do Programa Brasileiro de Metrologia em Química, os estudos de comparações interlaboratoriais são gerenciados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) (RIBANI et al., 2004).

### 1.6.1 Parâmetros analíticos

A necessidade dos tipos de parâmetros a serem calculados durante o processo de validação, podem variar de acordo com a sua finalidade. O **Quadro 1** apresenta alguns exemplos dessas variações (INMETRO, 2007).

**Quadro 1.** Variação dos parâmetros de validação em função dos ensaios.

Parâmetros	Qualitativo	Análise de traços	Determinação do principal componente
Limite de detecção	sim	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não
Especificidade e Seletividade	sim	sim	sim

Fonte: INMETRO, 2007

Geralmente, os parâmetros de validação de métodos analíticos encontrados são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

#### 1.6.1.1 Especificidade e Seletividade

A seletividade e especificidade estão relacionadas com a detecção do analito de interesse. A especificidade refere-se á capacidade de um método específico para identificar

um único analito, e a seletividade é a capacidade do método em detectar um ou vários analitos de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2007).

### 1.6.1.2 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados são proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo analítico especificado. A linearidade é determinada através de uma padronização interna ou externa, onde é utilizada para obter uma comparação e assim construir uma curva analítica (RIBEIRO et al., 2008).

Para a construção de uma curva de calibração, segundo a ANVISA, são necessários vários pontos, sendo recomendado no mínimo 5 concentrações diferentes, para que a linearidade seja determinada (ANVISA, 2003).

Para o estudo desse parâmetro, é necessário a elaboração de uma curva analítica que demonstre a relação “sinal detectado” versus a concentração, expressa em uma equação matemática. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:  $y = ax + b$ , onde “y” é a resposta do instrumento utilizado, “x” é a concentração, “a” é a inclinação da curva e “b” é interseção com o eixo y, quando “x” é igual a zero (INMETRO, 2007).

A linearidade é frequentemente analisada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

O coeficiente de correlação linear de Pearson é adimensional e varia entre -1 e +1. Quando o valor de “r” for mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais ao longo de uma reta. Quanto mais próximo de 0, indica a falta de correlação entre a variável dependente (y) e a variável independente (x) (RIBEIRO et al., 2008). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 (ANVISA, 2003) e o INMETRO um valor acima de 0,90 (INMETRO, 2007).

O coeficiente de determinação é sempre positivo e seu valor varia entre 0 e 1 ( $0 \leq R^2 \leq 1$ ). O coeficiente de determinação mostra o percentual da variância total da variável dependente Y.

### **1.6.1.3 Precisão**

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre os diversos ensaios realizados repetidamente na mesma amostra sob condições definidas. Usualmente, a precisão é expressa como o desvio-padrão absoluto, intervalo de confiança da média ou como coeficiente de variação (CV) de diversas medidas. Em validação de métodos analíticos, a precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

A repetibilidade define o grau de concordância entre os resultados de sucessivas medições, realizadas sob as mesmas condições em um curto período de tempo. Todas as medições são efetuadas com um mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo laboratório. Apesar da repetibilidade ser um indicador do desempenho do método, subestima a difusão dos resultados a longo prazo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002)

A precisão intermediária avalia a concordância dos resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes, equipamentos diferentes, realizados no mesmo laboratório. É recomendado um mínimo de dois dias diferentes para a determinação da precisão intermediária (ANVISA, 2003).

A reprodutibilidade refere-se ao grau de concordância dos resultados obtidos, seguindo uma mesma metodologia, para uma determinada análise realizada por laboratórios diferentes (ANVISA, 2003).

### **1.6.1.4 Exatidão**

A exatidão é a diferença entre o valor obtido na análise e o verdadeiro valor presente na amostra. A exatidão é referente a quão próximo um valor de uma medida está do valor verdadeiro. Normalmente, os processos utilizados para avaliar esse parâmetro são: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007).

### **1.6.1.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)**

O limite de detecção representa a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectado com um nível de confiança especificado ou ainda, que pode ser estatisticamente diferenciada do ruído (RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### **1.6.1.6 Robustez**

A capacidade de um método analítico em resistir a pequenas variações que possam ocorrer quando está sendo executado, é denominado de robustez. Quanto maior for à robustez de um método, maior será a confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003).

Na avaliação da robustez de um método são aplicados experimentos estatísticos que avaliam a robustez do método, a influência de cada uma das variações na resposta do método estudado e qual o tipo de influência de cada variação detectada (INMETRO, 2007). A avaliação da robustez fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou em diferentes ambientes de análise (RIBANI et al., 2004).

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um método de análise de hepatotoxinas diretamente das florações de cianobactérias, visando a sua identificação e quantificação por MALDI-TOF-MS.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar os diferentes métodos de preparo de amostra para a análise de microcistinas por MALDI-TOF-MS ;
- 2) Selecionar o melhor método de preparo de amostra para a determinação dos parâmetros analíticos para detecção e quantificação de microcistinas;
- 3) Avaliar o efeito de diferentes matrizes na análise de microcistinas;
- 4) Detectar e quantificar microcistinas com o método desenvolvido de análise por MALDI-MS.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Análises por MALDI-TOF-MS

As análises por MALDI-TOF-MS foram realizadas em um espectrômetro de massas M@LDI-LR (Micromass<sup>®</sup>, Manchester, Reino Unido). Os espectros foram adquiridos no modo reflectron e positivo de aquisição de íons com as seguintes voltagens: tensão de pulso 2500V, tensão do reflectron 2000V, tensão da fonte 15000V e tensão do MCP 1800V. As análises foram realizadas com um laser de nitrogênio ( $\lambda = 337$  nm). O equipamento foi calibrado com polietilenoglicol (PEG) no intervalo das massas moleculares ( $m/z$  600-1250). Para realizar as análises utilizou-se uma placa de MALDI de aço inoxidável de 96 spots (Micromass<sup>®</sup>, Manchester, Reino Unido).

Todos os espectros foram obtidos na faixa de razão  $m/z$  entre 700 e 1500. O valor da supressão de matriz foi de 400 Da.

Todos os espectros foram tratados no software Masslynx 4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido).

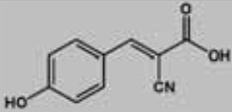
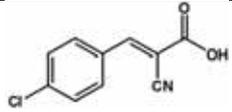
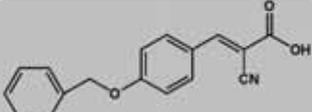
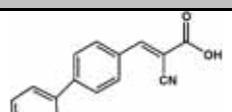
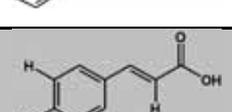
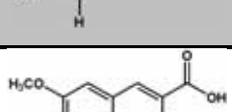
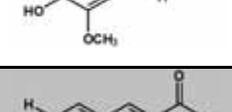
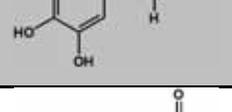
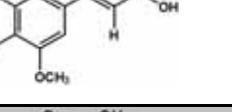
#### 3.2 Padrões comerciais e reagentes

Os padrões comerciais de microcistinas, a Angiotensina I e a Bradicinina, e o ácido trifluoracético (TFA) foram obtidos junto a empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

#### 3.3 Matrizes

O **Quadro 2**, apresenta as matrizes utilizadas nas análises e sua procedência.

**Quadro 2.** Matrizes utilizadas nas análises

Matrizes	Estrutura Molecular	Empresas
Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (4-HCCA)		Sigma-Aldrich®
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico (4-CICA)		Sigma-Aldrich®
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico		Sigma-Aldrich®
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico		Sigma-Aldrich®
Ácido Cumárico		Sigma-Aldrich®
Ácido Sinapínico		Sigma-Aldrich®
Ácido Caféico		Fluka Analytical Products
Ácido Ferúlico		Fluka Analytical Products
Ácido Gentísico (DHB)		ICN Biomedicals

### 3.4 Solventes

Os solventes metanol e acetonitrila utilizados nas análises foram de grau HPLC.

A água ultrapura (resistência 18,2 M $\Omega$ .cm), também utilizada foi obtida pelo equipamento da marca Millipore, modelo Sistema Simplicity®.

### 3.5 Cianobactérias

As cianobactérias *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Microcystis aeruginosa* PCC 7813, *Microcystis aeruginosa* PCC 7941, *Nodularia harveyana* PCC 7804, *Anabaena cylindrica* PCC 7122, *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905, *Planktothrix agardhii* PCC 7821 foram adquiridas junto ao Instituto Pasteur – França (La Collection des Cyanobactéries de l'Institut Pasteur – PCC).

### 3.6 Meios de cultura

Para as linhagens de *Microcystis aeruginosa*, PCC 7820 e 7813, o meio utilizado foi o BG-11<sub>0</sub> + NaNO<sub>3</sub> (2mmol/L) + NaHCO<sub>3</sub> (10 mmol/L), **Tabela 3**. E para o cultivo da *Nodularia harveyana* (PCC 7804) e *Anabaena cylindrica*. (PCC 7122) foi utilizado o meio BG-11<sub>0</sub>, **Tabela 4**. A **Tabela 5** é referente a composição da solução de metais traços com A5+Co.

**Tabela 3.** Composição do meio BG-11<sub>0</sub>+ NaNO<sub>3</sub> + NaHCO<sub>3</sub>

Componentes	Concentração g/L	mmol/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,04	0,38
NaHCO <sub>3</sub>	0,84	10,0
NaNO <sub>3</sub>	0,17	2,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04	0,18
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	0,30
Ácido Cítrico	0,006	0,03
EDTA	0,001	0,003
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	0,25
Citrato Férrico de Amônio	0,006	0,03
Solução de Metais Traços com A5+Co	1,0 mL	
H <sub>2</sub> O deionizada	Suficiente para completar 1,0 L	

pH ajustado para 7 depois de autoclavado e frio

**Tabela 4.** Composição do meio BG-11<sub>0</sub>

Componentes	Concentração g/L	mmol/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,04	0,38
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04	0,18
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	0,30
Ácido Cítrico	0,006	0,03
EDTA	0,001	0,003
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	0,25
Citrato Férrico de Amônio	0,006	0,03
Solução de Metais Traços com A5+Co	1,0 mL	
H <sub>2</sub> O deionizada	Suficiente para completar 1,0 L	

pH ajustado para 7 depois de autoclavado e frio

**Tabela 5.** Composição da Solução de Metais Traços com A5+Co

Componentes	Concentração g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494

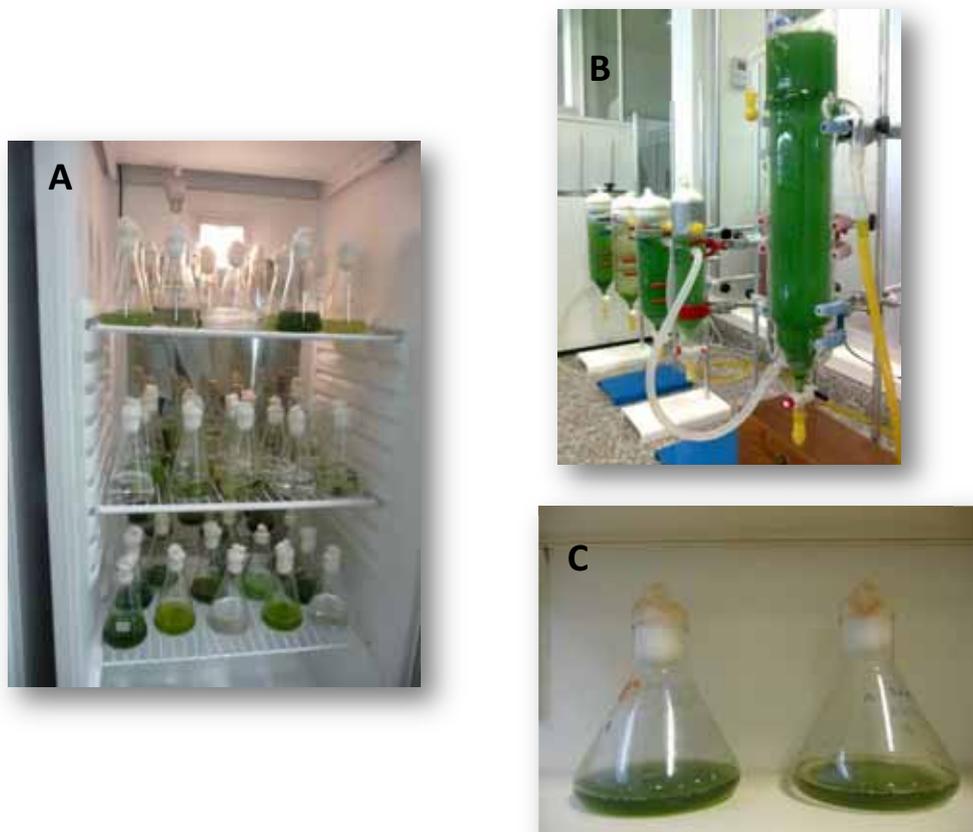
### 3.7 Esterilização

Todos os materiais e os meios de cultura utilizados para cultivo e manutenção das cianobactérias foram embalados e esterilizados em uma autoclave vertical da marca PHOENIX, modelo AV-75, a 120°C e 1,0 Kg/cm<sup>2</sup> de 15 a 20 minutos. Esses materiais, depois de autoclavados foram esterilizados sob luz Ultravioleta e manipulados em uma cabine de segurança biológica PACHANE modelo PA050 série 329/10.

### 3.8 Cultivo e manutenção das cianobactérias

As cianobactérias cultivadas em nosso laboratório foram cultivadas sob duas diferentes condições: em erlenmeyers e fernbach dentro de uma câmara de germinação e em biorreatores, **Figura 18**.

**Figura 18.** Diferentes formas de cultivo das cianobactérias. (a) Cianobactérias cultivadas em erlenmeyers de 250 mL em uma câmara de germinação. (b) Cianobactérias cultivadas nos biorreatores. (c) Cianobactérias cultivadas nos frascos de fernbach em uma câmara de germinação.



Fonte: [Milagre](#)

As cianobactérias cultivadas nos erlenmeyers (250 mL) e nos frascos fernbach (3000 mL), foram mantidas em uma câmara de germinação, a 25°C com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de  $5 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  por um fotoper\u00edodo de 12h alternadas de luz e aus\u00eancia de luz.

As cianobactérias incubadas nos dois tipos de biorreatores (os menores possuem um volume de 200 mL e o maior possui um volume de 800 mL), são mantidas em colunas encamisados a 25°C, com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 5  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  com 12h alternadas de luz e ausência de luz.

As cianobactérias foram repicadas cada três meses, e as culturas foram mantidas adicionando meio de cultura, preparado no dia, a cada quinze dias.

### 3.9 Espécies de cianobactérias adquiridas

O cultivo e a manutenção das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e *Nodularia harveyana* PCC 7804, espécies já disponíveis em nosso laboratório, foram utilizados para o aprendizado do manuseio, preparo de meio de cultura e adaptação destes micro-organismos em condições laboratoriais. Estas espécies foram selecionadas devido a produção de microcistinas, particularmente a MC-LR, e nodularinas (NOD).

As espécies: *Microcystis aeruginosa* PCC 7813, *Anabaena cylindrica* PCC 7122, *Microcystis aeruginosa* PCC 7941, *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905, *Planktothrix agardhii* PCC 7821, foram espécies adquiridas em 2012 e selecionadas devido a capacidade de produzir diferentes variantes de microcistinas. Esta diversidade será fundamental para a validação e aplicação do método de preparo de amostra selecionado. A **Tabela 6** apresenta as espécies de cianobactérias cultivadas em nosso laboratório.

**Tabela 6.** Cianotoxinas produzidas pelas espécies cultivadas.

Cianobactéria	Hepatotoxinas
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7820	MC-LR, D-Asp-MC-LR
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7813	MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF
<i>Nodularia harveyana</i> PCC 7804	Nod-R, (Har)-Nod-R
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	peptolinas

Quando se iniciou o cultivo das novas espécies adquiridas em nosso laboratório, apenas as linhagens *Microcystis aeruginosa* PCC 7813 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122 se desenvolveram.

Devido ao ocorrido, apenas as *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, *Microcystis aeruginosa* PCC 7813, *Nodularia harveyana* PCC 7804 e *Anabaena cylindrica* PCC 7122 foram utilizadas em nosso estudo.

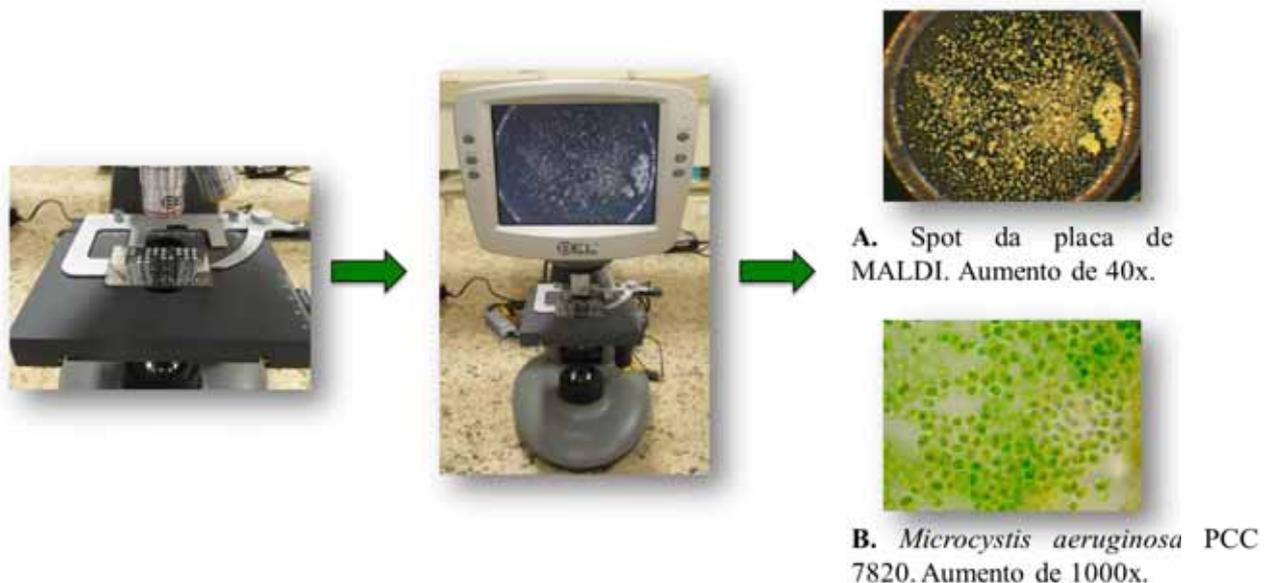
### 3.10 Descarte das cianobactérias

Após a centrifugação das cianobactérias o sobrenadante é analisado para verificar a presença de toxinas. Se o sobrenadante apresentar toxinas, este será separado e a cianotoxina será extraída. Se não houver a presença das toxinas no sobrenadante, os frascos serão então embalados e esterilizados em uma autoclave vertical da marca PHOENIX, modelo AV-75, a 120°C e 1,0 Kgf/cm<sup>2</sup> por 30 minutos e descartados.

### 3.11 Microscopia óptica

Todo o trabalho de microscopia das cianobactérias e dos spots da placa de MALDI foram realizados em um microscópio óptico BEL<sup>®</sup> photonics, **Figura 19**.

