UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Isolamento e determinação por espectrometria de massas em
Tandem com ionização por *Electrospray* de hepatotoxinas
presentes em florações algais

Humberto Vieira Frias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Isolamento e determinação por espectrometria de massas em
Tandem com ionização por *Electrospray* de hepatotoxinas
presentes em florações algais

Humberto Vieira Frias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011093

Ficha Catalográfica

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

F897i Frias, Humberto Vieira
Isolamento e determinação por espectrometria de massas em *Tandem* com ionização por *Electrospray* de hepatotoxinas presentes em floração algais / Humberto Vieira Frias. -- São Paulo, 2005.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Pinto Júnior, Ernani

I. Toxicologia ambiental 2. Espectrometria de massa : Análise : Toxicologia 3. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise : Toxicologia I. T. II. Pinto Júnior, Ernani, orientador.

615.9 CDD

Humberto Vieira Frias

Isolamento e determinação por Espectrometria de Massas em *Tandem*
com ionização por Electrospray de Hepatotoxinas presentes em
florações algais

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2005.

Aos meus filhos,

Karen e Juninho:

razão de viver

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto pela oportunidade que me concedeu de fazer parte de seu grupo, pela orientação dispensada, além da confiança em meu trabalho, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo pelo trato respeitoso, profissional e fraternal que dispensou nessa jornada.

Ao Dr. Valdemir Melechco Carvalho pela atenção dispensada, apoio e incentivo ao trabalho.

Ao Dr. Diogo Silva pelas sugestões, que aprimoraram significativamente, o trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine pelo incentivo e pelas sugestões dispensadas.

A Prof^a Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau pelo incentivo, e atitudes que permitiram minha continuidade neste projeto.

A Prof^a Dra. Silvia Berlanga pelo apoio nos trâmites burocráticos.

A Dra. Maria Anita Mendes pelo auxílio na interpretação dos espectros de massas.

Aos colegas de Laboratório que muito me ajudaram e incentivaram me receberam fraternalmente.

A Agência O Estado de São Paulo por gentilmente, disponibilizar imagens e autorizar a utilização das mesmas para a defesa de mestrado e dissertação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Água e Poluição.....	1
1.2 Cianobactérias: características morfológicas.....	2
1.3 Microcistinas e suas variantes.....	6
1.4 Produção de toxinas e aspectos ambientais.....	12
1.5 Mecanismos de ação das microcistinas.....	13
1.6 Absorção e biotransformação das microcistinas.....	15
1.7 Caracterização das microcistinas por espectrometria de massas.....	16
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Equipamentos e acessórios.....	22
3.1.2 Reagentes.....	23
3.2 Experimento 1: Amostras do reservatório Billings.....	24
3.2.1 Coleta.....	24
3.2.2 Extração hidro-alcoólica das toxinas algais.....	26
3.2.3 Partição líquido-líquido do filtrado hidro-alcoólico.....	27
3.2.4 Concentração da fração hidro-alcoólica.....	27
3.2.5 Preparo da amostra para purificação das toxinas por HPLC.....	28
3.2.6 Condições cromatográficas para a purificação das microcistinas: fração hidro-alcoólica.....	28
3.2.7 Coleta de picos.....	30
3.2.8 Repurificação da amostra.....	31
3.3 Experimento 2: <i>Microcystis aeruginosa</i> (Cepa BCCUSP 235).....	32
3.4 Experimento 3: comparação da extração com metanol x ácido acético.....	34
3.5 Espectrometria de massas.....	34

4. RESULTADOS.....	36
4.1 Extração líquido-líquido com amostras de campo.....	36
4.2 Análises dos picos 1 e 2 por ESI-MS/MS.....	39
4.3 Extração em fase sólida da cepa de <i>Microcystis aeruginosa</i> (BCCUSP 235).....	54
4.4 Experimento 3: comparação da extração com metanol x ácido acético	58
5. DISCUSSÃO.....	60
5.1 Extração das toxinas.....	60
5.2 Isolamento das toxinas.....	63
5.2.1 Isolamento das toxinas: partição líquido-líquido.....	63
5.2.2 Concentração por cartuchos Sep-Pak®.....	64
5.2.3 Isolamento das toxinas: cartuchos Sep-Pak®.....	65
5.3 Purificação das microcistinas por HPLC.....	65
5.3.1 Condição cromatográfica: fase móvel e eluição por gradiente x isocrática.....	66
5.3.2 Condição cromatográfica: detecção ultravioleta.....	67
5.4 Co-eluição das microcistinas.....	68
5.5 Caracterização por espectrometria de massas.....	69
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de cianobactérias pela CETESB e FCF-USP na represa Billings em um episódio de floração (Outubro de 2003).....	02
Figura 2 - <i>Microcystis aeruginosa</i> (aumento de 2.500 x).....	03
Figura 3 - Estrutura geral das MC: ciclo-(D-Ala ¹ -X ² -D-MeAsp ³ -Z ⁴ -Adda ⁵ -D-Glu ⁶ -Mdha ⁷), onde os resíduos representados por X e Z, podem ser substituídos por qualquer aminoácido.....	07
Figura 4 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	18
Figura 5 - Mapa do Município de São Paulo com destaque para a localização do Reservatório Billings.....	24
Figura 6 - Aparência da floração na represa Billings e a concentração das cianobactérias na rede fitoplâncton.....	25
Figura 7 - Material após da concentração pela rede para fitoplâncton sendo acondicionado em frascos âmbar, para o transporte, sob refrigeração.....	26
Figura 8 - Perfil cromatográfico (Método descrito no item 3.2.6) referente à análise da amostra de campo após a realização da LLE (CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O, 7:6:3; v:v:v) da fração hidroalcoólica (FH).....	35
Figura 9 - Espectro do Pico 1 (tempo de retenção de 17.930) com <i>scan</i> de 205 a 320 nm.....	37
Figura 10 - Espectro do Pico 2 (tempo de retenção de 20.816) com <i>scan</i> de 205 a 320 nm.....	37
Figura 11 - Repurificação da amostra do Pico 1, com corrida isocrática MeOH:H ₂ O, item 3.2.8, com máxima absorção em 238 nm.....	38
Figura 12 - Repurificação da amostra do Pico 2, com corrida isocrática MeOH:H ₂ O, com absorção a 238 nm. O espectro UV do pico 2 está no quadrante superior direito da figura.....	38
Figura 13 - Espectro de massas do pico 1 da FH em <i>scan</i> de 950 a 1150 <i>m/z</i>	40