**Figura 19.** Esquema demonstrando como as imagens são obtidas do microscópio óptico.



Fonte: Milagre

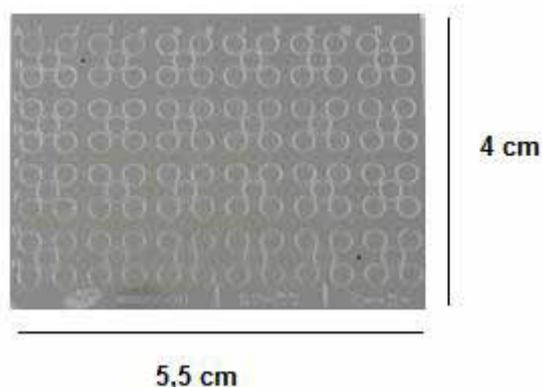
### 3.12 Limpeza da placa de MALDI

Para a realização das análises utilizou-se uma placa de MALDI com 96 spots (Micromass<sup>®</sup>), **Figura 20**, onde foi adotado o seguinte procedimento para o seu uso: primeiramente lava-se a placa de MALDI com metanol, seguida da secagem da placa com lenços Kimwipes<sup>®</sup> da KIMTECH Science<sup>®</sup> sem arranhar ou esfregar a superfície da placa. Posteriormente lava-se com água deionizada, secando novamente e por último lava-se a placa novamente com metanol secando com lenços Kimwipes<sup>®</sup>.

Após esse procedimento, coloca-se a placa em um bécker onde se adiciona metanol até cobrir a placa. O bécker com a placa no metanol foi levado então para um ultrassom (lavadora ultra-sônica modelo USC-1850, marca Unique, de potência 154W) por 5 minutos. Após os 5 minutos, o becker foi retirado do ultrassom e a placa foi seca com lenços Kimwipes<sup>®</sup>. Esta etapa deve ser feita com muita cautela, pois uma limpeza da placa mal feita pode interferir em seus resultados devido à presença de resíduos de outras análises.

Os lenços Kimwipes<sup>®</sup> foram utilizados para limpeza da placa de MALDI, pois são macios, não riscam a placa de MALDI e não soltam fiapos que podem interferir nas análises.

**Figura 20.** Placa de MALDI utilizada nas análises e suas dimensões.



Fonte: **Milagre**

### 3.13 Identificação das cianotoxinas

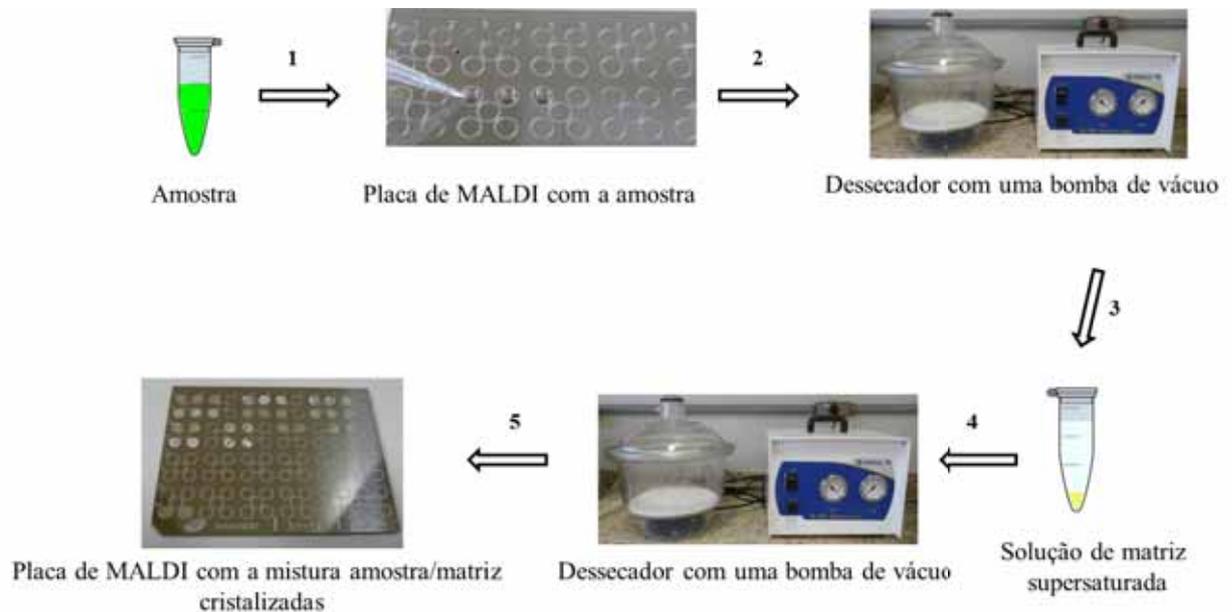
Objetivando avaliar a eficiência de um método utilizado em nosso laboratório, as cianotoxinas presentes nas culturas de cianobactérias foram identificadas através do seguinte procedimento:

Uma solução de matriz supersaturada foi primeiramente preparada com: 70% Acetonitrila, 30% água ultrapura, 0,1% de TFA na proporção volume/volume (v/v) e ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico supersaturado como matriz (aproximadamente 30 mg de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).

Como amostra, uma pequena quantidade da cultura contendo as cianobactérias e as cianotoxinas foi retirada e colocada em um eppendorf.

As análises das amostras foram então realizadas na seguinte sequência: 1,0  $\mu$ L da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. Após a secagem, 1,5  $\mu$ L da solução supersaturada da matriz foi adicionada sobre a amostra. A placa foi novamente levada para a secagem a vácuo, onde foi esperada a cristalização dessa mistura. Após a cristalização a placa com a mistura amostra/matriz foi inserida no MALDI-TOF e analisada. A **Figura 21** ilustra o procedimento de como as análises foram realizadas.

**Figura 21.** Esquema demonstrando como são realizadas as análises.



Fonte: **Milagre**

### 3.14 Métodos de preparo de amostra

Existem diversos métodos de preparo de amostra descritos na literatura para a análise de peptídeos e proteínas por MALDI-MS. Nessa dissertação foram avaliados 11 métodos diferentes, com o objetivo de aprimorar um método adaptado em nosso laboratório, o método Vacuum Drying adaptado, visando a escolha do melhor solvente (metanol, acetonitrila, água, etanol ou acetona) e o melhor preparo de amostra.

A matriz utilizada em todas as análises foi o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, aproximadamente 20 mg dissolvido em 500mL. O padrão comercial de microcistina utilizado foi a MC-RR, na concentração de 2,5  $\mu\text{mol/L}$ , dissolvido em uma solução 40% (v/v) metanol em água ultrapura. No dia da análise o padrão da MC-RR foi misturado na proporção 9:1 (v/v) com uma solução de 500  $\mu\text{mol/L}$  de angiotensina I/50mmol/L de  $\text{Zn}^{2+}$ .

Antes de cada análise o equipamento foi calibrado e todas as análises foram realizadas no modo positivo (MALDI-(+)-TOF-MS).

Os métodos escolhidos para serem avaliados foram realizados da seguinte forma:

### 1) *Dried Droplet* (PUDDICK et al., 2012)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 60% metanol, 36% acetonitrila, 4% água ultrapura e 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: 0,5  $\mu$ L da solução de matriz foi aplicada na placa. Em seguida, aplicou-se 0,5  $\mu$ L da amostra, misturando ambas as soluções na própria placa com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. A placa foi então deixada secar a temperatura ambiente.

### 2) *Sonicated Dried Droplet* (PUDDICK et al., 2012)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 60% metanol, 36% acetonitrila, 4% água ultrapura e 0,1% de TFA (v/v).

Solução de  $Zn^{2+}$ : solução de sulfato de zinco heptahidratado na concentração de 200 mmol/L.

Procedimento: Misturou-se a amostra com a solução de  $Zn^{2+}$  na proporção 3:1. A solução de matriz foi então misturada na proporção 1:1 com a solução MC/ $Zn^{2+}$  e sonicada em uma lavadora ultra-sônica modelo USC-1850, marca Unique, de potência 154W por 5 minutos. 1,0  $\mu$ L dessa solução foi então aplicada na placa de MALDI e deixada secar a temperatura ambiente.

### 3) *Vacuum Drying* (ANALYTIX, 2001)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 60% metanol, 36% acetonitrila, 4% água ultrapura e 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: 0,5  $\mu$ L da solução de matriz foi aplicada na placa. Em seguida, aplicou-se 0,5  $\mu$ L da amostra, misturando ambas as soluções na própria placa com o auxílio de uma ponteira. A placa foi levada para secagem em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo TECNAL, modelo TE-058.

#### **4) Uso de sulfato de zinco heptahidratado (HOWARD; BOYER, 2007a)**

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 60% metanol, 36% acetonitrila, 4% água ultrapura e 0,1% de TFA (v/v).

Solução de  $Zn^{2+}$ : solução de sulfato de zinco heptahidratado na concentração de 200  $\mu\text{mol/L}$ .

Procedimento: 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra foi misturada a 1,0  $\mu\text{L}$  da solução de  $Zn^{2+}$ . A solução de matriz foi então misturada na proporção 1:1 com a solução MC/ $Zn^{2+}$  e sonicada em uma lavadora ultra-sônica modelo USC-1850, de potência 154W, marca Unique por 3 minutos. 1,0  $\mu\text{L}$  dessa solução foi então aplicada na placa de MALDI e deixada secar à temperatura ambiente.

#### **5) *Fast Evaporation* (VORM; ROEPSTORFF; MANN, 1994)**

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em acetona contendo de 1 a 2% de água ultrapura ou 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: 0,5  $\mu\text{L}$  da solução de matriz foi aplicada no centro do spot da placa de MALDI. Essa transferência foi realizada rapidamente, para evitar que a acetona evapore dentro da ponteira. Em cima dessa matriz, 0,5  $\mu\text{L}$  da amostra foi pipetada no centro da camada formada. Ambos os procedimentos foram deixados secarem a temperatura ambiente.

#### **6) *Sandwich* (ANALYTIX, 2001)**

Solução de matriz Fast Evaporation: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em metanol contendo de 1 a 2% água ultrapura ou 0,1% de TFA (v/v).

Solução de matriz com solvente não volátil: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso (v/v).

Procedimento: 0,5  $\mu\text{L}$  da solução de matriz Fast Evaporation foi aplicada na placa, seguida de 0,5  $\mu\text{L}$  da amostra. Esperou-se a secagem da amostra a temperatura ambiente e

aplicou-se 0,5  $\mu$ L da solução de matriz com solvente não volátil sobre a amostra, deixando secar a temperatura ambiente.

#### **7) *Quick and Dirty*** (ANALYTIX, 2001)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: 0,5  $\mu$ L da amostra foi adicionada na placa, seguida de 0,5  $\mu$ L da solução de matriz. Ambas as gotas foram misturadas com a ponteira da pipeta e secadas com um fluxo de nitrogênio.

#### **8) *Thin Layer*** (PUDDICK et al., 2012)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em metanol e 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: uma gota da solução de matriz (5,0  $\mu$ L) foi arrastada ao longo dos spots usando uma micropipeta e permitindo que o solvente evapore. 0,5  $\mu$ L da amostra foi então aplicada por cima dos cristais da matriz e deixada a secar a temperatura ambiente.

#### **9) *Ultra Thin Layer*** (FENYO et al., 2007)

Solução de matriz Thin Layer: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso (v/v). Essa solução foi misturada na proporção 1:3 com metanol.

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso (v/v).

Solução amostra/matriz: a amostra foi misturada na proporção 1:9 com a solução de matriz.

Procedimento: 50  $\mu$ L da solução de matriz Thin Layer foi aplicada no centro da placa no lado esquerdo e espalhada com a ponteira em uma única direção (da esquerda para a direita). Quando o solvente evaporar, envolva um lenço kimwipe<sup>®</sup> no dedo indicador e passe suavemente sobre a placa em uma única direção (também da esquerda para a direita). 0,5 $\mu$ L

da solução amostra/matriz foi então aplicada na placa. 10 segundos foram esperados e o excesso de líquido foi então aspirado com vácuo. 2,0  $\mu\text{L}$  de água ultrapura foi aplicada em cada spot e aspirada com o vácuo imediatamente depois.

#### **10) *Thin Layer Spot*** (PUDDICK et al., 2012)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em metanol e 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: 0,2  $\mu\text{L}$  de solução de matriz é adicionada no centro do spot, produzindo uma cristalização de aproximadamente do tamanho do spot, e permitida secar a temperatura ambiente. 0,5  $\mu\text{L}$  da amostra é adicionada em cima da solução de matriz e permitida secar a temperatura ambiente.

#### **11) *Thin Layer Line*** (PUDDICK et al., 2012)

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em metanol e 0,1% de TFA (v/v).

Procedimento: uma micropipeta, com 5,0  $\mu\text{L}$  da solução de matriz, foi arrastada ao longo dos spots formando uma linha contínua e deixada secar a temperatura ambiente. 0,5  $\mu\text{L}$  da amostra foi adicionada em cima dessa linha e esperada secar a temperatura ambiente.

#### **12) *Vacuum Drying Adaptado***

Solução de matriz: solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso (v/v).

Procedimento: 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. Após a secagem, 1,5  $\mu\text{L}$  da solução supersaturada da matriz foi adicionada em cima da amostra. A placa foi novamente levada para a secagem a vácuo, onde foi esperada a cristalização dessa mistura.

### 3.15 Procedimentos estatísticos

#### 3.15.1 Coeficiente de variação

Para analisar o desempenho dos métodos de preparo de amostra foi utilizado o coeficiente de variação (CV). O CV fornece os fatores de variação dos dados obtidos em relação à média. Quanto menor for o seu valor, mais homogêneos serão os dados. O CV é utilizado para estimar a precisão dos métodos de preparo.

O padrão da MC-RR, na concentração de 2,5 µmol/L, foi dissolvido em uma solução 40% metanol em água ultrapura. No dia da análise o padrão da MC-RR foi misturado na proporção 9:1 com uma solução de 500 µmol/L de angiotensina I/50mmol/L de Zn<sup>2+</sup> (PUDDICK et al., 2012).

Para cada método foram realizadas análises em quadruplicata. O CV dos métodos de preparo foi medido calculando a razão entre as intensidades dos sinais da MC-RR e do padrão interno, angiotensina I (PUDDICK et al., 2012). A seguinte equação foi utilizada para o seu cálculo:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}}$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão da razão entre as intensidades dos sinais da MC-RR e da angiotensina I, e  $\bar{X}$  é a média da razão entre as intensidades dos sinais da MC-RR e da angiotensina I.

#### 3.15.2 Curva analítica

Após a escolha do melhor método de preparo de amostra, foi realizado a quantificação e a construção da curva analítica das microcistinas por MALDI-TOF-MS. A quantificação foi realizada com os padrões comerciais MC-RR e MC-LR em diferentes concentrações, tendo a angiotensina I como padrão interno. Para cada padrão de microcistina foi construído uma curva analítica.

Para a quantificação, os padrões de microcistinas, dissolvidos em uma solução 40% metanol em água ultrapura, foi preparado nas concentrações (µmol/L): 10; 7; 5; 2,5; 1; 0,5;

0,1; 0. No dia da análise os padrões de MCs em diferentes concentrações foram misturados na proporção 9:1 com uma solução de 500  $\mu\text{mol/L}$  de angiotensina I/50mmol/L de  $\text{Zn}^{2+}$ . Para cada concentração foram realizadas análises em quadruplicata (PUDDICK et al., 2012).

A curva analítica foi construída calculando a média da razão da intensidade do sinal da microcistina pela da angiotensina I para cada concentração preparada. A média da razão foi utilizada como uma medida da concentração da microcistina relativa a da angiotensina I (PUDDICK et al., 2012). A linearidade da curva analítica construída foi analisada utilizando o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### 3.15.3 Limite de detecção e quantificação

O método do limite de detecção (MLD) foi determinado utilizando 40% de metanol como o branco e os padrões comerciais MC-RR e MC-LR nas concentrações de 0,03  $\mu\text{mol/L}$ , 0,02  $\mu\text{mol/L}$  e 0,01  $\mu\text{mol/L}$ . Sete repetições do branco ( $X_0$ ) e sete da amostra ( $X_s$ ) foram então analisadas e a seguinte equação foi utilizada para o seu cálculo (PUDDICK et al., 2012):

$$\text{MLD} = \frac{(3,14 \times s - b)}{m}$$

O  $s$  é o desvio padrão de  $X_s$  repetições,  $b$  e  $m$  são a intercepção e a inclinação de uma regressão na região de  $X_0$  para  $X_s$ , e 3,14 é o valor de *one-tailed t-test* com confiança de 99%.

O método do limite quantificação (LDQ) foi calculado através da curva analítica construída com as sete concentrações diferentes (10; 7; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0  $\mu\text{mol/L}$ ), utilizando a seguinte equação (PUDDICK et al., 2012):

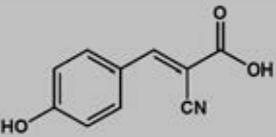
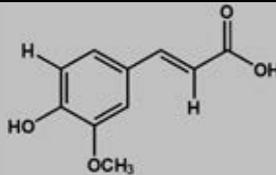
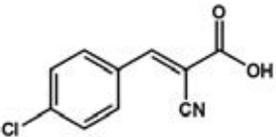
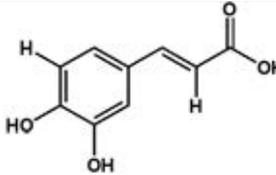
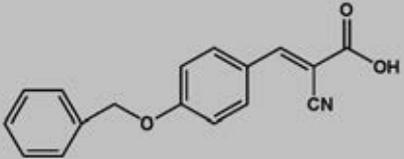
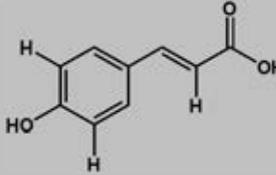
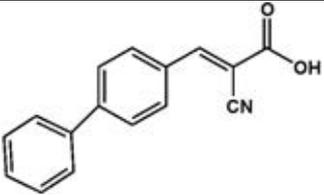
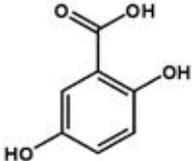
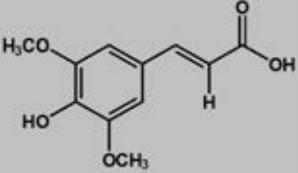
$$\text{LDQ} = \frac{(10 \times s - b)}{m}$$

O  $s$  é o desvio padrão de  $X_s$  repetições,  $b$  e  $m$  são a intercepção e a inclinação de uma regressão na região de  $X_0$  para  $X_s$ .

### 3.16 Análise de diferentes matrizes

Com o objetivo de verificar a influência da matriz nas análises diferentes matrizes foram testadas para a escolha da matriz ideal para a análise de hepatotoxinas. O **Quadro 3** apresenta as diferentes matrizes que foram analisadas e suas estruturas.

**Quadro 3.** Matrizes analisadas para obtenção da melhor na detecção de MCs.

Matrizes	Estrutura Molecular	Matrizes	Estrutura Molecular
Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico		Ácido Ferúlico	
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico		Ácido Caféico	
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico		Ácido Cumárico	
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico		Ácido Gentísico	
Ácido Sinapínico		-	-

As matrizes foram preparadas com diferentes procedimentos: matriz cristalizada a vácuo, matriz cristalizada a temperatura ambiente e solução de matriz homogeneizada em um ultrassom de alta potência. Cada procedimento foi realizado em quadruplicata.

A amostra utilizada foi o padrão comercial da MC-RR, na concentração de 2,5  $\mu\text{mol/L}$ , dissolvido em uma solução 40% metanol em água ultrapura. No dia da análise o padrão da

MC-RR foi misturado na proporção 9:1 com uma solução de 500  $\mu\text{mol/L}$  de angiotensina I/50mmol/L de  $\text{Zn}^{2+}$ .

Todas as soluções de matrizes supersaturadas foram preparadas com os seguintes solventes: matriz dissolvida em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso. Aproximadamente 20 mg de cada matriz foi dissolvido em 500mL 70% acetonitrila (70:30 acetonitrila:água).

Os procedimentos de preparo das soluções das matrizes foram realizadas da seguinte forma:

a) **Matriz cristalizada a vácuo:** 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. Após a secagem, 1,5  $\mu\text{L}$  da solução supersaturada da matriz foi adicionada em cima da amostra. A placa foi novamente levada para a secagem a vácuo, onde foi esperada a cristalização dessa mistura.

b) **Matriz cristalizada a temperatura ambiente:** 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. Após a secagem, 1,5  $\mu\text{L}$  da solução supersaturada da matriz foi adicionada em cima da amostra. A placa foi então permitida secar a temperatura ambiente, onde foi esperada a cristalização dessa mistura.

c) **Solução de matriz homogeneizada em um ultrassom de alta potência:** 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. 100  $\mu\text{L}$  da solução da matriz supersaturada foram homogeneizadas em um ultrassom de alta potência (ultrassom MS73 da marca Bandelin Sonoplus). A intensidade utilizada foi de 80% por 15 segundos. 1,5  $\mu\text{L}$  da solução supersaturada da matriz foi então adicionada em cima da amostra. A placa foi então permitida secar a temperatura ambiente, onde foi esperada a cristalização dessa mistura.

Após a avaliação da cristalização, do CV e dos espectros de todas as matrizes mencionadas anteriormente, a melhor foi selecionada com o melhor procedimento.

A matriz selecionada, o ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico, foi misturada com o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Esta mistura foi preparada com diferentes procedimentos: Soluções

de matrizes misturadas nas proporções (v/v) 25%, 50% e 75% (LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003) e matrizes misturadas na proporção 25%, 50% e 75% massa/massa (m/m). Cada procedimento para cada proporção foi preparado em quadruplicata.

Estes procedimentos estão descritos abaixo.

**a) Soluções de matrizes misturadas nas proporções (v/v) 25%, 50% e 75%:** As soluções de matrizes ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico foram preparadas em eppendorfs separados em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso.

Após a preparação das soluções de cada matriz, estas foram misturadas em outros eppendorfs nas proporções (v/v): 25% ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico + 75% ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico; 50% ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico + 50% ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico e 75% ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico + 25% ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico.

1,0  $\mu$ L da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. Após a secagem, 1,5  $\mu$ L da solução supersaturada da matriz foi adicionada em cima da amostra. A placa foi então permitida secar a temperatura ambiente, onde foi esperada a cristalização dessa mistura.

**b) Matrizes misturadas na proporção 25%, 50% e 75% (m/m):** As matrizes ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico foram pesadas em um mesmo eppendorf e diluídas em 70% acetonitrila, 30% água ultrapura e 0,1% de TFA aquoso.

O total da massa das matrizes combinadas foi de 20 mg em um mesmo eppendorf. Dentro destes 20mg cada matriz foi pesada seguindo a proporção (m/m) a seguir: 25% (5mg) ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico + 75% (15mg) ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico ; 50% (10mg) ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico + 50% (10mg) ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico e 75% (15mg) ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico + 25% (5mg) ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico.

1,0  $\mu$ L da amostra foi pipetada em um spot, seguido da secagem da placa em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal. Após a secagem, 1,5  $\mu$ L da solução supersaturada da matriz foi adicionada em cima da amostra. A placa foi então permitida secar a temperatura ambiente, onde foi esperada a cristalização dessa mistura.

Após realizadas as análises, a mistura das matrizes foram avaliadas com relação ao seu CV, cristalização e espectro. Selecionada a melhor mistura, uma curva analítica foi construída e o seu MLD calculado.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Avaliação do método *vacuum drying adaptado*

Quando nosso grupo de pesquisa iniciou as análises de cianotoxinas por MALDI-MS, diferentes métodos de preparo de amostra foram avaliados. Utilizando os padrões comerciais e as culturas de cianobactérias cultivadas em nosso laboratório, selecionamos, dentro de todos os métodos avaliados, o método *vacuum drying* para analisar as cianotoxinas por MALDI-MS.

Weinberger e colaboradores foram os primeiros a relatar que o preparo de amostra a vácuo gera: cristais menores, mais uniformemente distribuídos por toda a superfície do spot e com o mínimo de áreas livres entre os cristais, em comparação com o preparo de amostra onde a mistura matriz/amostra é cristalizada a temperatura ambiente (WEINBERGER et al., 1993). A este método de preparo de amostra Weinberger e colaboradores denominaram de *vacuum drying*.

O método *vacuum drying* oferece uma forma mais rápida de secagem da amostra, facilitando a análise de uma grande quantidade de amostras. Além disso, a rápida cristalização da mistura matriz/amostra gera cristais menores, mais uniformes e uma incorporação mais homogênea do analito na estrutura cristalina. Dessa forma, o método *vacuum drying* tende a melhorar a reprodutibilidade entre os spots (reprodutibilidade *spot-to-spot*) e minimizar a necessidade de procurar regiões no spot com a presença da amostra cristalizada (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008; WEINBERGER et al., 1993).

Devido às qualidades do método *vacuum drying*, nosso grupo de pesquisa optou por adaptar este método e denominá-lo de *vacuum drying adaptado*.

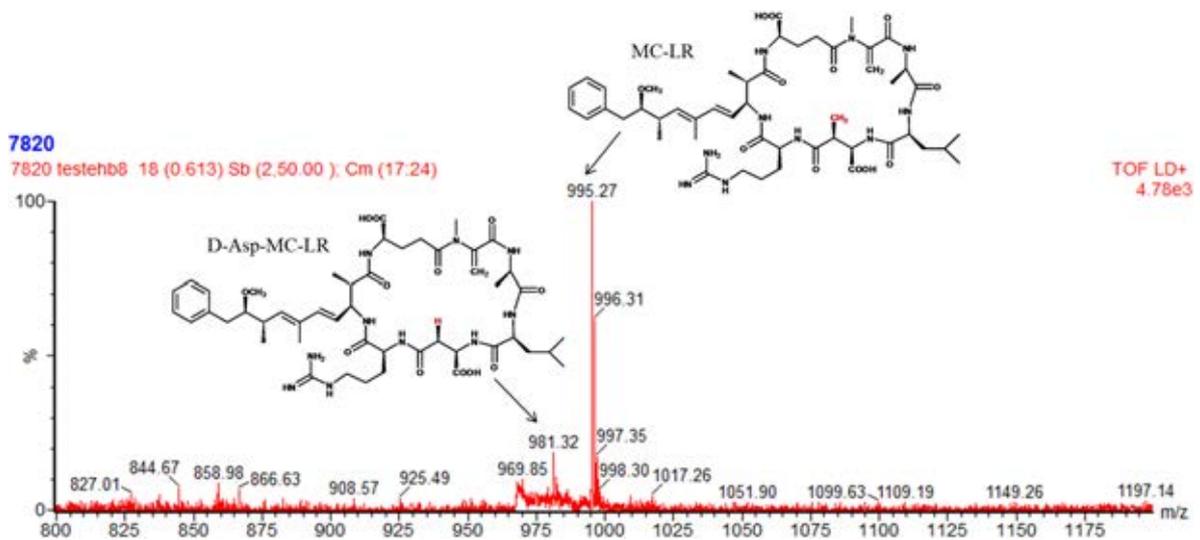
No método *vacuum drying*, a solução de matriz supersaturada é adicionada primeiramente seguida da amostra. Ambas as soluções são misturadas na própria placa com o auxílio de uma ponteira e levadas para cristalizar a vácuo. No método *vacuum drying adaptado* a amostra é adicionada primeiramente no spot e seca a vácuo. Após a secagem, a solução de matriz supersaturada é adicionada sobre a amostra seca e levada para cristalizar no vácuo novamente.

Esta modificação no método *vacuum drying*, realizada por nosso grupo de pesquisa, demonstrou ser muito eficiente na detecção de cianotoxinas por MALDI-MS. Através de

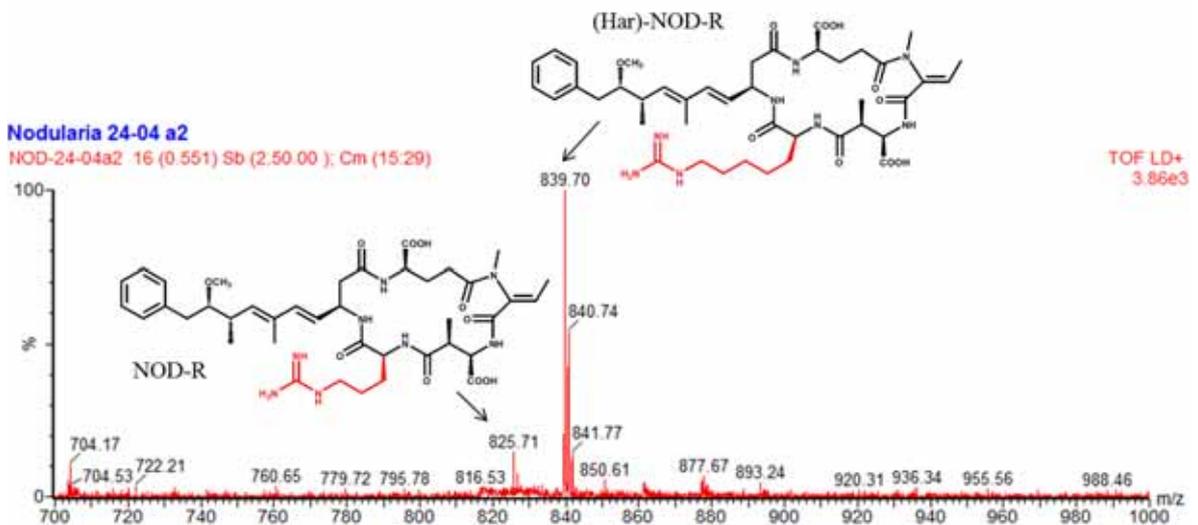
análises realizadas em nosso laboratório, detectamos com eficiência as cianotoxinas: MC-LR e D-Asp-MC-LR, microcistinas produzidas pela espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e (Har)-NOD-R e NOD-R, nodularinas produzidas pela espécie *Nodularia harveyana* PCC 7804.

A **Figura 22** apresenta o espectro das microcistinas produzidas pela *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, e a **Figura 23** apresenta o espectro das nodularinas produzidas pela *Nodularia harveyana* PCC 7804.

**Figura 22.** Espectro de MALDI-(+)-MS das microcistinas produzidas pela espécie *Microcystis aeruginosa* PCC 7820.

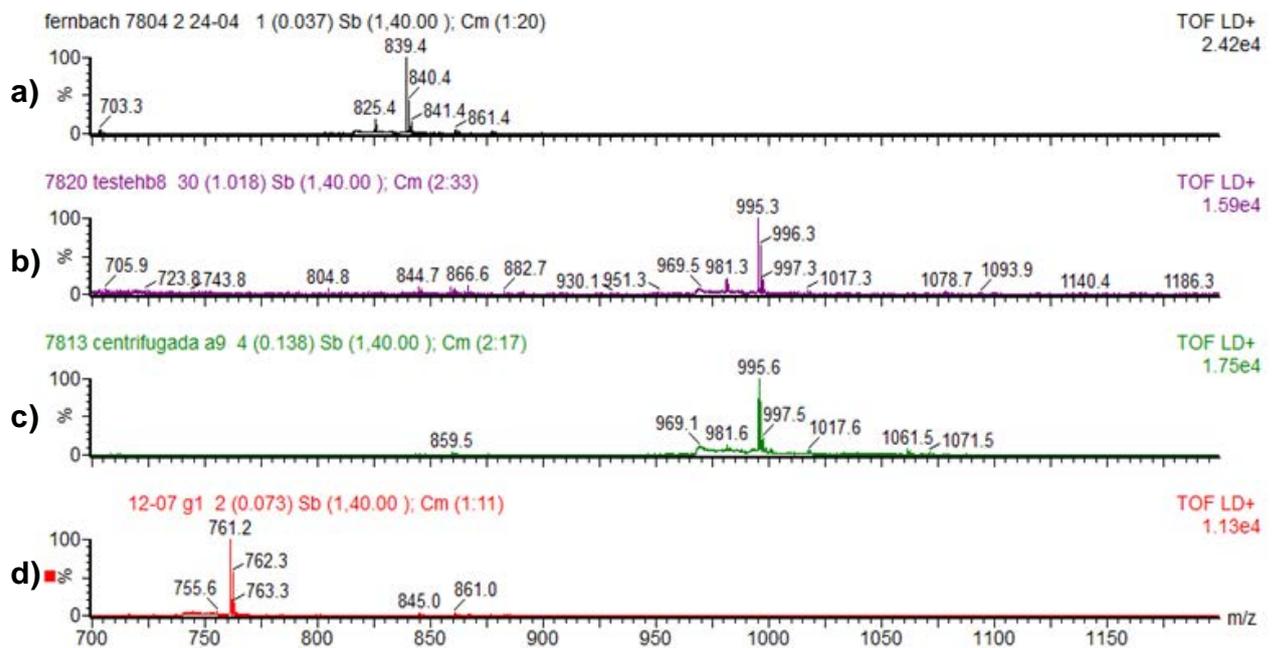


**Figura 23.** Espectro de MALDI-(+)-MS das nodularinas produzidas pela espécie *Nodularia harveyana* PCC 7804.



Com a obtenção das novas culturas de cianobactérias, *Anabaena cylindrica* PCC 7122 e *Microcystis aeruginosa* PCC 7813, submetemos o método *vacuum drying adaptado* a mais uma avaliação: verificar a sua eficiência na detecção das diferentes cianotoxinas produzidas por essas novas culturas. A **Figura 24** apresenta os espectros obtidos com todas as culturas de cianobactérias disponíveis em nosso laboratório.

**Figura 24.** Espectro de MALDI-(+)-MS das culturas de cianobactérias: **a)** *Nodularia harveyana* PCC 7804. **b)** *Microcystis aeruginosa* PCC 7820. **c)** *Microcystis aeruginosa* PCC 7813. **d)** *Anabaena cylindrica* PCC 7122.



Analisando e comparando os espectros **B** e **C** da **Figura 24**, verificamos que a cultura de *Microcystis aeruginosa* PCC 7813 também produz as microcistinas, MC-LR  $[M + H]^+$  referente ao íon de  $m/z$  995 e D-Asp-MC-LR  $[M + H]^+$  referente ao íon de  $m/z$  981.

A **Figura 24D** apresenta o espectro de MALDI-MS referente a análise da cultura da cianobactéria *Anabaena cylindrica* PCC 7122. Como podemos observar através da **Figura 24D**, o espectro apresentou como sinal mais intenso o íon de  $m/z$  761. Comparando o espectro **D** com os espectros **A**, **B** e **C** da **Figura 24**, observamos que o sinal de  $m/z$  761 encontra-se presente no espectro referente a cultura da *Anabaena cylindrica* PCC 7122 e ausente nos espectros das duas espécies de *Microcystis aeruginosa* e *Nodularia harveyana*. Esta ausência

indica que este sinal provavelmente está relacionado a algum metabólito produzido por esta espécie de cianobactéria.

Com estes resultados, verificamos que o método *vacuum drying adaptado* foi eficiente na detecção de diferentes metabólitos de cianobactérias. Constatamos que a *Microcystis aeruginosa* PCC 7813 produz duas microcistinas, a MC-LR e a D-Asp-MC-LR. Verificamos também que a *Anabaena cylindrica* PCC 7122 produz um peptídeo, que é detectado com eficiência com o nosso método de preparo de amostra adaptado.

#### 4.2 Métodos de preparo de amostra para MALDI-MS

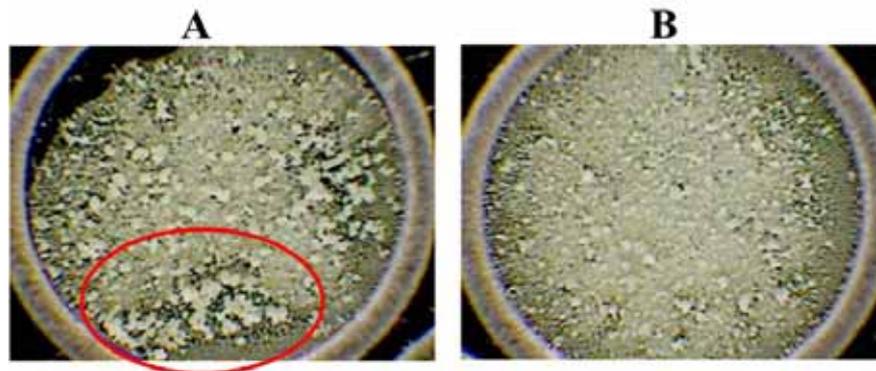
O preparo das amostras é considerado um dos passos mais importantes em uma análise por MALDI-MS, pois a qualidade em que as amostras são preparadas terá influência na qualidade dos resultados das análises (HOSSAIN; LIMBACH, 2010).

Os métodos de preparo de amostras para análise por MALDI-MS devem visar a redução da complexidade da amostra, minimizando ou eliminando sinais potencialmente interferentes. Estes métodos devem ser altamente reprodutíveis e devem minimizar a possibilidade de introduzir contaminantes que resultem em uma maior variabilidade na intensidade do sinal (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008). Os métodos de preparo de amostras também influenciam a cristalização da matriz no spot, outra variável importante em uma análise por MALDI-MS.

O processo de cristalização da mistura matriz/amostra é também uma variável que deve ser observada durante a preparação, pois também irá interferir na qualidade do espectro. As cristalizações rápidas da mistura matriz/amostra geram cristais menores e uma maior incorporação do analito na estrutura cristalina, ao passo que uma cristalização mais lenta forma cristais maiores e a incorporação do analito na amostra é altamente variável (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008).

As diferenças nas cristalizações podem ser visualizadas através da **Figura 25**.

**Figura 25.** Imagens de microscopia da cristalização da mistura matriz/amostra nos spots da placa de MALDI com aumento de 40x: **a)** Cristalização não uniforme e não homogênea. **b)** Cristalização bem uniforme e homogênea.



Fonte: [Milagre](#)

Podemos observar através da **Figura 25** que as cristalizações não são iguais, mesmo utilizando as mesmas condições de preparo e no mesmo dia.

As cristalizações como da **Figura 25A** não são consideradas eficientes por não serem uniformes e homogêneas. Uma distribuição não uniforme diminui a presença da mistura matriz/amostra cristalizadas em qualquer ponto do spot, dificultando a automatização e a identificação do seu analito por MALDI-MS. Também podemos observar, destacado em vermelho, que a cristalização não foi homogênea por todo o spot. A presença de regiões não homogêneas interferem na detecção do analito, dificultando a reprodutibilidade e assim a quantificação por MALDI-MS.