Figura 14 - Espectro de massas do pico 1 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 1038 (MC-RR), a 55 eV.....	41
Figura 15 - Estrutura química da MC-RR, com substituição dos fragmentos X e Z pela arginina.....	43
Figura 16 - Espectro de massas do pico 1 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 1066,8 (MC-hRhR), a 60 ev.....	44
Figura 17 - Estrutura da MC-hRhR (m/z , 1068) com a substituição dos resíduos 2 (X) e 4 (Z) pela homo-arginina.....	46
Figura 18 - Espectro de massas do pico 2 da FH, com a seleção de 135 m/z para a determinação dos íons precursores, com <i>scan</i> de 800 a 1100 m/z , apresentando fragmentos que correspondem a MC-LR (995,4, $[M+H]^+$) e MC-YR (1045,8, $[M+H]^+$).....	47
Figura 19 - Espectro de massas do pico 2 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 1045,8 (MC-YR), a 50	48
Figura 20 - Estrutura da MC-YR com a substituição dos resíduos 2 e 4 pela tirosina e arginina, respectivamente	50
Figura 21 - Espectro de massas do pico 2 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 996 (MC-LR), a 45 eV.....	51
Figura 22 - Estrutura da MC-LR (m/z 996) com a substituição dos resíduos 2 e 4 pela leucina e arginina, respectivamente	53
Figura 23 - Perfil cromatográfico da análise obtida da Cepa 235 de <i>M. aeruginosa</i>	54
Figura 24 - Espectro de massas da cultura da Cepa BCCUSP 235, com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 981,5 ($[Asp^3]MC-LR$), a 45 eV	55
Figura 25 - Estrutura da $[Asp^3]MC-LR$ (m/z , 981).....	57
Figura 26 - Perfil cromatográfico da extração de MC por MeOH:H ₂ O (3:1), como descrito no item 3.4., com áreas dos picos 1 e 2 muito próximas.....	58
Figura 27 - Perfil cromatográfico da extração de MC pelo HAc a 5%, como descrito no item 3.4. Os picos 1 e 2 apresentam visível diferença de área.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - MC relatadas na literatura científica.....	09
Tabela 2 - Condição da fase móvel para a purificação da amostra.....	30
Tabela 3 - Condição da fase móvel para a repurificação da amostra: corrida isocrática, sem variação da proporção dos solventes, ao longo da corrida.....	32
Tabela 4 - Protocolo de <i>clean up</i> por cartucho Sep-paK®	33
Tabela 5 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-RR, a 55eV.....	42
Tabela 6 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-hRhR, a 60 eV	45
Tabela 7 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-YR, a 50 eV.....	49
Tabela 8 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-LR, a 45 eV.....	52
Tabela 9 - Inferência dos fragmentos obtidos para a [Asp ³]MC-LR, a 45 eV	56

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Adda	Ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-dienóico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
C18	Fase estacionária de grupamento alquílico com cadeias de 18 átomos de carbono
CHCl₃	Clorofórmio
CL	Cromatografia líquida
Cm	Centímetros
D	Dextro
Da	Daltons
DL₅₀	Dose letal 50
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
EtOH	Etanol
g	Grama
g	Gravidade
Glu	Ácido glutâmico
HAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência.
I.p.	Intra-peritonal
L	Levo
L	Litro
LLE	Extração líquido-líquido
MC	Microcistina(s)
MeOH	Metanol
µg	Micrograma
min	Minuto
mL	Mililitro