Visando avaliar a eficiência do método de preparo de amostra *vacuum drying adaptado*, selecionamos 11 métodos de preparo de amostra para MALDI-MS e os comparamos com o nosso método de preparo. Estes métodos foram selecionados por serem os mais utilizados na análise de peptídeos e proteínas por MALDI-MS. Alguns destes métodos também foram selecionados, principalmente, por terem sido utilizados para a detecção e quantificação de microcistinas. A **Tabela 7** apresenta os métodos preparo de amostra selecionados.

**Tabela 7.** Métodos de preparo de amostra e principais moléculas analisadas.

<b>Métodos de preparo de amostra para MALDI-MS</b>	<b>Analitos</b>
<i>Dried Droplet</i> (PUDDICK et al., 2012)	peptídeos, proteínas e microcistinas
<i>Sonicated Dried Droplet</i> (PUDDICK et al., 2012)	peptídeos, proteínas e microcistinas
<i>Thin Layer</i> (PUDDICK et al., 2012)	peptídeos, proteínas e microcistinas
<i>Thin Layer Spot</i> (PUDDICK et al., 2012)	peptídeos, proteínas e microcistinas
<i>Thin Layer Line</i> (PUDDICK et al., 2012)	peptídeos, proteínas e microcistinas
Uso de sulfato de zinco heptahidratado (HOWARD; BOYER, 2007a)	peptídeos, proteínas e microcistinas
<i>Vacuum Drying</i> (WEINBERGER et al., 1993)	peptídeos e proteínas
<i>Fast Evaporation</i> (VORM; ROEPSTORFF; MANN, 1994)	peptídeos e proteínas
<i>Sandwich</i> (XIANG; BEAVIS, 1994)	peptídeos e proteínas
<i>Quick and Dirty</i> (KARAS; HILLENKAMP, 1988)	peptídeos e proteínas
<i>Ultra Thin Layer</i> (FENYO et al., 2007)	peptídeos e proteínas

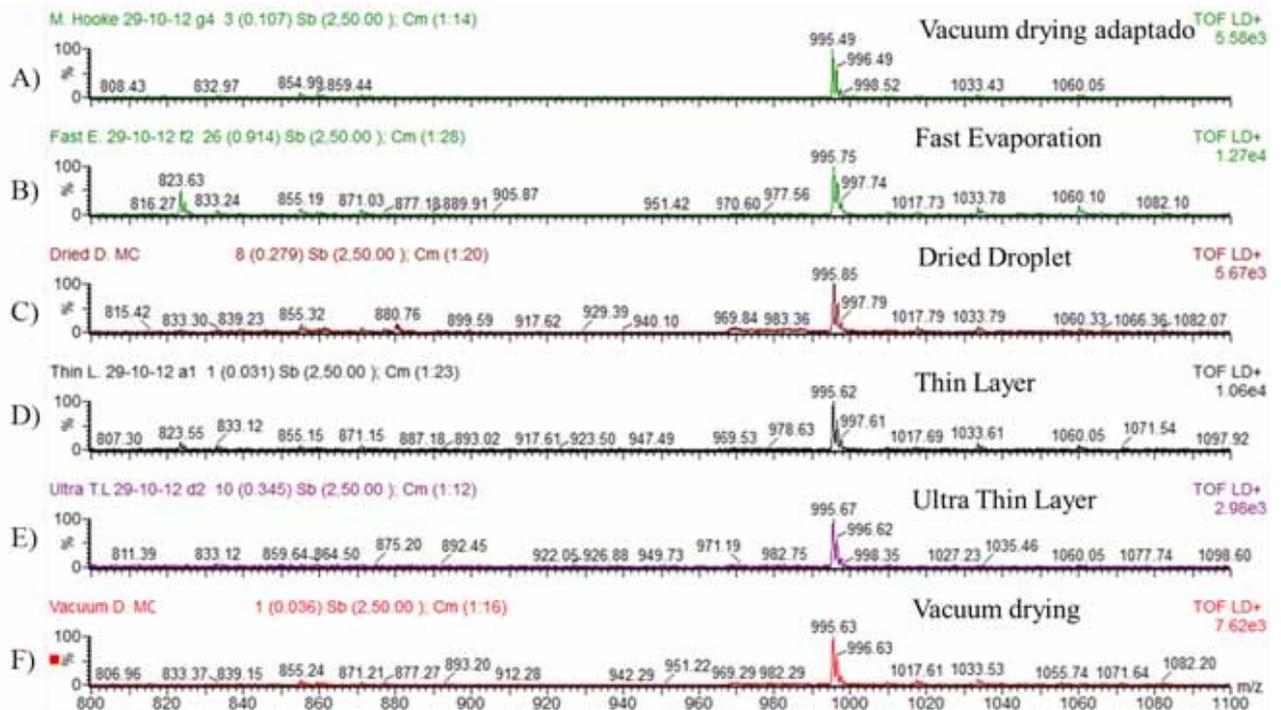
#### 4.2.1 Análise de microcistinas por MALDI-MS utilizando diferentes métodos de preparo de amostra

Os métodos de preparo de amostra foram primeiramente avaliados utilizando o padrão comercial da MC-LR em triplicata. A eficiência dos métodos foi avaliada através da sua cristalização, qualidade dos espectros e detecção do analito.

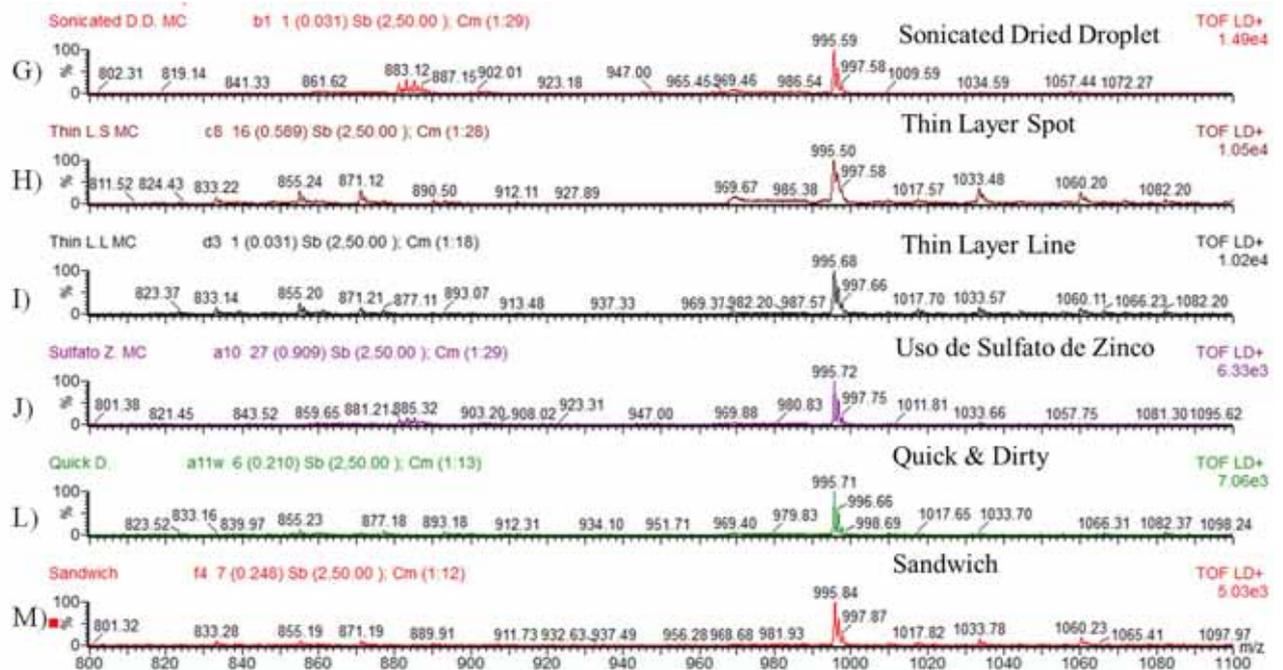
Como foi explicado anteriormente, a forma do preparo de amostra e a cristalização da mistura matriz/amostra serão avaliadas, pois ambos possuem influência na qualidade e na reprodutibilidade dos espectros obtidos.

Os melhores resultados obtidos são apresentados na **Figura 26 e 27**.

**Figura 26.** Espectros de MALDI-(+)-MS dos métodos de preparo de amostra para MALDI-MS.



**Figura 27.** Espectros de MALDI-(+)-MS dos métodos de preparo de amostra para MALDI-MS.



Como podemos observar através dos espectros das **Figura 26 e 27**, todos os métodos foram muito eficientes para a detecção da MC-LR. O íon de  $m/z$  995, referente a MC-LR  $[M+H]^+$ , está presente em todos os espectros e com uma excelente razão sinal/ruído.

Podemos notar que todos os espectros apresentaram o sinal de  $m/z$  1033 referente ao aduto de potássio da MC-LR  $[M+K]^+$ . O sinal de  $m/z$  1017, relativo ao aduto de sódio  $[M+Na]^+$ , está presente apenas em alguns espectros.

Estes resultados demonstram como os métodos de preparo de amostras influenciam na qualidade dos espectros. Como já explicado, estes métodos devem minimizar ou eliminar sinais potencialmente interferentes, como os adutos presentes em alguns espectros. Esses múltiplos sinais de adutos, como a  $[M+K]^+$  e  $[M+Na]^+$  podem enfraquecer o sinal do analito de interesse dificultando sua identificação e quantificação.

Das mais de 80 variantes de microcistinas detectadas até o momento, todas estão agrupadas na faixa entre 900 a 1100 Da (PUDDICK et al., 2012). Em amostras ambientais, com várias variantes das microcistinas, cada uma pode apresentar um ou vários sinais de adutos. Como consequência destes sinais de adutos, pode ocorrer uma sobreposição das massas ou uma supressão da intensidade do sinal da microcistina, dificultando significativamente a identificação e a quantificação das variáveis de microcistinas utilizando MALDI-MS.

Visualmente, o método *vacuum drying adaptado* obteve o melhor resultado. O espectro obtido teve a melhor relação sinal/ruído. Notamos através do espectro **A** da **Figura 26** que este método foi o único que não apresentou ruídos na faixa de  $m/z$  entre 850 até 1030. O método *vacuum drying adaptado* também não apresentou o sinal de  $m/z$  1017, relativo ao aduto de sódio  $[M + Na]^+$ , demonstrando que este método minimiza sinais potencialmente interferentes.

#### **4.2.1.1 Avaliação da cristalização da mistura matriz/amostra dos diferentes métodos de preparo de amostra**

Após observar os espectros obtidos, analisamos a homogeneização e a uniformidade da cristalização da mistura matriz/amostra. A **Figura 28** apresenta as cristalizações obtidas.

**Figura 28.** Imagens de microscopia dos métodos de preparo de amostra com aumento de 40x.



Fonte: [Milagre](#)

Visualmente, os métodos *sonicated dried droplet* e uso de sulfato de zinco, foram muito similares, apresentando áreas com ausência da mistura matriz/amostra cristalizada. Em ambos os métodos a amostra foi misturada com a matriz em um eppendorf e homogeneizada em um banho de ultrassom, por 5 minutos no método *sonicated dried droplet* e por 3 minutos no método uso de sulfato de zinco.

Podemos observar que o método *sonicated dried droplet* obteve uma cristalização mais homogênea quando comparado com o método uso de sulfato de zinco. Este resultado demonstrou que o tempo que a mistura matriz/amostra ficou no banho de ultrassom, influenciou na homogeneização da cristalização.

Os métodos *thin layer spot*, *thin layer* e *fast evaporation* também apresentaram regiões da placa com ausência de matriz/amostra cristalizadas. Mas a região onde a cristalização se encontra presente pode-se notar que sua distribuição está bem homogênea. Nesses métodos, a acetona foi utilizada como solvente e como a sua evaporação é muito rápida a cristalização se torna mais homogênea.

Os métodos *vacuum drying* e *dried droplet* apresentaram uma boa cristalização, com cristais pequenos, mas também com regiões com ausência da mistura matriz/amostra cristalizadas. O método *vacuum drying* é uma variação do método *dried droplet* (ANALYTIX, 2001), no qual a mistura matriz/amostra é cristalizada a vácuo. Como podemos observar através da **Figura 28**, houve uma pequena diferença nas cristalizações, onde no método *vacuum drying* os cristais ficaram um pouco menores. Dessa forma, observamos que a inclusão do vácuo na cristalização da amostra reduz o tamanho dos cristais e aumenta a homogeneidade.

Os métodos *sandwich* e *ultra thin layer* apresentaram uma cristalização semelhante. Em ambos os procedimentos desses métodos há a necessidade de duas soluções de matrizes supersaturadas. Estes métodos apesar de apresentaram regiões da placa com ausência de matriz/amostra cristalizadas, as regiões onde a cristalização se encontra presente está bem homogênea.

No método *ultra thin layer* a primeira solução de matriz é espalhada por toda a região do spot, tendo a amostra lavada e aspirada posteriormente. Este procedimento está bem visível na cristalização. Podemos observar que a matriz foi arrastada pelo spot, e que o procedimento de aspirar a mistura matriz/amostra deixou a superfície mais homogênea.

Os métodos *vacuum drying adaptado* e *quick & dirty* foram os métodos que apresentaram as melhores cristalizações. A mistura matriz/amostra cristalizada está presente em toda a região do spot e bem homogênea. Em ambos os métodos a amostra é aplicada primeiramente e posteriormente a solução de matriz. A presença de cristais menores no método *quick & dirty* se deve ao fluxo de ar que é aplicado, retirando o excesso da mistura matriz/amostra cristalizada.

O método *thin layer line*, foi o método que mais apresentou regiões com ausência de amostra pela região do spot. Podemos notar a linha que foi formada, por causa do arraste da micropipeta, prejudicou a presença da cristalização da matriz/amostra por todo o spot.

Avaliando e comparando todos os métodos de preparo de amostra, observamos que o método *vacuum drying adaptado* apresentou os melhores resultados: espectros com uma razão sinal/ruído e uma cristalização homogênea e bem uniforme.

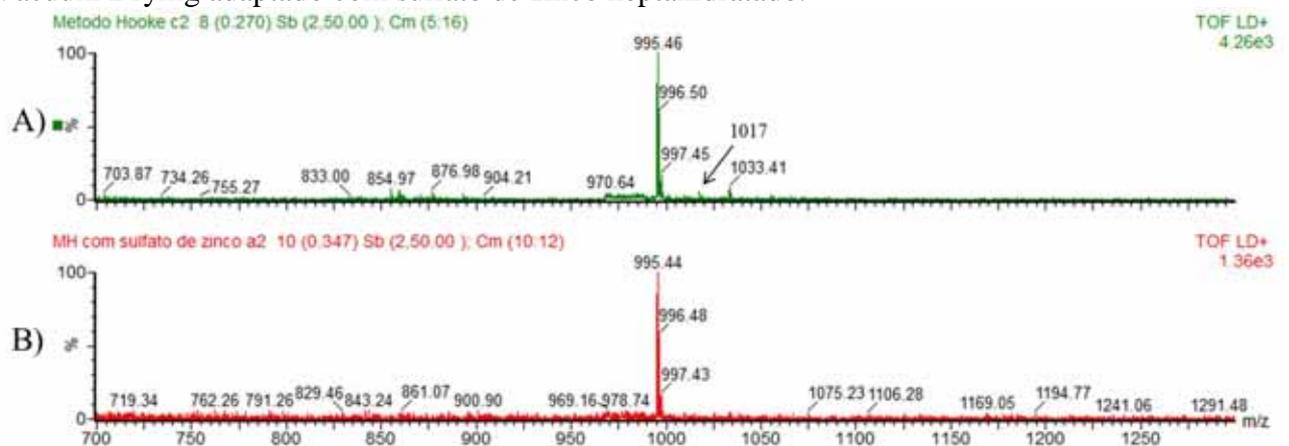
### 4.3 Otimização do método *vacuum drying adaptado*

Visando o aperfeiçoamento do método *vacuum drying adaptado* com o intuito de reduzir os adutos de metais alcalinos, outro parâmetro foi avaliado e acrescentado ao método para a sua melhoria nas análises das microcistinas.

Utilizando a mesma solução de matriz, mantendo o padrão comercial da MC-LR e a secagem a vácuo, uma solução de sulfato de zinco heptahidratado, na concentração de 200  $\mu\text{mol/L}$ , foi adicionada no procedimento de preparo de amostra (HOWARD; BOYER, 2007a). A solução de sulfato de zinco heptahidratado foi adicionada para suprimir os adutos de sódio e potássio.

As análises foram realizadas preparando as amostras de duas maneiras: uma da forma convencional e a outra com a adição da solução de sulfato de zinco heptahidratado. A **Figura 29** apresenta os resultados obtidos.

**Figura 29.** Espectros de MALDI-(+)-MS. **a)** Método Vacuum Drying adaptado. **b)** Método Vacuum Drying adaptado com sulfato de zinco heptahidratado.



Ao visualizar o espectro **A** da **Figura 29**, notamos que há a presença de adutos de sódio e potássio na forma clássica como preparamos as análises.

Com a adição da solução de sulfato de zinco heptahidratado observou-se a eliminação da intensidade dos sinais dos adutos de sódio e potássio. Não há presença dos sinais de  $m/z$  1033 relativo ao aduto de potássio, e de  $m/z$  1017 relativo ao aduto de sódio no espectro **B** da **Figura 29**.

#### 4.4 Avaliação dos métodos de preparo de amostra

Para avaliar a reprodutibilidade dos métodos de preparo de amostra, todos os métodos foram submetidos a uma análise com o padrão comercial da MC-RR. Um padrão interno (Angiotensina I) foi adicionado nas amostras, junto com uma solução de sulfato de zinco heptahidratado (HOWARD; BOYER, 2007a; PUDDICK et al., 2012).

A angiotensina I foi selecionada como padrão interno pela sua massa molecular, e por apresentar a mesma eficiência de ionização com relação às microcistinas. A bradicinina também foi selecionada como um padrão interno nas análises para as microcistinas, mas a sua massa molecular de 1060 Da foi um requisito para não a utilizarmos nas análises.

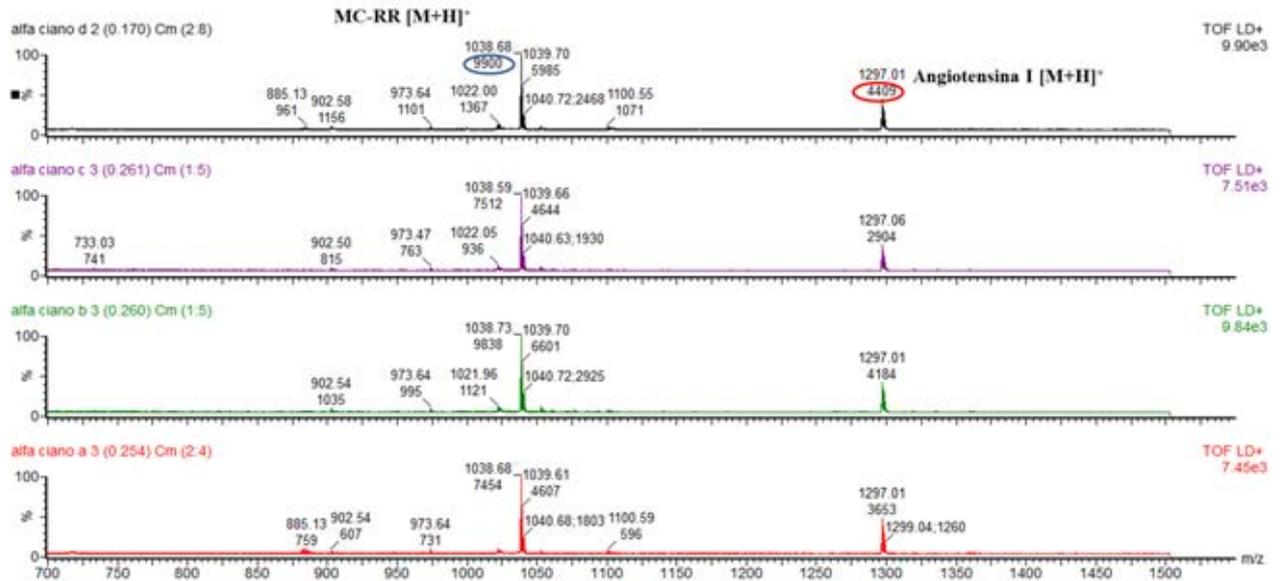
As microcistinas possuem massa molecular na faixa de 900 a 1100 Da. Um padrão interno utilizado para analisá-las não pode ter uma massa molecular muito próxima das microcistinas, pois pode ocorrer uma sobreposição das massas.