μL Microlitro
mm Milímetro
mm Hg Milímetros de mercúrio
mM Millimolar
MS Espectroscopia de massas
m/z Relação massa-carga
Na₂HPO₄ Fosfato dibásico de potássio
NaH₂PO₄ Fosfato monobásico de potássio
nm Nanômetro
ODS Octadecila ou octadecilsilica -(CH₂)₁₇CH₃
OMS Organização Mundial da Saúde
PBS Tampão salino de fosfato
PDA Detector de arranjo diodo
PP1 Fosfatase 1
PP2A Fosfatase 2A
rpm Rotações por minuto
s Segundo
TFA Ácido trifluoracético
SPE Extração em fase sólida
UV radiação ultravioleta

RESUMO

As microcistinas constituem uma família de heptapeptídeos cíclicos com cerca de 70 variantes caracterizadas. São biossintetizadas em condições específicas por cianobactérias, principalmente em corpos d'água eutrofizados. Apresentam organotropismo ao fígado e DL_{50} entre 50-500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ peso (rato, i.p.).

A exposição aguda pode impactar a saúde humana ao desarranjar o parênquima hepatocelular por hiperfosforilação do citoesqueleto e produzir intenso sangramento, podendo levar à morte por choque hipovulêmico um homem adulto e são promotoras tumorais, quando ocorre exposição crônica, por inibição de fosfatases 1 e 2A.

Os congêneres das microcistinas apresentam toxicidades distintas e é importante caracterizá-los em corpos d'água para se estimar o risco à saúde humana. Na literatura, não há convergência quanto à forma de extração das toxinas, preparo das amostras para análise e condições cromatográficas para o isolamento e quantificação.

Neste trabalho, diversas análises foram conduzidas para se determinar as melhores formas de extração das toxinas, *clean up* da amostra e condições cromatográficas para amostras de campo ou cultura de cianobactérias. A extração hidro-alcoólica (MeOH:H₂O, 3:1, v/v) parece ser a melhor forma de extração, seguida de partição líquido-líquido para amostras de campo (florações) e extração em fase sólida (cartuchos C18) para algas cultivadas em laboratório.

Por meio de isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores UV-VIS e pela análise do padrão de fragmentação das moléculas por espectrometria de massas (MS) com ionização por *eletrospray* em *Tandem* (ESI-MS/MS) determinou-se a presença das variantes de microcistinas MC-RR, MC-LR, MC-YR e MC-hRhR na amostra de água do Reservatório Billings e [Asp³]MC-LR na cepa *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 235.

Este método parece ser adequado para a extração e caracterização de microcistinas presente em corpos d'água e em cultura de laboratório e a variante MC-hRhR foi caracterizada pela primeira vez na literatura mundial.

ABSTRACT

It is well known that eutrophicated lakes and water reservoirs can be a serious concern to wildlife, domestic livestock and human health since cyanobacterial blooms are prone to occur.

Some cyanobacteria (blue-green algae) species which form bloom may biosynthesize a family of hepatotoxic peptides named microcystins under certain circumstances, related specially to nitrogen:phosphorus ratio, temperature, pH and light intensity of the water body.

There are at least 70 variants of microcystins with different toxicity, LD_{50} ranging from 50 to 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (in mouse, i.p.). Acute exposure provoke hyperphosphorylation of the cytoskeleton, in liver cells, leading to cellular disruption with haemorrhage and the long term exposure can cause tumor promotion by inactivation of serine/threonine phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A). Therefore, it is very important to determine and quantify microcystin variants present in water reservoirs.

There are several methods available to evaluate qualitative and quantitatively microcystin and its variants in water reservoir and estimate human risks. Such methods comprise biological, biochemical and physico-chemical assays.

In this work, we have isolated and analyzed hepatotoxins by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with photodiode array (PDA) detector and their structures were elucidated by *Tandem – MS/MS with eletrospray ionization* (ESI-MS/MS). MC-RR, MC-LR, MC-YR and MC-hRhR were determined in samples collected at Billings reservoir and $[\text{Asp}^3]\text{MC-LR}$ was found in the strain *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 235.

The procedures developed herein can be a powerful tool for isolation and determination of microcistin and its derivatives founded in water reservoirs. Also, we have described for the first time a new variant of microcistin: MC-hRhR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Água e Poluição

“A terra é azul”. Assim o planeta terra foi descrito pela primeira vez por Yuri Gagarin, cosmonauta russo, ao observar a terra do espaço sideral. Tal descrição ocorreu em razão da reflexão da luz na atmosfera, por uma substância química fundamental para quaisquer formas de vida: a água.

A água doce disponível na Terra, além de apresentar valores quantitativos impressionantemente baixos, representa um recurso limitado, que pode ser apenas ligeiramente aumentado, com alto gasto de energia e recursos da dessalinização.

Mudanças no fornecimento de nutrientes a corpos d'água alteram o balanço e composição do fitoplâncton. Aumentos na quantidade de nutrientes que atingiram lagoas e reservatórios nas últimas décadas, especialmente em países desenvolvidos, estão diretamente relacionados ao surgimento de florações (REYNALDS, 1990).