A adição de um padrão interno nas amostras teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade das análises por MALDI-MS. E a adição da solução de sulfato de zinco heptahidratado, como já citado, teve como princípio reduzir a formação de adutos de sódio e potássio.

Em uma análise por MALDI-MS ocorrem variações em diferentes spots da placa, denominado, reprodutibilidade *spot-to-spot*. A baixa reprodutibilidade *spot-to-spot* nas análises acaba se tornando um obstáculo na quantificação do analito, pois há uma variabilidade substancial na linha de base, e na razão sinal/ruído (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008; PUDDICK et al., 2012).

Para verificar a reprodutibilidade *spot-to-spot* de cada método de preparo, foram realizadas análises em quadruplicatas, utilizando a razão da altura da intensidade do sinal da MC-RR com relação ao sinal da angiotensina I, **Figura 30**.

**Figura 30.** Espectro de MALDI(+)-MS do método vacuum drying adaptado com a intensidade dos sinais da MC-RR e da Angiotensina I.



Como podemos observar através da **Figura 30**, através das razões das intensidades do sinal da MC-RR (destacado em azul) pela da angiotensina I (destacado em vermelho), que o coeficiente de variação (CV) foi calculado e através das médias destas razões que as curvas analíticas foram construídas (PUDDICK et al., 2012).

Após a analisar os espectros e as cristalizações dos diferentes métodos de preparo de amostra, os CVs foram calculados para conferir a reprodutibilidade *spot-to-spot* de cada método. A **Tabela 8** apresenta os métodos de preparo de amostra com seus respectivos CVs obtidos.

**Tabela 8.** Desempenho dos métodos de preparo de amostra para MALDI-MS.

Métodos de Preparo de Amostra	Coefficiente de Variação (%)
<i>Sandwich</i>	5,1
<i>Quick &amp; Dirty</i>	5,9
<i>Vacuum Drying Adaptado</i>	6,0
<i>Fast Evaporation</i>	6,7
Uso de Sulfato de Zinco	7,4
<i>Thin Layer Spot</i>	8,0
<i>Vacuum Drying</i>	8,7
<i>Sonicated Dried Droplet</i>	10,9
<i>Ultra Thin Layer</i>	12,5
<i>Dried Droplet</i>	13,4
<i>Thin Layer</i>	14,3
<i>Thin Layer Line</i>	21,1

Como podemos observar através da **Tabela 8**, os métodos *Vacuum Drying Adaptado*, *Fast Evaporation*, *Sandwich* e *Quick & Dirty* foram os métodos que apresentaram os menores CVs, demonstrando uma boa reprodutibilidade do sinal, em torno de 6%. Os métodos que apresentaram CVs de 7 a 10% já não apresentaram uma boa reprodutibilidade. Já os métodos *Thin Layer*, *Dried Droplet*, *Ultra Thin Layer* e *Thin Layer Line* foram os métodos onde o nível de reprodutibilidade não foi alcançado, quando comparados com os outros métodos, pois os CVs obtidos foram acima de 12%.

#### 4.4.1 Influência da energia do laser em cada método de preparo de amostra

O M@LDI-LR (Micromass<sup>®</sup>, Manchester, Reino Unido), equipamento utilizado nesta dissertação, é equipado com dois controles de energia do laser: um controle de atenuação do laser com três níveis de energia, alta, média e baixa; e outro controle de energia do laser de 0 a 100%.

A intensidade do laser aplicada em uma análise por MALDI-MS também influencia a intensidade do sinal do meu analito, interferindo na quantificação. Ao analisar sem um padrão

interno, a variação da energia do laser altera a intensidade do sinal do analito e, consequentemente, a concentração da amostra calculada.

A adição de um padrão interno, não só permite verificar a reprodutibilidade *spot-to-spot*, como também permite verificar a melhor energia do laser para a análise. Através dos valores de CVs obtidos, observamos a melhor intensidade do laser para cada spot de cada método de preparo de amostra utilizado. Em todas as análises o nível de energia do laser foi mantido no nível baixo e o controle de energia variou de 0-50%, dependendo do método utilizado. A **Tabela 9** apresenta a energia do laser obtida para cada método de preparo de amostra.

**Tabela 9.** Intensidade do laser observada para cada método de preparo de amostra com o nível de energia mantido no baixo.

Métodos	Energia do laser (0-100%)
<i>Sandwich</i>	31-40
<i>Quick &amp; Dirty</i>	27-30
<i>Vacuum Drying Adaptado</i>	25
<i>Fast Evaporation</i>	27-29
<b>Uso de Sulfato de Zinco</b>	32-41
<i>Thin Layer Spot</i>	24-32
<i>Vacuum Drying</i>	25-31
<i>Sonicated Dried Droplet</i>	20-30
<i>Ultra Thin Layer</i>	35-41
<i>Dried Droplet</i>	29-40
<i>Thin Layer</i>	30-40
<i>Thin Layer Line</i>	29-34

Podemos observar através da **Tabela 9** que os métodos de preparo de amostra obtiveram uma energia do laser dentro de uma faixa. Observamos que a faixa ideal da energia do laser está entre 20-40%. Para intensidades menores do laser, notamos que os espectros não apresentavam o sinal relativo a amostra. E para intensidades do laser acima deste intervalo, o sinal da angiotensina I saturava o detector interferindo na intensidade do sinal da amostra.

O método *vacuum drying adaptado* foi o único método onde conseguimos fixar a energia do laser para 25%. Com os outros métodos não foi possível fixar o laser, pois variava muito de spot para spot. Por exemplo, o método *sandwich* que obteve um intervalo da intensidade do laser de 31 a 40%. Este intervalo demonstra que em um spot a energia do laser utilizada foi de 31%. Na mesma análise, mas em outro spot, a energia do laser foi aumentada para 37%, pois abaixo deste valor a microcistina não foi detectada. O oposto também ocorria, a energia do laser foi diminuída entre um spot e o outro, pois a energia do laser estava muito alta para aquele spot, saturando o detector.

#### **4.5 Análise quantitativa das microcistinas**

A análise quantitativa por MALDI-MS tem sido utilizada como uma ferramenta de análise apenas recentemente. Obstáculos como uma distribuição não homogênea da cristalização da mistura matriz/amostra em toda a superfície da placa de MALDI, origina regiões onde o sinal do analito é relativamente mais intenso do que em outras regiões da placa (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008). Outro obstáculo é a baixa reprodutibilidade *spot-to-spot*, *shot-to-shot* e *sample-to-sample* nas análises (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008; PUDDICK et al., 2012). Há uma variabilidade substancial na linha de base, no ruído e na intensidade do sinal nos espectros gerados a partir da mesma amostra. Essas variações são observadas com disparos consecutivos do laser na mesma posição da superfície da placa (reprodutibilidade *shot-to-shot*), em diferentes locais da placa (reprodutibilidade *spot-to-spot*) e entre cargas idênticas da mesma amostra em alvos diferentes (reprodutibilidade *sample-to-sample*) (DUNCAN; RODER; HUNSUCKER, 2008).

O uso de um padrão interno é utilizado como artifício para superar esse problema da reprodutibilidade das análises por MALDI-MS, onde o sinal do analito é comparado com o sinal do padrão interno. Para se utilizar um padrão interno, este precisa ter propriedades químicas e físicas semelhantes às do analito e estar, preferencialmente, disponível comercialmente (HOWARD; BOYER, 2007b; PUDDICK et al., 2012).

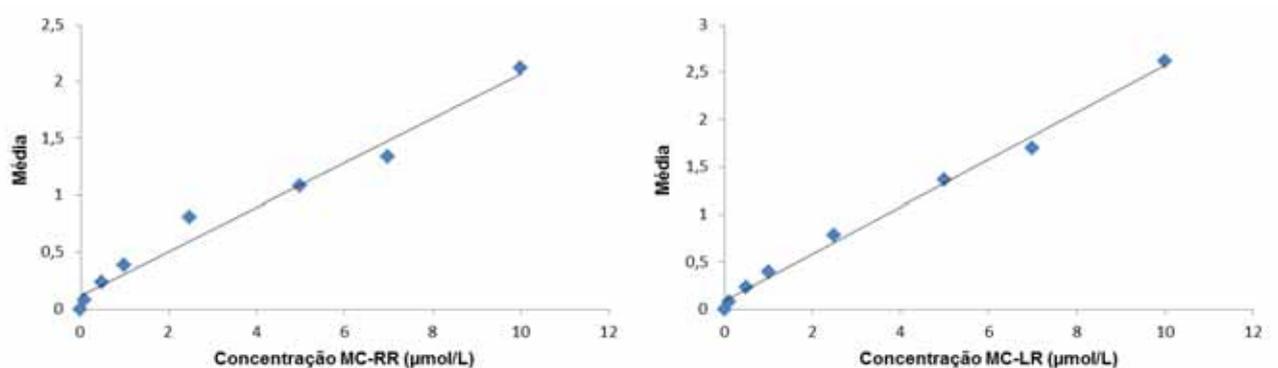
A vantagem de se utilizar o MALDI-MS para quantificação das cianotoxinas está no rápido tempo de análise, no simples preparo da amostra e pouca quantidade de amostra utilizada, na identificação das variáveis das cianotoxinas, além de ser adequado para automatização o que permite que uma grande quantidade de amostras de cianotoxinas seja

analisada rapidamente e automaticamente (HOWARD; BOYER, 2007b; PUDDICK et al, 2012).

Para a obtenção da curva analítica com o objetivo de quantificar as microcistinas, utilizamos o método *vacuum drying adaptado* devido ao seu CV obtido, sua cristalização e a facilidade no preparo de amostra com relação aos outros métodos. Observamos que esse método obteve um dos melhores CVs, uma cristalização homogênea e condições simples e rápidas na sua forma de preparo.

A avaliação do desempenho quantitativo do método de preparo de amostra *vacuum drying adaptado* foi conduzida utilizando os padrões comerciais da MC-LR e da MC-RR em diferentes concentrações e em quadruplicata. As curvas analíticas, para cada MC, foram construídas utilizando concentrações no intervalo de 0,1-10  $\mu\text{mol/L}$  com a potência do laser fixa em 25%. Para cada concentração, a média da razão da intensidade do sinal da MC pela da angiotensina I foi calculado. A **Figura 31** apresenta as curvas analíticas obtidas.

**Figura 31.** Curvas analíticas das microcistinas MC-RR e MC-LR.



O método do limite de detecção (MLD) foi determinado utilizando uma solução de 40% de metanol como o branco e, 0,02  $\mu\text{mol/L}$  da MC-RR e 0,01  $\mu\text{mol/L}$  da MC-LR, onde sete repetições do branco ( $X_0$ ) e sete da amostra ( $X_s$ ) foram aplicadas na placa de MALDI. A **Tabela 10** apresenta os MLDs e os LDQs obtidos.

**Tabela 10.** Desempenho quantitativo do método *Vacuum Drying Adaptado* utilizando dois padrões de MCs.

Microcistina	MLD ( $\mu\text{mol/L}$ )	LDQ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Equação da Regressão	r	R <sup>2</sup>
MC-LR	0,128	0,410-10	$y = 0,249x + 0,0839$	0,99	0,99
MC-RR	0,056	0,180-10	$y = 0,1947x + 0,1206$	0,98	0,98

O método *vacuum drying adaptado* apresentou para cada curva analítica construída uma boa linearidade, com  $r = 0,99$  para a MC-LR e  $r = 0,98$  para a MC-RR, demonstrando que o método é eficiente para a quantificação de microcistinas.

Podemos observar, através da **Tabela 10**, que as equações da regressão de cada curva analítica são diferentes. Essa diferença está associada a variação da eficiência de ionização por MALDI-MS para cada variante de microcistina e, por isso a necessidade de se construir uma curva analítica padrão para cada variante (HOWARD; BOYER, 2007b; PUDDICK et al., 2012).

#### **4.6 Seleção de diferentes matrizes utilizando diferentes procedimentos no preparo da amostra**

Com a seleção e os resultados dos parâmetros descritos anteriormente, optamos por selecionar 8 diferentes matrizes e avaliá-las com três diferentes formas de preparo. Os resultados obtidos com o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico utilizando o método *vacuum drying adaptado* foram muito bons, mas resolvemos avaliar novas matrizes com novos procedimentos, visando melhorar ainda mais os resultados.

A seleção de uma matriz apropriada é essencial para assegurar uma boa análise por MALDI-MS (STOECKLI; SCHLUNEGGER, 1996). Estudos comprovam que para diferentes tipos de analitos, diferentes compostos são utilizados como matriz, melhorando os resultados das análises (JASKOLLA; LEHMANN; KARAS, 2008; KRAUSE; STOECKLI; SCHLUNEGGER, 1996; SHANTA et al., 2012).

Para o desenvolvimento ou seleção de uma matriz é essencial que: esta diminua a razão sinal/ruído da linha de base do espectro, para facilitar a identificação do analito. Ou que esta matriz aumente a intensidade do sinal do analito, para melhorar o limite de detecção (SHANTA et al., 2012).

Em todas as análises realizadas nos outros itens desta dissertação, utilizamos como matriz o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, por ser considerada uma matriz “universal” nas análises de proteínas e peptídeos por MALDI-MS (LESZYK, 2010). Com o objetivo de encontrar uma matriz diferente, que melhore o limite de detecção e quantificação das microcistinas, 8 diferentes matrizes foram avaliadas.

As matrizes foram selecionadas de acordo com suas estruturas químicas, pois se assemelham muito a estrutura do ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. A **Figura 32** apresenta a estrutura química geral, demonstrando a semelhança das matrizes avaliadas com a estrutura química do  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

**Figura 32.** Estrutura geral das matrizes.



Matriz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico	H	OH	H	CN
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico	H	Cl	H	CN
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico	H	Benziloxi	H	CN
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico	H	Ph	H	CN
Ácido sinapínico	CH <sub>3</sub> OH	OH	CH <sub>3</sub> OH	H
Ácido ferúlico	CH <sub>3</sub> OH	OH	H	H
Ácido caféico	OH	OH	H	H
Ácido cumárico	H	OH	H	H

O ácido gentísico não se encontra na Figura 22, pois sua estrutura química é a única que não se assemelha tanto ao  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Mas esta matriz também foi selecionada, por ser uma matriz muito utilizada nas análises de proteínas e peptídeos (COLE, 2010; SIGMA-ALDRICH, 2012). Os ácidos sinapínico, ferúlico e caféico além de possuírem uma estrutura química semelhante ao ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, também foram selecionados por serem matrizes utilizadas nas análises de proteínas e peptídeos (COLE, 2010; SIGMA-ALDRICH, 2012).

O ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico foi selecionado por ser uma nova matriz, desenvolvida por Karas e colaboradores (JASKOLLA; LEHMANN; KARAS, 2008). Esta nova matriz demonstrou aumentar a eficiência de ionização do analito, resultando em uma maior intensidade do sinal, (JASKOLLA; LEHMANN; KARAS, 2008), proporcionando um melhor limite de detecção (LESZYK, 2010).

As matrizes selecionadas foram primeiramente analisadas com três diferentes procedimentos no seu preparo. A avaliação destas matrizes foi realizada com relação a cristalização da mistura matriz/amostra, espectros obtidos e CV.

Após a análise das matrizes, a melhor matriz foi selecionada e misturada com o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, visando a melhoria na intensidade do sinal da microcistina e assim melhorando o limite de detecção.

Em todas as análises, o padrão comercial da MC-RR foi utilizado na concentração de 2,5  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.6.1 Análise de microcistinas por MALDI-MS utilizando diferentes matrizes

Visando a seleção de uma nova matriz nas análises de microcistinas, as matrizes selecionadas foram analisadas sob três diferentes formas de preparo de amostra: matriz cristalizada a vácuo, matriz cristalizada a temperatura ambiente e solução de matriz homogeneizada em um ultrassom de alta potência. As **Figuras 33, 34, e 35** apresentam os espectros obtidos das matrizes com os três procedimentos.

Como podemos observar pelos espectros das **Figuras 33, 34 e 35**, todas as matrizes foram muito eficientes para a detecção do padrão comercial da MC-RR. O íon de  $m/z$  1038, referente a MC-RR  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , está presente em todos os espectros e com uma boa razão sinal/ruído, com exceção do ácido cumárico.

O ácido cumárico, **Figura 34D e E e F**, foi a única matriz que apresentou espectros com baixa razão sinal/ruído, que podem interferir na curva analítica.

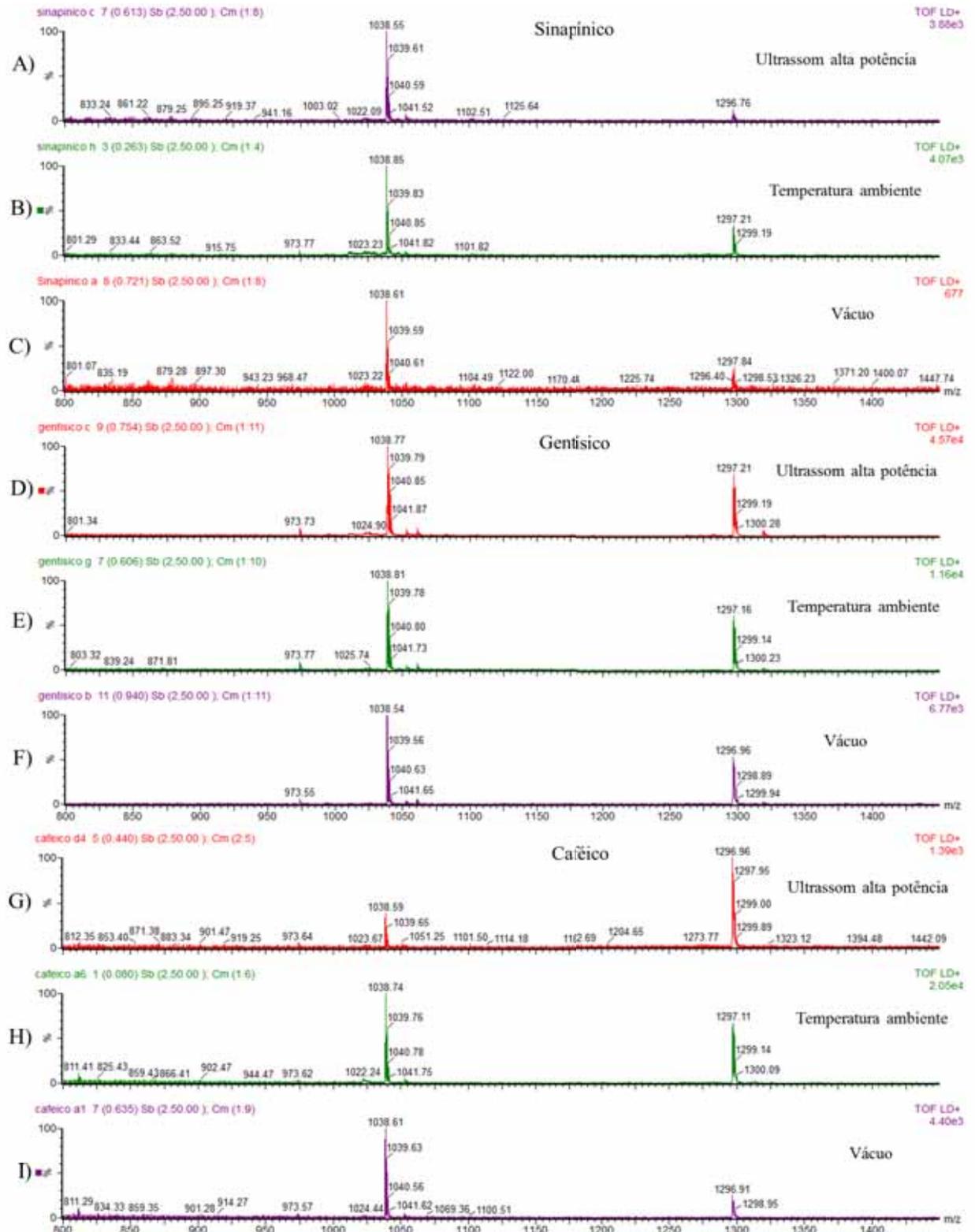
Os ácidos caféico, gentísico, sinapínico e  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico, foram as matrizes que não apresentaram ruídos na faixa de  $m/z$  entre 1000 até 1350, demonstrando que estas matrizes minimizam sinais potencialmente interferentes.

Observamos também que mesmo a amostra estando na mesma concentração há diferença na ionização entre as matrizes. As matrizes: ácido sinapínico, ácido gentísico, ácido

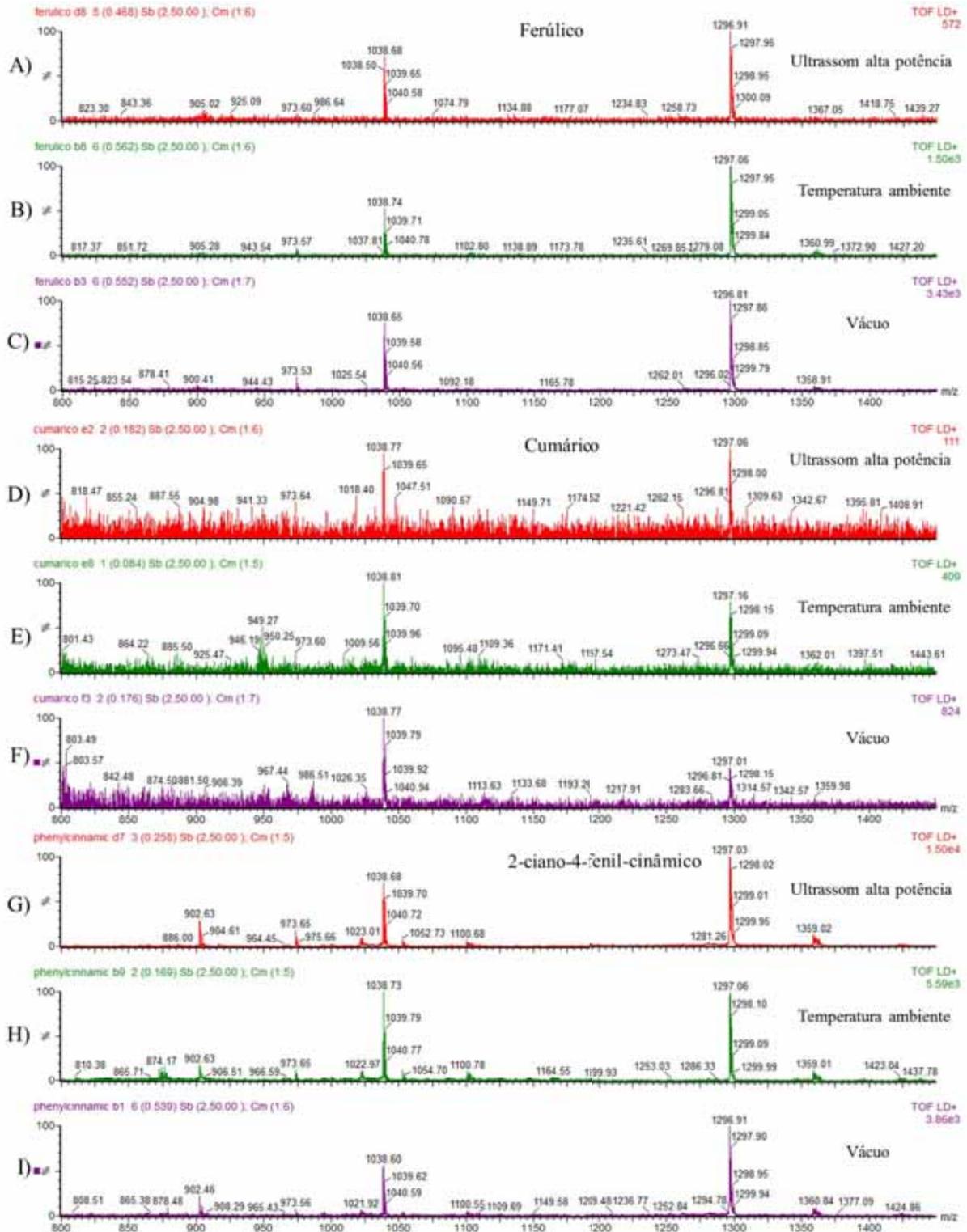
cumárico, ácido  $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico e ácido caféico apresentam uma maior intensidade do sinal para a MC-RR. Já as matrizes: ácido  $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico, ácido ferúlico e o  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico apresentaram uma intensidade menor.

Esta diferença entre as intensidades dos sinais da MC-RR obtida em cada matriz é um fator importante a ser observado. Quanto mais intenso o sinal da amostra for, há a possibilidade de melhorar o limite de detecção.

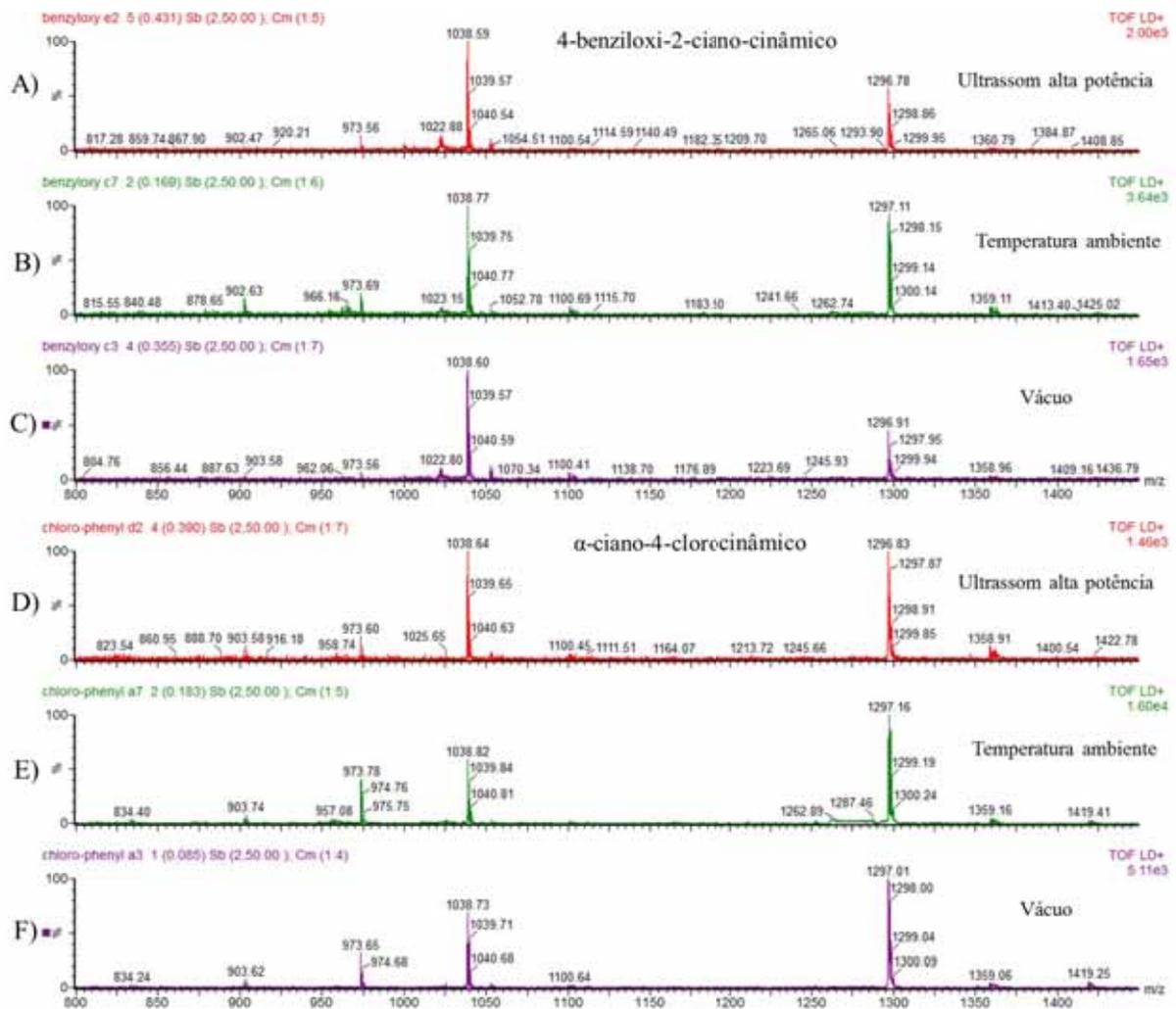
**Figura 33.** Espectros de MALDI-(+)-MS das matrizes: sinapínico, gentísico e caféico.



**Figura 34.** Espectros de MALDI(+)-MS das matrizes: ferúlico, cumárico e  $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico.



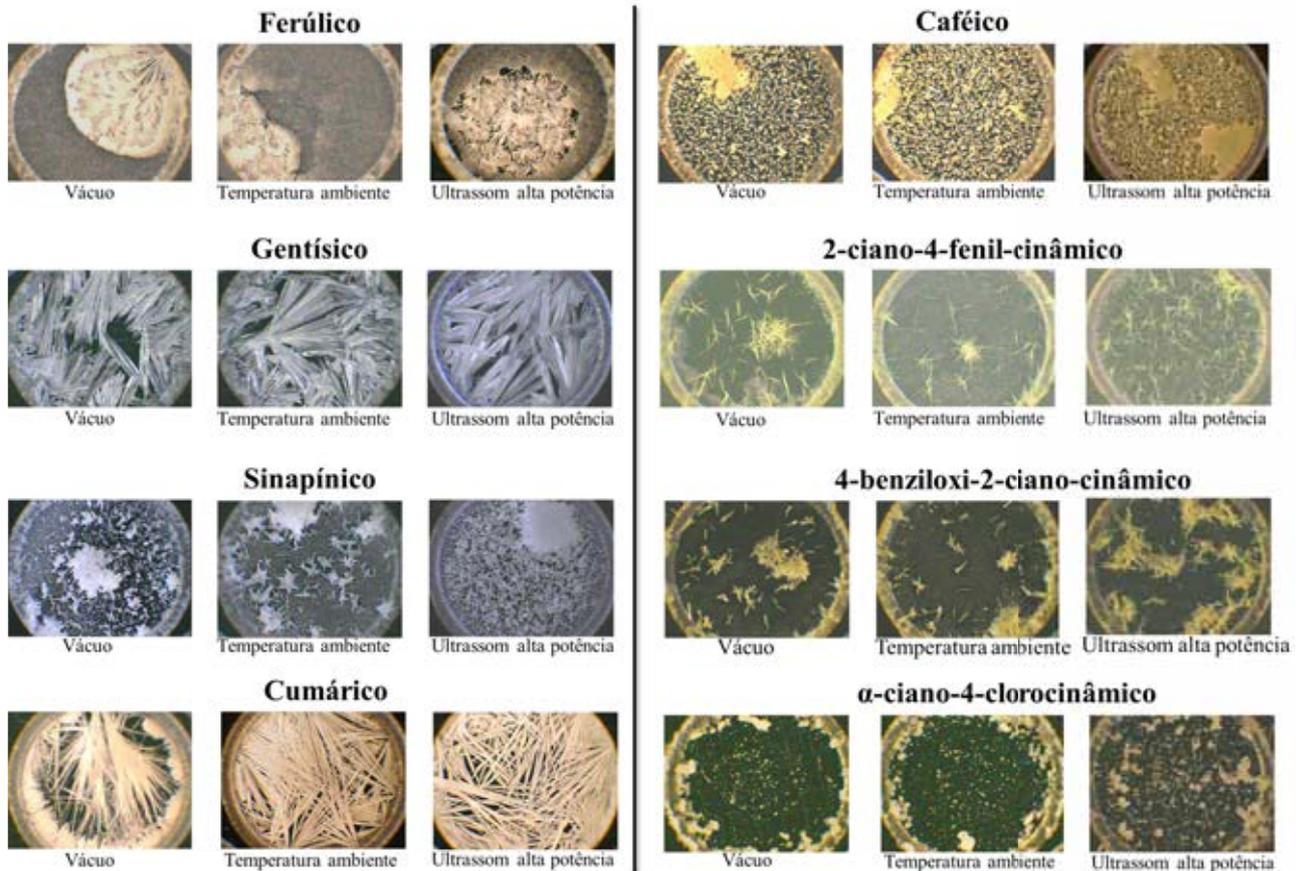
**Figura 35.** Espectros de MALDI-(+)-MS das matrizes: ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico e  $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico.



#### 4.6.2 Avaliação da cristalização da mistura matriz/amostra das diferentes matrizes

Após analisar os espectros obtidos, avaliamos a cristalização das matrizes com os diferentes procedimentos no preparo. A **Figura 36** apresenta a cristalização das matrizes.

**Figura 36.** Cristalização das matrizes com diferentes procedimentos de preparo.



Fonte: **Milagre**

Através da **Figura 36**, podemos observar que todas as matrizes que foram homogeneizadas no ultrassom de alta potência apresentaram uma cristalização mais distribuída por todo o spot. Esta maior uniformidade, demonstrou que o ultrassom de alta potência auxiliou na homogeneização da solução de matriz favorecendo a cristalização por todo o spot.

Os ácidos cumárico e gentísico tiveram uma cristalização semelhante. Os cristais se formaram na forma de “agulhas” apontando para o centro a partir das bordas. A mistura matriz/amostra cristalizada se encontra presente por praticamente todo o spot.

As matrizes ácido sinapínico, ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico,  $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico e  $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico obtiveram cristalizações ruins. A mistura matriz/amostra cristalizada está presente em poucas regiões do spot quando preparados sem o ultrassom.

O ácido ferúlico também não obteve uma boa cristalização, apresentando uma cristalização muito heterogênea. Há regiões no spot onde a cristalização ficou muito concentrada.

O ácido caféico apresentou uma boa cristalização. Os cristais se encontram bem distribuído por todo o spot, havendo poucas regiões com a cristalização da mistura matriz/amostra concentradas.

#### 4.6.3 Avaliação dos coeficientes de variação das matrizes

Após a análise da cristalização, os CVs foram calculados para conferir a reprodutibilidade *spot-to-spot* das matrizes. As matrizes foram primeiramente analisadas utilizando como procedimento a cristalização da mistura matriz/amostra a vácuo. A **Tabela 11** apresenta as matrizes com seus respectivos CVs obtidos.

**Tabela 11.** Desempenho das matrizes selecionadas utilizando o método *vacuum drying* adaptado.

Matrizes	Coefficiente de variação (%)
Ácido sinapínico	7,3
Ácido gentísico	21,8
Ácido caféico	21,3
Ácido ferúlico	51,1
Ácido cumárico	72,2
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico	24,5
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico	14,4
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico	22,5

Como podemos observar através da **Tabela 11**, o nível de reprodutibilidade não foi alcançado com a maioria das matrizes, utilizando o vácuo para a cristalização da matriz. Os CVs obtidos foram muito acima do obtido com o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. O ácido sinpínico foi a única matriz que obteve um CV com uma boa reprodutibilidade *spot-to-spot*.

Mas visando a melhoria dos CVs, optamos por mudar o procedimento com que cada matriz foi preparada. As matrizes foram preparadas sem a cristalização a vácuo e adicionando

um ultrassom de alta potência na homogeneização das soluções de matrizes. A **Tabela 12** apresenta os CVs obtidos.

**Tabela 12.** Desempenho das matrizes selecionadas com diferentes procedimentos no preparo.

<b>Matrizes</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
Ácido sinapínico	Temperatura ambiente	23,2
Ácido sinapínico	Ultrassom de alta potência	42,1
Ácido gentísico	Temperatura ambiente	37,0
Ácido gentísico	Ultrassom de alta potência	33,2
Ácido caféico	Temperatura ambiente	17,0
Ácido caféico	Ultrassom de alta potência	39,5
Ácido ferúlico	Temperatura ambiente	26,2
Ácido ferúlico	Ultrassom de alta potência	6,7
Ácido cumárico	Temperatura ambiente	19,1
Ácido cumárico	Ultrassom de alta potência	42,1
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico	Temperatura ambiente	48,3
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico	Ultrassom de alta potência	14,7
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico	Temperatura ambiente	30,5
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico	Ultrassom de alta potência	10,7
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico	Temperatura ambiente	17,7
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico	Ultrassom de alta potência	30,5

Observando a **Tabela 12**, notamos que obtivemos uma melhora nos CVs, em algumas matrizes, mudando o procedimento de preparo. O ácido ferúlico apresentou uma melhora significativa, apresentando um CV de 6,7% quando preparado com o ultrassom de alta potência. Com exceção do ácido ferúlico e do sinapínico, nenhum CV teve o nível de reprodutibilidade alcançado quando comparado com o  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

#### 4.6.4 Influência da energia do laser nas análises das matrizes

A intensidade do laser ideal também foi avaliada para cada matriz analisada. Através da razão da intensidade do sinal da MC-RR pela da angiotensina I obtida para o cálculo do

CV, pudemos observar a melhor intensidade do laser para cada spot de cada matriz utilizada. A **Tabela 13** apresenta a intensidade do laser obtida para cada matriz.

**Tabela 13.** Intensidade do laser observada para cada matriz analisada.

Matrizes	Energia do laser	Energia do laser (0-100%)
Ácido sinapínico	baixo	43-47
Ácido gentísico	médio	40-50
Ácido caféico	baixo	45-52
Ácido ferúlico	baixo	49-52
Ácido cumárico	médio	60-70
Ácido $\alpha$ -ciano-4-fenilcinâmico	baixo	40-56
Ácido $\alpha$ -ciano-4-benziloxicinâmico	baixo	34-43
Ácido $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico	baixo	49-51

Com estes resultados, conseguimos padronizar um intervalo da intensidade do laser ideal para cada matriz na detecção da MC-RR.