O termo “eutrófico” - bem-alimentado - é utilizado para descrever sistemas biológicos onde há altas concentrações de nutrientes limitantes e, portanto, suportam um alto nível de produção orgânica. O termo “oligotrófico” - mal-alimentado - descreve uma condição oposta, ou seja, o sistema apresenta uma baixa concentração de nutrientes. Os sistemas de água doce devem ser interpretados de forma análoga: corpos d'água eutróficos recebem cargas relativamente altas de nutrientes limitantes e podem ser diferenciadas das oligotróficas pela concentração média de organismos presentes (REYNALDS, 1990).

Particularmente durante as últimas décadas do séc. XX houve uma alteração do estado trófico em quase todas as lagoas do mundo e o crescimento populacional tem tido uma relação direta com o enriquecimento desses corpos d'água. Destaca-se no processo de eutrofização a alteração dos ciclos de nutrientes terrestres relacionados à agricultura, com o uso de fertilizantes inorgânicos, o esgoto lançado em corpos hídricos - tratados ou

não - e a presença de detergentes constituídos de polifosfatos, facilmente hidrolisados a fosfatos bio-ativo (REYNALDS, 1990).

A disponibilização de nutrientes às algas presentes no meio através da eutrofização dos corpos d'água viabiliza a proliferação exacerbada de algumas espécies de algas (Fig. 1). Tal fenômeno é denominado de *bloom* ou floração algal (OUDRA *et al.*, 2001) e ocorre devido a condições ambientais como temperaturas elevadas, pH, baixa turbidez e altas concentrações de nutrientes (particularmente o fósforo e o nitrogênio), podendo acumular-se na forma de espuma (FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

Figura 1 - Coleta de cianobactérias pela CETESB e FCF-USP na represa Billings em um episódio de floração (Outubro de 2003)

1.2 Cianobactérias: Características Morfológicas

As cianofíceas, também conhecidas por algas azuis, habitam a terra havia 3 milhões de anos e podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosas

(Figura 2). Vivem em equilíbrio com as demais espécies existentes e são amplamente distribuídas em ecossistemas de água doce, marinho, água salobra, solo e superfícies úmidas (SPOOF *et al.*, 2003; ZAGATTO *et al.*, 1997).

Figura 2 - *Microcystis aeruginosa* (aumento de 2.500 x)

Fonte: CYANOSITE. *Microcystis aeruginosa*. Disponível em: <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/lgimages/microcy4.jpg>. Acesso em: 28 jun.2005.

Também chamadas de cianobactérias, as cianofíceas constituem um grupo de algas caracterizadas por uma estrutura celular procariótica, como as bactérias. A Cyanophyta (*cyano*, do grego = azul) ou Myxophyceae (*myx*, do grego = limo) não possui membrana nuclear, mitocôndrias e cloroplastos e apresentam inclusões celulares, que podem assumir funções semelhantes às organelas dos eucariontes, como as lamelas onde se encontram os pigmentos, a membrana plasmática e a região nuclear onde se encontram os cromossomos. Ressalta-se que a reprodução das cianobactérias ocorre por fissão binária e não por mitose, como outras algas e organismos superiores. Não obstante, as cianobactérias diferem das bactérias heterotróficas por conter clorofila-*a*, comum às algas eucarióticas e plantas vasculares e diferentes estruturalmente da bacterioclorofila. Estrutural e fisiologicamente as cianobactérias são como as bactérias, mas

funcionalmente, assemelham-se às plantas dos sistemas aquáticos. Tal como as bactérias, as cianofíceas apresentam mureína na parede celular (WETZEL, 1993).

Destaca-se notavelmente, a característica de produção de toxinas por algumas espécies de algas: nem todas as espécies de cianobactérias presentes em florações são tóxicas. Cepas tóxicas e não tóxicas não apresentam diferenças morfológicas significativas. Assim, se faz necessário o aprimoramento de técnicas físico-químicas, bioquímicas e biológicas para a detecção de espécies tóxicas e toxinas de cianobactérias (SPOOF *et al.*, 2003). O perfil das cianotoxinas em florações é absolutamente complexo: foram relatados 15 e 19 variantes de microcistinas (MC) numa floração de *Microcystis* no Reino Unido e Estados Unidos, respectivamente (SPOOF, KRISTER e MERILUOTO, 2001).

Há relatos de mortes de animais selvagens e domésticos por exposição a corpos d'água contaminados por cianobactérias e, mais recentemente, há implicação na morte humana (SAITO *et al.*, 2001; AVERSANO, EAGLESHAM e QUILLIAM, 2004).

FRANCIS, em 1878 foi o primeiro a relatar que florações algais tóxicas contribuíram para a intoxicação do gado, no Lago Alexandria, Austrália (DING e ONG, 2003).

Repercutiu mundialmente os casos de intoxicação humana com dano hepático e morte, atribuídos a exposição direta a altas concentrações de cianotoxinas, principalmente MC por via endovenosa, em Caruaru, Pernambuco, no ano de 1996, onde 76 pessoas morreram em um centro de hemodiálise pelo uso de água de lagos insuficientemente tratada e utilizada nos aparelhos (DING e ONG, 2003; OUDRA *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2000; SAITO *et al.*, 2001). HARADA *et al.* (1996) relataram a alta incidência de câncer hepático em Qidog e Haimen, na China, sugerindo que baixas concentrações de MC na água potável sejam um dos possíveis fatores ambientais de câncer hepático primário.

O risco de intoxicação ocorre quer pela ingestão das células de cianotoxinas intactas, pelas suas toxinas peptídicas cíclicas excretadas pela senescência da alga ou lise celular provocada pela adição de algicidas na água, como sulfato de cobre (PFLUGMACHER *et al.*, 1998; ZAMBRANO e CANELO, 1996). Foi relatada a concentração de 990 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR em lago após o tratamento de *Microcystis aeruginosa* com algicida e têm-se encontrado níveis que variam de 0,2 a 8,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (TAKENADA e TANAKA, 1995).

À luz dos conhecimentos atuais, a Organização Mundial da Saúde (WHO - OMS) propôs um valor de diretriz provisional de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR na água potável (toxina livre ou ligada à célula), derivada do NOAEL (nível de nenhum efeito adverso observado) de 40 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, levando-se em consideração a ameaça à saúde humana (BOUAÏCHA e MAATOUK, 2003).

Várias espécies de algas podem ser encontradas em corpos hídricos, no entanto, destacam-se as cianofíceas, clorofíceas, diatomáceas e fitoflagelados. No entanto, as cianofíceas apresentam maior potencial tóxico e risco à saúde pública. Durante a floração, a água adquire gosto e odor desagradável pela presença dos metabólitos secundários e os filtros de tratamento de água tendem a ser obstruídos (ZAGATTO *et al.*, 1997). As cianobactérias tóxicas são encontradas em lagoas, lagos e reservatórios de água doce eutrofizados (KAYA *et al.*, 2001).

Segundo HOEGER *et al.* (2004) as cianobactérias sintetizam inúmeras toxinas, normalmente definidas por sua estrutura química correspondente a 3 grupos: os peptídeos cíclicos, representados pelas microcistinas hepatotóxicas (MC), cilindrospermopsinas (CYN) e nodularinas (NODS); os alcalóides (saxitoxinas e variantes) neurotóxicos paralisantes (PSPs) e as anatoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s) e os lipopolissacarídeos - LPS).

No Brasil, BITTENCOURT-OLIVEIRA (2003) relata que as MC são as toxinas mais comumente encontradas em corpos de água doce e são produzidas principalmente por colônias de *Microcystis spp.* e pelas

filamentosas *Anabaena* (An.) spp., *Planktothrix/Oscillatoria* (*P. Agardhii* e *P. Rubescens*), *Anabaenopsis* spp., *Nostoc* (*N. rivulare*), *Aphanizomenon* (*Aph. Flos-aquae*), mas também por gêneros terrestres, como o *Hapalosiphon*.

1.3 Microcistinas e suas variantes

As MC compreendem uma família de heptapeptídios cíclicos (BARCO, RIVERA e CAIXACH, 2002; TSUJI *et al.*, 1997) com organotropismo ao fígado e apresentam seletividade hepatotóxica em peixes, pássaros e mamíferos (SAHIN *et al.*, 1995). São produzidas por gêneros de cianobactérias de água doce (algas azuis) freqüentemente presentes em florações e que podem ser responsáveis por intoxicações agudas ou crônicas, gerando risco à saúde humana (LAWTON e EDWARDS, 2001; OUDRA *et al.*, 2001).

As MC são indutoras de tumor (HARADA *et al.*, 1996; LAWRENCE e MENARD, 2001). A base molecular da promoção tumoral é a potente inibição de proteínas regulatórias, as fosfatases 1 e 2A (PP1 e 2A), enzimas chave na regulação celular (HARADA *et al.*, 1996; LAWTON e EDWARDS, 2001; LAWRENCE e MENARD, 2001; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; RUDOLPH-BÖHNER, MIERKE e MORODER, 1994; SPOOF *et al.*, 2003; TSUJI *et al.*, 1997).

Cerca de 70 variantes de MC já foram caracterizadas e isoladas de diferentes gêneros de cianofíceas de água doce, como *Microcystis*, *Planktothrix* (Oscillatória), *Anabaena* e *Nostoc* (BARCO, RIVERA e CAIXACH, 2002; FASTNER, FLIEGER e NEUMANN, 1998; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; KAYA *et al.*, 2001; LAWTON e EDWARDS, 2001; SAITO *et al.*, 2001; SPOOF *et al.*, 2003; SPOOF, KRISTER e MERILUOTO, 2001; SPOOF e MERILUOTO, 2002).

As MC possuem um esqueleto básico como o apresentado na figura 3 e sua estrutura geral é ciclo (*D*-Ala-L-X-*D*-eritro-metilAsp-L-Z-Adda-*D*-Glu-N-metildeidro-Ala) (SPOOF *et al.*, 2003).

Figura 3 - Estrutura geral das MC: ciclo-(D-Ala¹-X²-D-MAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), onde os resíduos representados por X e Z, podem ser substituídos por qualquer aminoácido.