#### 4.6.5 Combinação de duas matrizes nas análises de microcistinas por MALDI-MS

Após avaliar os resultados obtidos de cada matriz, optamos por fazer uma mistura de duas matrizes. Laugesen e Roepstorff realizaram um estudo utilizando uma mistura dos ácidos  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e gentísico. A mistura dessas duas matrizes resultou em uma melhor reprodutibilidade *spot-to-spot* e uma maior homogeneidade da cristalização, em comparação com as preparações com uma única matriz (LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003).

Com base nesses resultados, nós optamos por misturar os ácidos  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico. O ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico foi selecionado por ter obtido os melhores resultados nesta dissertação, e o ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico por ter melhorado o desempenho qualitativo e quantitativo nas análises realizadas por Jaskolla e colaboradores e por Leszyk (JASKOLLA; LEHMANN; KARAS, 2008; LESZYK, 2010).

As matrizes foram misturadas em diferentes proporções: soluções de matrizes misturadas na proporção volume/volume (v/v) e matrizes misturadas na proporção massa/massa (m/m) (LAUGESSEN; ROEPSTORFF, 2003).

As matrizes que foram misturadas na proporção v/v foram baseadas no estudo realizado por Laugesen e Roepstorff, que misturaram as matrizes na proporção 1:1 (v/v). Nós optamos por além de misturar nesta proporção, misturar em mais duas diferentes proporções 25:75 e 75:25 (v/v) e observar sua influência nos resultados.

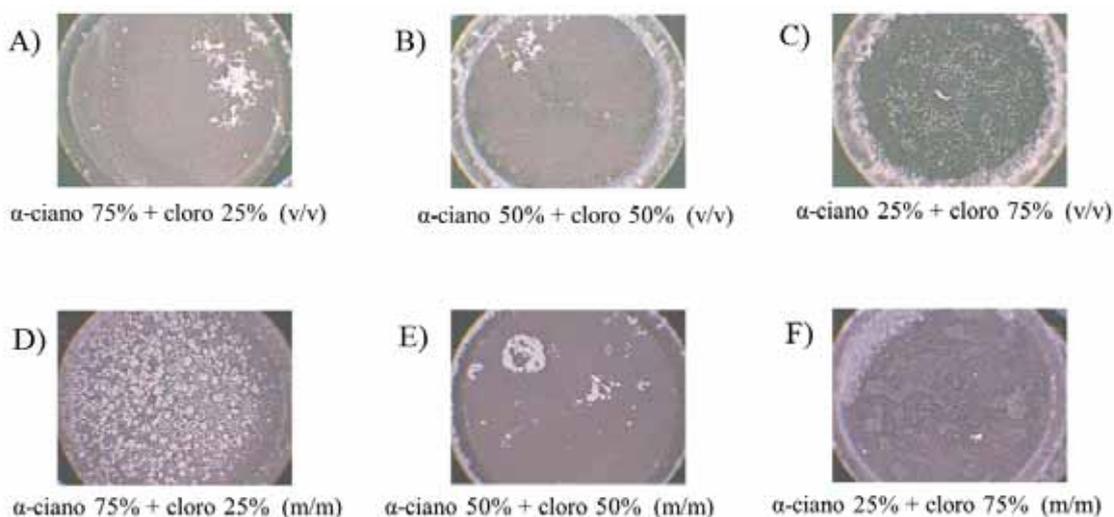
Além das misturas de matrizes nas proporções v/v, optamos por misturá-las na proporção m/m, pois assim saberíamos a massa exata de cada matriz presente na mistura. Dessa forma poderíamos observar com mais precisão a influência de cada matriz nos resultados.

Em todas as nossas análises o padrão comercial da MC-RR foi utilizado na concentração de 2,5  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.6.5.1 Avaliação da cristalização da mistura matriz/amostra das matrizes binárias para cada procedimento

A cristalização da mistura de cada proporção das matrizes foi analisada, e a **Figura 37** apresenta as cristalizações da mistura matriz/amostra obtidas.

**Figura 37.** Cristalização das matrizes  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico misturadas.



Fonte: **Milagre**

Observando as cristalizações da mistura matriz/amostra, notamos que há uma diferença quando misturamos nas proporções m/m e v/v. A cristalização da **Figura 37A** está bem distribuída e relativamente homogênea por todo o spot. Quando comparado com a cristalização da **Figura 37D**, notamos que os cristais são maiores e não tão homogêneos.

A cristalização das **Figura 37B** e **E** também apresentam algumas diferenças. A cristalização da **Figura 37B** apresenta uma concentração dos cristais no entorno do spot, ficando mais homogênea no centro. Há algumas regiões no entorno e no centro do spot com ausência da mistura matriz/amostra. Na cristalização das **Figura 37E** já não se encontra a concentração de cristais no entorno do spot, e não há regiões com ausência da mistura matriz/amostra.

A cristalização da **Figura 37C**, os cristais se encontram concentrados no entorno do spot, ficando com uma distribuição bem irregular no centro, com muitas regiões com ausência da mistura matriz/amostra. Na cristalização das **Figura 37F** há uma pequena região com concentração de cristais no entorno do spot, e não há regiões com ausência da mistura matriz/amostra.

Com exceção da **Figura 37C**, todas as misturas apresentaram uma boa cristalização. A mistura matriz/amostra cristalizada se encontra em quase toda a região do spot e de uma forma bem homogênea.

#### **4.6.5.2 Avaliação do coeficiente de variação da matriz binária para cada procedimento**

Após analisar a cristalização das matrizes misturadas, o CV de cada forma de preparo foi calculado e a intensidade do laser avaliada. Em todas as análises a energia do laser foi mantida baixa e fixa a 25%. A **Tabela 14** apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 14.** Coeficiente de variação e intensidade do laser utilizada nas análises.

Mistura das Matrizes	Coeficiente de variação (%)
$\alpha$ -ciano 75% + cloro 25% (v/v)	26,2
$\alpha$ -ciano 50% + cloro 50% (v/v)	6,8
$\alpha$ -ciano 25% + cloro 75% (v/v)	30,2
$\alpha$ -ciano 75% + cloro 25% (m/m)	7,1
$\alpha$ -ciano 50% + cloro 50% (m/m)	20,6
$\alpha$ -ciano 25% + cloro 75% (m/m)	6,3

Como podemos observar através da **Tabela 14**, as misturas do  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico nas proporções: 50:50 (v/v), 75:25 (m/m) e 25:75 (m/m), obtiveram os melhores CVs. As outras misturas já não apresentaram um bom CV, não alcançando o nível de reprodutibilidade.

Observamos também que em todas as análises o laser foi mantido a 25%, mantendo a intensidade do sinal da MC-RR relativamente constante.

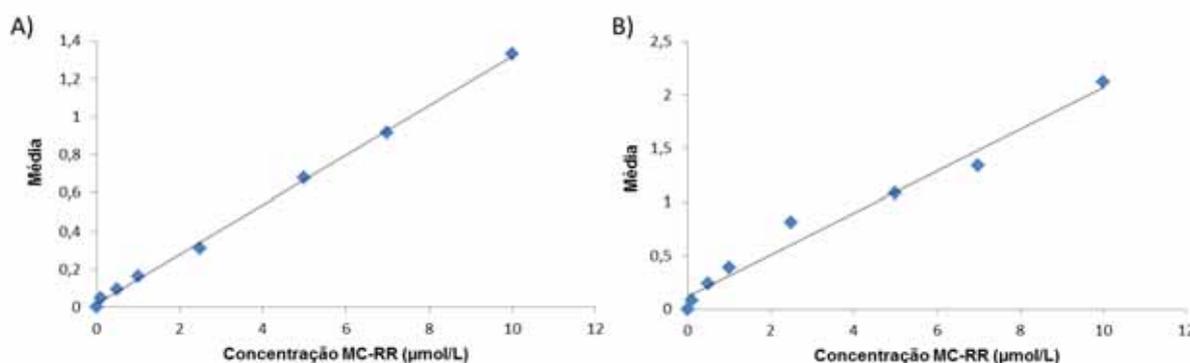
Após observar e comparar todos os resultados utilizando as matrizes separadas e juntas selecionamos a mistura,  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico mais  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico na proporção 25:75 (m/m) para contruir uma curva analítica e calcular seu MLD. Essa mistura foi selecionada por apresentar o menor CV quando comparado com todos os CVs obtidos.

#### 4.6.5.3 Análise quantitativa das microcistinas utilizando a matriz binária

A avaliação do desempenho quantitativo da mistura das matrizes  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico mais  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico na proporção 25:75 (m/m), foi conduzida utilizando o padrão comercial da MC-RR em diferentes concentrações e em quadruplicata. A curva analítica, para a MC-RR, foi construída utilizando concentrações no intervalo de 0,1-10  $\mu\text{mol/L}$ , com a potência do laser fixa em 25%.

A construção de uma curva analítica, e o cálculo do MLD para a mistura de matrizes selecionada teve como objetivo comparar com a curva analítica construída utilizando como matriz apenas o  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. A **Figura 38** apresenta as curvas analíticas obtidas.

**Figura 38.** Curva analítica da microcistina MC-RR utilizando: **a)** Matriz binária. **b)** Apenas o  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.



O MLD foi determinado utilizando uma solução de 40% de metanol como o branco e, 0,02  $\mu\text{mol/L}$  da MC-RR, onde sete repetições do branco ( $X_0$ ) e sete da amostra ( $X_s$ ) foram aplicadas na placa de MALDI. A **Tabela 15** apresenta os MLDs e os LDQs obtidos das duas curvas analíticas.

**Tabela 15.** Desempenho quantitativo da mistura de matrizes utilizando a MC-RR.

Microcistina	MLD ( $\mu\text{mol/L}$ )	LDQ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Equação da Regressão	r	$R^2$
A) MC-RR	0,102	0,316-10	$y = 0,1303x + 0,0171$	0,99	0,99
B) MC-RR	0,056	0,180-10	$y = 0,1947x + 0,1206$	0,98	0,98

A curva analítica obtida com as matrizes binárias apresentou uma excelente linearidade, com um coeficiente de determinação melhor do que o da curva analítica utilizando o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. O coeficiente de correlação foi de  $r = 0,99$  para as matrizes misturadas e  $r = 0,98$  para o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Este resultado demonstrou que houve uma menor variação dos valores na curva analítica utilizando a mistura de matrizes.

## 5. CONCLUSÃO

Através do estudo realizado nesta dissertação selecionou-se um método de preparo de amostra e uma matriz binária na detecção e quantificação de microcistinas por MALDI-MS.

A avaliação dos métodos de preparo de amostra foi realizada utilizando como matriz o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e o peptídeo angiotensina I como padrão interno. Os métodos foram avaliados com relação aos seus coeficientes de variação (CV), suas cristalizações e espectros obtidos, utilizando o padrão comercial da MC-RR como amostra.

O método *vacuum drying adaptado*, foi o método de preparo de amostra que obteve os melhores resultados quando comparado com os outros métodos de preparo de amostra selecionados. Este método apresentou: eficiência na detecção de microcistinas, nodularinas e peptolinas, espectros com boa razão sinal/ruído, cristalização da mistura matriz/amostra bem homogênea e bem uniforme e um excelente CV.

Com todos estes resultados obtidos, o método *vacuum drying adaptado* foi selecionado e utilizado nas análises quantitativas para duas variantes de microcistinas (MCs), a MC-LR e a MC-RR. As curvas analíticas construídas apresentaram uma excelente linearidade, com o valor de r variando entre 0,98-0,99, demonstrando sua eficiência para a quantificação destas duas variantes de microcistinas.

Após as análises dos métodos de preparo de amostra utilizando o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz, nove diferentes matrizes foram selecionadas e avaliadas. Todas as matrizes foram avaliadas com relação ao CV, cristalização e espectros obtidos, utilizando o padrão comercial da MC-RR como amostra. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura das matrizes ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e ácido  $\alpha$ -ciano-4-clorocinâmico (CCICA). Esta matriz binária proporcionou uma boa cristalização, um bom CV e uma melhora na linearidade da curva analítica do padrão comercial da MC-RR, quando comparado com a curva analítica construída utilizando apenas o  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.

Através de todos estes resultados, padronizamos e adaptamos um excelente método analítico na detecção e quantificação por MALDI-MS de duas variantes de microcistinas, e avaliamos uma matriz binária que também demonstrou grande eficiência na detecção e quantificação de uma variante de microcistina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAL, M.; PUIG, M. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. **Toxicon**, Ireland, v. 45, n. 4, p. 509–518, Mar. 2005.

AKPOR, O. B.; MUCHIE, M. Environmental and public health implications of wastewater quality. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 10, n. 13, p. 2379-2387, Mar. 2011.

AL-TEBRINEH, J.; GEHRINGER, M.M.; AKCAALAN, R.; NEILAN, B.A. A new quantitative PCR assay for the detection of hepatotoxigenic cyanobacteria. **Toxicon**, Ireland, v. 57, p. 546–554, Mar. 2011.

ANALYTIX – Advances in Analytical Chemistry SIGMA-ALDRICH 6, 2001.

ANGEL, P. M.; CAPRIOLI, R. M. Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry: in situ molecular mapping. **Biochemistry**, Estados Unidos, v. 52, n. 22, p. 3818–3828, Dez. 2013.

ANN, J.; CARMICHAEL, W. W. Use of a calorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno sorbent assay or the study of microcystins and nodularins. **Toxicon**, Toronto, v.32 n. 12, p.1495-1507, Dez. 1994.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, Ireland, v. 181-182, n. 27, p. 441-446, Dez. 2002.

BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARŠÁLEK, B. Exploring the natural role of microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, Estados Unidos, v. 42, n. 1, p. 9–20, Fev. 2006.

BALLUFF, B. MALDI imaging mass spectrometry for proteomic segmentation of tumor heterogeneity in gastric cancer tissues. **Virchows archiv**, Heidelberg, v. 463, p. 106-106, 2013.

BALLUFF, B.; ELSNERI, M.; KOWARSCH, A.; RAUSER, S.; MEDING, S.; SCHUHMACHER, C.; FEITH, M.; HERMANN, K.; ROCKEN, C.; SCHMID, R. M.; HOFER, H.; WALCH, A.; EBERT, M. P. Classification of HER2/neu status in gastric cancer using a breast-cancer derived proteome classifier. **Journal of Proteome Research**, Estados Unidos, v. 9, n. 12, p. 6317–6322, Dez. 2010.

BALLUFF, B.; RAUSER, S.; MEDING, S.; ELSNERI M.; SCHONE, C.; FEUCHTINGER, A.; SCHUHMACHER, C.; NOVOTNY, A.; JUTTING, U.; MACCARRONE, G.; SARIOGLU, H.; UEFFING, M.; BRASELMANN, H.; ZITZELSBERGER, H.; SCHIMD, R. M.; HOFER, H.; EBERT, M. P, WALCH, A. MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. **American Journal of Pathology**, Amsterdam, v 179, n. 6, p. 2720–2729, Dez. 2011.

BATEMAN, K. P.; THIBAUT, P. DOUGLAS, D. J.; WHITE, R. L. J. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 712, n. 1, p. 253-268, Set. 1995.

BECKER, V.; IHARA, P.; YUNES, J. S.; HUSZAR, V. L. M. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 22, n. 3, p. 235–241, Jun. 2010.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase

extraction–ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1266, p. 61– 68, Nov. 2012.

BIRUNGI, G.; LI, S. F. Y. Determination of cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins in drinking water using CE. **Electrophoresis**, Alemanha, v. 30, n. 15, p. 2737-2742, Ago. 2009.

BOCZEK, J. M.; PALUS, J.; GGALA, I.; IZYDORCZYK, K.; JURCZAK, T.; DZIUBALTOWSKA, E.; STEPNIK M.; ARKUSZ, J.; KOMOROWSKA, M.; SKOWRON, A.; ZALEWSKI, M. Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 356–365, Maio. 2011.

BOGIALLI, S.; GREGORIO, F. N.; LUCENTINI, L.; FERRETTI, E.; OTTAVIANI, M.; UNGARO, N.; ABIS, P. P.; GRAZIA, M. C. Management of a toxic cyanobacterium bloom (*Planktothrix rubescens*) affecting an Italian drinking water basin: A case study. **Environmental Science and Technology**, Estados Unidos, v. 47, n. 1, p. 574–583, Nov. 2013.

BOTANA, L. M. **Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection**, Flórida: Boca Raton, 2008

BOUVY, M.; MOLICA, R.; OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf/Luhe, v. 20, p. 285-297, Dez. 1999.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; DOS SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006

CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 11, p. 268-287, Jan. 2010.

CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 69, n. 23, p. 4751-60, Dez. 1997.

CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; JOCHIMSEN, E. M.; HOLMES, C. E. M.; DA SILVA JR, J. B. Analysis for microcystins involved in an outbreak of liver failure and death of humans at a hemodialysis center in Caruaru, Pernambuco, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, São Paulo, v. 3, n. 1, p 94, 1997.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, Londres, v. 270, p. 78–86, 1994.

CARROLL, D. I.; DZIDIC, I.; STILLWELL, R. N.; HAEGELE, K. D.; HORNING, E. C. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 47, n.14, p. 2369-2376, 1975.

CARVALHO, M.C.; AGUJARO, F.F.; PIRES, D.A.; PICOLO. C. **Manual de cianobactérias planctônicas**: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais. 1. ed. São Paulo: CETESB, 2013.

CARVALHO, L. R.; SANT'ANNA, C. L.; GEMELGO, M. C.P.; AZEVEDO, M. T. P. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasil de Botânica**, São Paulo, v. 30, n.1, p. 141-148, 2007.

CAZARES, L. H.; TROYER, D.; MENDRINOS, S.; LANCE, R. A.; NYALWIDHE, J. O.; BEYDOUN, H. A.; CLEMENTS, M. A.; DRAKE, R. R.; SEMMES, O. J. Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-

regulated kinase kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 15, n. 17, p. 5541–5551, 2009.

CESARINO, L.; SALMASO, N. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. **International Journal of Oceanography and Hydrobiology**, Polônia, v. 41, n.3, p. 54-63, 2012.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/laboratorios/101-floracoes-decianobacterias>>. Acesso em 30 out. 2013.

CHEN, J.; YAN, T.; XU, J.; HE, S.; ZHAO, P.; YAN, X. Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 35, n.9, p. 1094–1101, 2012.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 1.ed. London: WHO durch E & FN, 1999.

COLE, R. B. **Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

COVACI, O.I.; SASSOLAS, A.; ALONSO, G. A.; MUÑOZ, R.; RADU, G. I.; BUCUR, B.; MARTY, J. L. Highly sensitive detection and discrimination of LR and YR microcystins based on protein phosphatases and an artificial neural network. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Verlag, v. 404, n, 3, p. 711–720, 2012.

DAI, R.; LIU, H.; QU, J.; HOU, Y.. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 153, p. 470–477, Maio. 2008.

DEL CAMPO, F. F.; OUAHID, Y. Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Pollution**, Toronto, v. 158, n.9, p. 2906-2914, Set. 2010.

DIEHNELT, C. W.; DUGAN, N.R.; PETERMAN, S. M.; BUDDE, W.L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, n. 2, p. 501-502, Jan. 2006.

DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, Hoboken, v. 37, p. 23-43, Set. 2013.

DOLMAN, A. M.; RÜCKER, J.; PICK, F. R.; FASTNER, J.; ROHRLACK, T.; MISCHKE, U.; WIEDNER, C. Cyanobacteria and cyanotoxins: the Influence of nitrogen versus phosphorus. **PLOS ONE**, Uppsala, v. 7, n.6, p. 1-14, Jun. 2012.

DÖRR, F. A.; OLIVEIRA-SILVA, D.; LOPES, N. P.; IGLESIAS, J.; VOLMER, D. A.; PINTO, E. Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Nova Jersey, v. 25, n.14, p. 1981 – 1992, Jul. 2011.

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

DREISEWERD, K. The desorption process in MALDI. **Chemical Reviews**, Washington, v. 103, p. 395–425, Maio. 2003.

DUNCAN, M. W.; RODER, H.; HUNSUCKER, S. W. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 355– 370, Set. 2008.

ESQUENAZI, E.; COATES, C.; SIMMONS, L.; GONZALEZ, D.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging. **Molecular BioSystems**, Londres, v. 4, n.6, p. 562–570, Jun. 2008.

FALCONER, I.R.; BURCH M. D.; STEFFENSEN, D. A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O. R. Toxicity of the blue-green algae (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environmental Toxicology and Water Quality**, Hoboken, v. 9, n.2, p. 131-139, Maio. 1994.

FAWELL, J.K.; JAMES, C.P.; JAMES, H.A. **Toxins from Blue-Green Alga e Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for its Determination in Water**. Geneva: World Health Organization, 1994.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, Califórnia, v. 246, n. 4926, p. 64-71, Out. 1989.

FENYO, D.; WANG, Q.; De GRASSE, J. A.; PADOVAN, J. C.; CADENCE, M.; CHAIT, B. T. *Vis. Exp.* 2007. Publicado online em: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=192>.

FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/cianob.asp>>. Acesso em 30 de out. 2013.

FRAUNHOFER, 2007. Disponível em: < [http://www-alt.igb.fraunhofer.de/www/gf/grenzflmem/en/MALDI-TOF\\_B3.en.html](http://www-alt.igb.fraunhofer.de/www/gf/grenzflmem/en/MALDI-TOF_B3.en.html)>. Acesso em 02 nov. 2013.

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2003, 56p.

GAMBARO, A.; BARBARO, E.; ZANGRADO, R.; BARBANTE, C. Simultaneous quantification of microcystins and nodularin in aerosol samples using high-performance liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 26, n. 12, p. 1497–1506, Jun. 2012.

GAO, X.; AI, Y. ; QIU, B. Drought adaptation of a terrestrial macroscopic cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*, in arid areas: A review. **African Journal of Microbiology Research**, Kenya, v. 6, n. 28, p. 5728-5735, Jul. 2012.

GAZZAH, A.C.; CAMOIN, L.; ABID, S.; BACHA, H.; LADJIMI, M. iTRAQ: a method to elucidate cellular responses to mycotoxin zearalenone. **Journal of Applied Toxicology**, Hoboken, v. 33, n. 7, p. 566-575, Jul. 2013.

GONZALEZ, D.J.; XU, Y. Q.; YANG, Y. L.; ESQUENAZI, E.; LIU, W. T.; EDLUND, A.; DUONG, T.; DU, L. C.; MOLNAR, I.; GERWICK, W. H.; JENSEN, P. R.; FISCHBACH, M.; LIAW, C. C.; STRAIGHT, P.; NIZET, V.; DORRESTEIN, P. C. Observing the invisible through imaging mass spectrometry, a window into the metabolic exchange patterns of microbes. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 16, p. 5069-5076, Ago. 2012.

GRAHAM, J. L.; JONES, J. R.; JONES, S. B.; DOWNING, J. A.; CLEVINGER, T. E. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. **Water Research**, Toronto, v. 38, n. 20, p. 4395–4404, Dez. 2004.

GURBUZ, F.; METCALF, J. S.; KARAHAN, A. G.; CODD, G. A. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 13, p. 4038–4046, Jun. 2009.

HADDAD, R.; SPARRAPAN, R.; EBERLIN, M. N. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 20, n. 19, p. 2901-2905, Ago. 2006.

HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWTON, L. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. 1. ed. Londres: World Health, 1999.

HENDRICKSON, C. Disponível em:

<[http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_maldi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html)>. Acesso em: 24 de jan. 2014.

HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. Sonic spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, n.17, p. 2878-2882, Set. 1995.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, Zürichv, v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.

HOWARD, K. L.; BOYER, G. L. Adduct simplification in the analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 21, n. 5, p. 699–706, Mar. 2007a.

HOWARD, K. L.; BOYER, G. L. Quantitative analysis of cyanobacterial toxins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, n. 15, p. 5980-5986, Ago. 2007b.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2007.

ISO - Internacional Standard Organization; Precision of Test Methods, ISO 5725, 1994.

JASKOLLA, T. W.; KARAS, M. Compelling evidence for Lucky Survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism. **American Society for Mass Spectrometry**, Heidelberg, v. 22, n. 6, p. 976 – 988, Jun. 2011.

JASKOLLA, T. W.; LEHMANN, W. D.; KARAS, M. 4-Chloro- $\alpha$ -cyanocinnamic acid is a advanced, rationally designed MALDI matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Ithaca, v. 105, n. 34, p. 12200-12205, Ago. 2008.

JODŁOWSKA, S.; LATAŁA, A. Combined effects of light and temperature on growth, photosynthesis, and pigment content in the mat-forming cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. **Photosynthetica**, Heidelberg, v. 51, n. 2, p. 202-214, Jun. 2013.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, Out. 1988.

KAUSHIK, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Londres, v. 43, n.13, p. 1349–1383, Maio. 2013.

KINTER, M.; SCHERMAN, N. E. **Protein sequence and identification using TANDEM mass spectrometry**. New York: John Wiley, 2000.

KNOCHENMUSS, R. Ion formation mechanisms in UV- MALDI. **Analyst**, Londres, v. 131, n. 9, p. 966-986, Jul. 2006.

KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; TSUJI, K.; HARADA, K. I.; SHIMADA, T.; OSHIKATA, M.; SUSUKI, M. N. A reliable and sensitive method for determination of microcystins in complicated matrices by frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. **Natural Toxins**, Estados Unidos, v. 3, n. 1, p. 41-49, Maio. 1995.

KRAUSE, J.; STOECKLI, M.; SCHLUNEGGER, U. P. Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 10, p. 1927-1933, Oct. 1996.

LABINE, M. A.; MINUK, G. Y. Cyanobacterial toxins and liver disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 87, n. 10, p. 773-788, Oct. 2009.

LAGARRIGUE, M.; LAVIGNE, R.; GUÉVEL, B.; CHAURAND, P.; PINEAU, C. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry: a promising technique for reproductive research. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 86, n. 3, p. 74, Mar. 2012.

LAUGESEN, S.; ROEPSTORFF, P. Combination of two matrices results in improved performance of MALDI-MS for peptide mass mapping and protein analysis. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 9, p. 992-1002, Set. 2003.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. Heidelberg: Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 619, 2008.

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

LEE, Y. J.; PERDIAN, D. C.; SONG, Z.; YEUNG, E. S.; NIKOLAU, B. J. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. **The Plant Journal**, Estados Unidos, v. 70, n. 1, p. 81-95, Abr. 2012.

LESZYK, J. D. E. Evaluation of the New MALDI Matrix 4-Chloro- $\alpha$ -Cyanocinnamic Acid. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, n. 2, p. 81-91, Jul. 2010.

LI, W.; DUAN, J.; NIU, C.; QIANG, N.; MULCAHY, D. Determination of Microcystin-LR in Drinking Water Using UPLC Tandem Mass Spectrometry-Matrix Effects and Measurement. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 665-670, Oct. 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed, Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAEZERC, H. M.; KACZOWSKA, M. J.; BLASZCZYK, A.; AKCAALAN, R.; SPOOF, L.; MERILUOTO, F. Diversity of peptides produced by *Nodularia spumigena* from various geographical regions. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, n. 1, p. 1-19, Jan. 2013.

MAININI, V.; BOVO, G.; CHINELLO, C.; GIANAZZA, E.; GRASSO, M.; CATTORETTI, G.; MAGNI, F. Detection of high molecular weight proteins by MALDI imaging mass spectrometry. **Molecular BioSystems**, Londres, v. 9, n. 6, p. 1101-1107, Jun. 2013.

MCELHINEY, J.; LAWTON, L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Estados Unidos, v. 203, n. 3, p. 219–230, Mar. 2005.

MEISSNER, K.; DITTMAN, E.; BÖRNER, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 135, n. 3, p. 295-303, Jan. 1996.

MESSINEO, V.; BOGIALLI, S.; MELCHIORRE, S.; SECHI, N.; LUGLIÈ, A.; CASIDDU, P.; MARIANI, M. A.; PADEDDA, B. M.; DI CORCIA, A.; MAZZA, R.; CARLONI, E.; BRUNO, M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. **Limnologica**, Alemanha, v. 39, n. 2, p. 95–106, Maio. 2009.

MILES, C. O.; SANDVIK, M.; NONGA, H. E.; RUNDBERGET, T.; WILKINS, A. L.; RISE, F.; BALLOT, A. Thiol derivatization for LC-MS identification of microcystins in

complex matrices. **Environmental Science & Technology**, Alemanha, v. 46, n. 2, p. 8937–8944, Maio. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46l, 2011.

MOREE, W. J.; PHELAN, V. V.; WU, C. H.; BANDEIRA, N.; CORNETT, D. S.; DUGGAN, B. M.; DORRESTEIN, P. C. Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 34, p. 13811-13816, Ago. 2012.

MOREIRA, C.; AZEVEDO, J.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V. Cyndrospermopsin : occurrence, methods of detection and toxicology. **Journal of Applied Microbiology**, Inglaterra, v. 114, n. 3, p. 605-620, Mar. 2012.

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 78, n. 4, p. 382-387, Jul. 2006.

NELLAN, B. A.; PEARSON, L. A.; MUENCHHOFF, J.; MOFFIT, M. C.; DITTMANN, E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Inglaterra, v. 15, n. 5, p. 1239–1253, Maio. 2013.

NICHOLSON, B.C.; BURCH, M.D. **Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines**. Australia, 2001

NIMESH, S.; MOHOTTALAGE, S.; VINCENT, R.; KUMARATHASAN, P. Current Status and Future Perspectives of Mass Spectrometry Imaging. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 6, p. 11277-11301, Maio. 2013.

OLIVEIRA, D. N.; SARTOR, S. B.; FERREIRA, M. S.; CATHARINO, R. R. Cosmetic Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). **Materials**, Basel, v. 6, n. 3, p. 1000-1010, Mar. 2013.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 65, n. 4, p. 995–1010, Maio. 2013.

PANTELIĆ, D.; SVIRČEV, Z.; SIMEUNOVIĆ, J.; VIDOVIĆ, M.; TRAJKOVIĆ, I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, Toronto, v. 91, n. 4, p. 421–441, Abr. 2013.

PUDDICK, J.; PRINSEP M. R.; WOOD, S. A.; CARY, S. C.; HAMILTON, D. P. Enhanced Sample Preparation for Quantitation of Microcystins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, Hoboken, v. 23, n. 4, p. 285-291, Jul/Agot. 2012.

RAPALA, J.; ERKOMAA, K.; KUKKONEN, J.; SIVONEN, K.; LAHTI, K. Detection of micricystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay - Comparison of methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 466, n. 2, p. 213-231, Ago. 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Set/Out. 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROBB, D. B.; COVEY, T. R.; BRUINS, A. P. Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, n. 3, p. 3653-3659, Jul. 2000.

ROHNER, T. C.; STAAB, D.; STOECKLI, M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. **Mechanisms of Ageing and Development**, Ireland, v. 126, n. 1, p. 177-185, Jan. 2005.

ROLLAND, D. C.; BOURGET, S.; WARREN, A.; LAURION, I.; VINCENT, W. E. Extreme variability of cyanobacterial blooms in an urban drinking water supply. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 0, n. 0, p. 1-15, Maio. 2013.

RÖMPP, A.; SPENGLER, B. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. **Histochemistry and Cell Biology**, Heidelberg, v. 139, n. 6, p. 759-783, Abr. 2013.

RUIZ, M.; GALANTI, L.; RUIBAL, A. L.; RODRIGUEZ, M. I.; WUNDERLIN, D. A.; AMÉ, M. V. First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). **Water Air Soil Pollut**, Heidelberg, v. 224, p. 1593, Maio. 2013.

RUNNEGAR, M.T., FALCONER, I. R.; SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Heidelberg, v. 317, n. 3, p. 268-272, Jul. 1981

SANGOLKAR, L. N.; MASKE, S. N.; CHAKRABARTI, T. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. **Water Research**, Toronto, v. 40, n. 19, p. 3485-3496, Nov. 2006.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 71, p. 359-385, 2000.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUIJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2006

SCHUTTE, V. Disponível em: < <http://www.harenerweekblad.nl/waarschuwing-voor-blauwalg-in-paterswoldsemeer-haren/>>. Acesso em 02 nov. 2013.

SHANTA, S. R.; KIM, T. Y.; HONG, J. H.; LEE, J. H.; SHIN, C. Y.; KIM, K. H.; KIM, Y. H.; KIM, S. K.; KIM, K. P. A new combination MALDI matrix for small molecule analysis: application to imaging mass spectrometry for drugs and metabolites. **Analyst**, v. 137, n. 24, p. 5757-62, Dez. 2012.

SHAN, Y.; SHI, X.; DOU, A.; ZOU, C.; HE, H.; YANG, Q.; ZHAO, S.; LU, X.; XU, G. A fully automated system with on-line micro solid-phase extraction combined with capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry for high throughput analysis of microcystins and nodularin-R in tap water and lake water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218 13, n. 13, p. 1743-1748, Abr. 2011.

SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. **Cyanobacteria an economic perspective**. Hoboken: Wiley, 2013.

SIGMA-ALDRICH. MALDI mass spectrometry, 2012. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=103431784>>. Acesso em 01 jan. 2014.

SILVA-STENICO, M. E.; SILVA, C. S. P.; LORENZI, A. S.; SHISHIDO, T. K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S. P.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Non-ribosomal

peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, Alemanha, v. 166, n. 3, p. 161 -175, Mar. 2011.

SINGH, S.; VERMA, S. K. Application of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) for identification of an epiphytic cyanobacterium, Nostoc Sp. **Analytical Letters**, Oxford, v. 45, n. 17, p. 2562–2568, 2012.

SIVONEN, K. Cyanobacterial toxins. **The Encyclopedia of Microbiology**, Estados Unidos, v. 6, p. 290-370, Set, 2009.

STAUBER, J.; LEMAIRE, R.; FRANCK, J.; BONNEL, D.; CROIX, D.; DAY, R.; WISZTORSKI, M.; FOURNIER, I.; SALZET, M. MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. **Journal of Proteome Research**, Heidelberg, v. 7, n. 3, p. 969–978, Fev. 2008.

TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R.G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, Washington, v. 306, n. 5695, p. 471-473, Out. 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Zürich, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TSUKAMOTO, R. Y.; TAKAHASHI, N. S. Cianobactérias + civilização = problemas para a saúde, a aqüicultura e a Natureza. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.17, n. 102, p. 30-35, Set/Out.2007.

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

VANICKOVA, L.; SVATOS, A.; KROISS, J.; KALTENPOTH, M.; DO NASCIMENTO, R. R.; HOSKOVEC, M.; BRIZOVA, R.; KALINOVA, B. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 38, n. 9, p. 1133–1142, Set. 2012.

VAN OUDENHOVE, L.; DEVREESE, B. A review on recent developments in mass spectrometry instrumentation and quantitative tools advancing bacterial proteomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 97, n. 11, p. 4749-4762, Jun. 2013.

VERDOLIN, C. P. Disponível em: <[http://crv.educacao.mg.gov.br/sistema\\_crv/documentos/md/em/biologia/2010-08/md-em-bi-11.pdf](http://crv.educacao.mg.gov.br/sistema_crv/documentos/md/em/biologia/2010-08/md-em-bi-11.pdf)>. Acesso em 02 nov. 2013.

VIEIRA, G. P.; PERDIGÃO, S. R. W.; FIORE, M. F.; REIS, B. F. Development of a high sensitive automatic setup for screening of microcystins in surface waters by employing a LED-based photometric detector. **Sensors and Actuators B**, Toronto, v. 161, n. 1, p. 422–428, Jan. 2012.

VORM, O.; ROEPSTORFF, P.; MANN, M. Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation Yield Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, p. 3281-3287, 1994.

WANG, W.; WANG, Y.; SHU, X.; ZHANG, Q. Physiological responses of soil crust-forming cyanobacteria to diurnal temperature variation. **Journal of Basic Microbiology**, Hoboken, v. 53, n. 1, p. 72–80, Jan. 2013.

WEINBERGER, S.R.; BOERNSEN, K.O.; FINCHY, J.W.; ROBERTSON, V.; MUSSELMAN, B.D. **Proceedings of the 41th Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**; San Francisco, p. 775, Maio/Jun1993.

WELKER, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H. Application of MALDI-TOF MS in cyanotoxin research. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 17, n. 4, p. 367-374. Jul. 2002.

WESTRICK, J. A.; SZLAG, D. C.; SOUTHWELL, B. J.; SINCLAIR, J. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Verlag, v. 397, n. 5, p. 1705–1714, Jul. 2010.

WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 57, n. 3, p. 675-679, Mar. 1985.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The Ecology Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Dordrecht, The Netherlands.** Heidelberg: Kluwer Academic Publishers, 2000.

WIJFFELS, R.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, Toronto, v. 24, n. 3, p. 405–413, Jun. 2013.

XIANG, F.; BEAVIS, R. C. A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films, **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Heidelberg, v. 8, n. 2, p. 199-204, Fev. 1994.

YANG, Q. Disponível em: < <http://www.ecoevoblog.com/2013/06/19/the-world-dyed-by-algae/>>. Acesso em 02 de out. 2013.

YANG, Y. L.; XU, Y.; STRAIGHT, P.; DORRESTEIN, P. C. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. **Nature Chemical Biology**, Londres, v. 5, n. 12, p. 885–887, Dez. 2009.

YAUN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. Microcystin analysis in human serum and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, Toronto, v. 48, n. 6, p. 627-640, Nov. 2006.

YE, H.; GEMPERLINE, E.; VENKATESHWARAN, M.; CHEN, R. B.; DELAUX, P. M.; HOWES-PODOLL, M.; ANE, J. M.; LI, L. J. MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. **Plant journal**, Hoboken, v. 75, n. 1, p. 130-145, Jul. 2013.

YEN, H. K.; LIN, T. F.; LIAO, P. C. Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Toxicon**, Toronto, v. 58, n. 2, p. 209-218, Ago. 2011.

ŽEGURA, B.; ŠTRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 727, n. 1-2, p. 16-41, Jan/Abr. 2011.

ZHANG, J.; LIU, S.; YANG, P.; SUI, G. Rapid detection of algal toxins by microfluidic immunoassay. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 11, n. 20, p. 3516–3522, Out. 2011.

ZURAWELL, R.W.; CHEN, H.; BURKER, J.M.; PREPAS, E.E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-37, Jan/Fev. 2005.