Estes análogos de MC são constituídos de 5 aminoácidos que geralmente não variam (Adda, Glu, Mdha, Ala e MeAsp). As principais mudanças ocorrem na posição X ou Z, as quais podem apresentar qualquer aminoácido. Apresentam 3 *D*-aminoácidos (alanina, ácido metil aspártico e ácido glutâmico, os dois últimos ligados pelas respectivas cadeias laterais ao ciclo), e aminoácidos incomuns, a N-metildeidroalanina (Mdha) e ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-dienóico (Adda). O sétimo resíduo (Adda) é o único β -aminoácido hidrofóbico (BARCO, RIVERA e CAIXACH, 2002; SAHIN *et al.*, 1995; SPOOF e MERILUOTO, 2002).

A variabilidade estrutural da toxina refere-se ao dinamismo da célula de substituir os aminoácidos residuais *L*-amino 2 (X) e 4 (Z), por aminoácidos afins, formando combinações variáveis (PFLUGMACHER *et al.*, 1998) indicados por um sufixo de 2 letras, caracterizando sua principal variação estrutural (SPOOF, KRISTER e MERILUOTO, 2001).

Esta alteração da estrutura química ocorre aleatoriamente, implicando em diferentes toxicidades. Assim, as combinações de aminoácidos conferem

o nome da MC, ou seja, a abreviação do aminoácido variável é utilizada para distinguir diferentes hepatotoxinas. A fração X e Z, quando são constituídas dos aminoácidos leucina (L) e arginina (R), respectivamente, formam a MC-LR (a MC mais comum); se substituídas por tirosina (Y) e arginina (R), formam a MC-YR (KAYA *et al.*, 2001).

Alteração de resíduos que não sejam os resíduos 2 e 4 é descrita por um prefixo: a [*D*-Asp³]-MC-LR, contém um resíduo desmetilado do ácido D-aspartico, na posição 3 (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2005).

Dados toxicológicos disponíveis demonstram que há pequenas variações de toxicidade com as modificações estruturais. Entretanto, pode haver uma grande diminuição da toxicidade caso haja alterações do aminoácido incomum Adda, e esterificação do ácido glutâmico, reduzindo dramaticamente sua toxicidade. Esta mitigação de toxicidade está associada com alterações nos grupos que conhecidamente, interagem com os sítios das PP1 e PP2A (LAWTON e EDWARDS, 2001).

RUDOLPH-BÖHNER *et al.* (1994) relataram que conseguiram substituir a arginina pelo aminoácido aromático tirosina, para compor a MC-LY e que esta substituição, adjacente ao resíduo Adda (componente essencial para a hepatotoxicidade) diminuiu significativamente, mas não aboliu sua bioatividade e a tabela 1 mostra o perfil toxicológico dos congêneres das MC (RUDOLPH-BÖHNER, MIERKE e MORODER, 1994).

A maioria das variantes apresenta DL_{50} entre 50-100 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$. Poucas variantes estruturais apresentam menor toxicidade, além de serem quimicamente muito estáveis (ZECK *et al.*, 2001; RIVASSEAU, MARTINS e HENNION, 1998).

BEATTIE *et al.* (1998) relatam que as [ADMAdda⁵]MC em solução aquosa e/ou em MeOH são instáveis e se decompõem a temperatura ambiente. A [Asp⁵,ADMAdda⁵,Dhb⁷]MC-RR converte-se em [Asp³,D-metilAdda⁵,Dhb⁷]MC-RR em uma semana e o grupamento arginina pode apresentar uma atividade catalisadora, durante o processo.

Tabela 1. MC relatadas na literatura científica¹

Microcistinas	Peso Molecular	Toxicidade DL_{50} (rato, i.p., $\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	Organismo
MC-LA	909	50	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i>
MC-LAba	923	NR	<i>M. aeruginosa</i>
MC-LL	951	+	<i>M. aeruginosa</i>
MC-AR	952	250	<i>Microcystis</i> spp.
MC-YA	959	NR	<i>M. aeruginosa</i>
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-LR	966	+	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> sp.
D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-EE(Ome)	969	+	<i>Anabaena</i> sp.
MC-VF	971	NR	<i>M. aeruginosa</i>
[D-Asp ³]MC-LR	980	160-300	<i>A. flos-aquae</i> , <i>M. Aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i> , <i>O. agardhii</i>
[Dha ⁷]MC-LR	980	250	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> sp., <i>O. agardhii</i>
[DMAdda ⁵]MCST-LR	980	90-100	<i>Microcystis</i> spp., <i>Nostoc</i> sp.
[Dha ⁷]MC-EE(OMe)	983	+	<i>Anabaena</i> sp.
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	983	+	<i>Anabaena</i> sp.
MC-LF	985	+	<i>M. aeruginosa</i>
MC-LR	994	50	<i>M. aeruginosa</i> , <i>a flos-aquae</i>
[D-Asp ³ , D-Glu(OCH ₃) ₆]MC-LR	994	NR	<i>A. flos-aquae</i>
[(6Z)-Adda ⁵]MC-LR	994	>1.200	<i>M. viridis</i>
[Dha ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	997	+	<i>Anabaena</i> sp.
continua...			

¹ Esta tabela foi extraída do livro Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public healthy consequences, monitoring and management

...continuação				
[L-Ser ⁷]MC-LR	998	+	<i>Anabaena sp.</i>	
MC-LY	1.001	90	<i>M. aeruginosa</i>	
[L-Ser ⁷]MC-EE(OMe)	1.001	+	<i>Anabaena sp.</i>	
[D-Asp ³ ,Ser ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	1.001	+	<i>Anabaena sp.</i>	
MC-HiIR	1.008	100	<i>Microcystis spp.</i>	
[D-Asp ³ ,ADMAAdda ⁵]MC-LR	1.008	160	<i>Nostoc sp.</i>	
[D-Glu (OCH ₃) ⁶]MC-LR	1.008	>1.000	<i>A. flos-aquae, Microcystis spp</i>	
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-RR	1.009	+	<i>O.agardhii, Anabaena sp., M. aeruginosa</i>	
[D-Asp ³ ,ADMAAdda ⁵ ,Dhb ⁷]MC-LR	1.009	+	<i>Nostoc sp.</i>	
[L-MeSer ⁷]MC-LR	1.012	150	<i>Microcystis ssp.</i>	
[DHA ⁷]MC-FR	1.014	NR	<i>Microcystis sp.</i>	
[L-Ser ⁷] MC-E(OMe)E(OMe)	1.015	+	<i>Anabaena sp.</i>	
[ADMAAdda ⁵] MC-LR	1.022	60	<i>Nostoc sp.</i>	
[D-Asp ³ ,ADMAAdda ⁵] MC-LHar	1.022	+	<i>Nostoc sp.</i>	
[D-Asp ³] MC-RR	1.023	250	<i>O.agardhii, Anabaena sp., M. aeruginosa</i>	
[Dha] MC-RR	1.023	180	<i>M. aeruginosa, Anabaena sp., O.agardhii,</i>	
MC-LW	1.024	NR	<i>M. aeruginosa</i>	
				<i>continua...</i>

...continuação			
MC-FR	1.028	250	<i>Microcystis spp.</i>
MC-M(O)R	1.028	700-800	<i>Microcystis spp.</i>
[Dha ⁷]MC-HphR	1.028	+	<i>Anabaena sp.</i>
[D-Asp ³ ,Dha ⁷] MC-HtyR	1.030	+	<i>Anabaena sp.</i>
[Dha ⁷] MC-YR	1.030	+	<i>M. aeruginosa</i>
[D-Asp ³] MC-YR	1.030	+	<i>Microcystis spp.</i>
MC-YM(O)	1.035	56	<i>M. aeruginosa</i>
[ADMAAdda ⁵] MC-LHar	1.036	60	<i>Nostoc sp.</i>
MC-RR	1.037	600	<i>M. aeruginosa, M. viridis, Anabaena sp.</i>
[(6Z)-Adda ⁵] MC-RR	1.037	>1.200	<i>M. viridis</i>
[D-Ser ¹ , ADMAAdda ⁵] MC-LR	1.038	+	<i>Nostoc sp.</i>
[ADMAAdda ⁵ , MeSer ⁷] MC-LR	1.040	+	<i>Nostoc sp.</i>
[L-Ser ⁷] MC-RR	1.041	+	<i>Anabaena sp., M. aeruginosa</i>
[D-Asp ³ ,MeSer ⁷] MC-RR	1.041	+	<i>O. agardhii.</i>
MC-YR	1.044	70	<i>M. aeruginosa, M. viridis</i>
[D-Asp ⁷] MC-HtyR	1.044	160-300	<i>A. flos-aquae</i>
[Dha ⁷] MC-HtyR	1.044	+	<i>Anabaena sp.</i>
MC-(H ⁴)YR	1.048	NR	<i>Microcystis spp.</i>
[D-Glu-OC ₂ H ₃ (CH ₃)OH ₆] MC-LR	1.052	>1.000	<i>Microcystis spp.</i>
MC-HtyR	1.058	80-100	<i>A. flos-aquae</i>
[L-Ser ⁷] MC-HtyR	1.062	+	<i>Anabaena sp.</i>
continua...			

...continuação			
[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵ ,Dhb ⁷] MC-RR	1.052	+	<i>Nostoc sp.</i>
MC-WR	1.067	150-200	<i>Microcystis spp.</i>
[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵ ,Dhb ⁷] MC-HtyR	1.073	+	<i>Nostoc sp.</i>
[L-MeLan ⁷] MC-LR	1.115	1.000	<i>Microcystis spp.</i>

Aba: ácido aminoisobutírico; ADMAdda: O-Acetil-O-demetilAdda; Dha: deidroalanina; Dhb: deidrobutirina; DMAdda: O-demetilAdda; E(OMe): ácido metil éster glutâmico; (H4)Y: 1,2,3,4-tetraidrotisorisa; Har: homoarginina; Hil: homoisoleucina; Hph: homofenilalanina; Hty:monotirosina; MeLan: N-metilantionina; M(O): óxido-S-metionina; MeSer: N-metilserina; NR: não relatado.

O aminoácido Adda é fundamental para a ação tóxica do peptídeo (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). Segundo o mesmo autor, estudos epidemiológicos têm relacionado à presença de MC na água potável com o aumento da incidência de câncer colo retal, sendo que os grupos mais sensíveis à intoxicação pelas MC necessitam de maior atenção, como aqueles que têm hepatite-B, além de crianças e idosos.

1.4 Produção de toxinas e aspetos ambientais

A biossíntese desse heptapeptídeo cíclico ainda não está completamente elucidada. Em experimentos laboratoriais, a concentração de MC geralmente aumenta com a intensidade luminosa ou radiação fotossinteticamente ativa. A qualidade da luz é um fator determinante (a luz vermelha favorece a produção da toxina, enquanto que a luz azul, não) e há valores máximos de irradiação, acima da qual a produção de MC é inibida. No entanto, a variação da luz em ambientes naturais tem pequeno ou nenhum significado na quantidade celular da MC e as diferenças encontradas entre a toxicidade dos *blooms* de algumas espécies são

principalmente em razão das taxas de crescimento e características de diferentes cepas (FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

A temperatura tem importância direta na determinação das variantes de MC sintetizadas. FIGUEIREDO *et al.* (2004) relatam que altas temperaturas (>25°C) estão relacionadas com a produção de MC-RR e baixas temperaturas, a síntese de MC-LR.

A constituição da MC na cianobactéria e o conteúdo algal podem ser influenciados pela relação N:P. Embora haja muitos resultados controversos, a produção de MC por cepas de *Microcystis* parece estar influenciada pelas concentrações de nitrogênio e fósforo, com diferentes respostas, dependendo da espécie considerada em que, em circunstâncias onde há limitação de fósforo, pode aumentar concentrações de MC em *M. aeruginosa* (FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, (2005) relataram que há maior produção de MC-LR e [Asp³]MC-LR, das 11 às 15 horas, em culturas de *Microcystis panniformis* BCC 100 mantidas sob ciclo de luz:escuro e luz constante, mostrando que o relógio biológico também influencia a biossíntese de MC nessa espécie.

1.5 Mecanismos de ação das MC

Os mecanismos de ação das MC envolvem, na exposição aguda, uma rápida desorganização da arquitetura hepática, destruição do endotélio sinusoidal seguida de hemorragia intrahepática maciça nos mamíferos, levando-os a morte. A exposição crônica de MC leva à degeneração hepática generalizada com necrose, fibrose progressiva e infiltração mononuclear leucocitária. Bioquimicamente, a MC e seus análogos inibem as proteínas fosfatases, enzimas que fundamentalmente regulam a morfologia celular e suas funções, pela sua capacidade de remover grupos fosfato de substratos protéicos. MC e nodularinas inibem unidades catalíticas de serina/treonina das fosfatases tipo 1 (PP-1), 2A (PP-2A) e 3

(PP-3) (BOUAÏCHA e MAATOUK, 2003; PFLUGMACHER *et al.*, 1998; RUNNEGAR *et al.*, 1995; SAHIN *et al.*, 1995).

Segundo SAHIN *et al.* (1995) vários estudos envolvendo a exposição intraperitoneal ou intravenosa de MC radiomarcadas a ratos e camundongos, demonstraram que estes polipeptídios são seletivos ao fígado. Apenas pequenas frações de radioatividade foram encontradas em outros órgãos, como os rins ou corrente sanguínea e estudos competitivos indicam que as MC são conduzidas aos hepatócitos por transportadores iônicos orgânicos multiespecíficos, que deslocam ácidos biliares aos hepatócitos, explicando assim, o hepato-organotropismo. As fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) apresentam funções importantes na divisão celular, onde sua inativação deve levar à promoção do tumor e as MC promovem o tumor hepático iniciado pela dietilnitrosamina, em ratos (RUDOLPH-BÖHNER, MIERKE e MORODER, 1994).

Segundo SPOOF, KRISTER e MERILUOTO (2001) a exposição à MC pode ocorrer através de vias direta como água potável, água recreacional ou hemodiálise ou através de vias indiretas como alimentação. Os dados epidemiológicos formam a base para a avaliação de risco para os efeitos das MC, embora haja estudos em animais de laboratório que demonstram que os sintomas observados são similares aos encontrados em humanos, causando intoxicação aguda e crônica, podendo levar o indivíduo à morte. Os sintomas de intoxicação incluem irritação dérmica, vômito, diarreia, dano hepático agudo e crônico (ZECK *et al.*, 2001).

Ensaio a longo prazo investigaram a toxicidade oral crônica de MC-LR a ratas recomendam um valor de $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ como nível máximo permitido de MC na água potável (ZECK *et al.*, 2001).

No Canadá, a concentração máxima aceitável (MAC) para MC totais é de $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ na água potável, baseado na MC-LR total (livre e intracelular) que é normalmente a MC proeminentemente presente em corpos de água, enquanto a Austrália estabeleceu um MAC de $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ equivalente a MC-LR total (ARANDA-RODRIGUEZ, KUBWABO e BENOIT, 2003).

Ao investigar a morte de Flamingos Lesser, no Lago Bogoria, no Kenia, KRIENITZ *et al.* estimaram que para a MC-RR, a quantidade de cianobactérias tóxicas a ser consumida pelo referido Flamingo de 2 Kg, para ter um efeito letal, seria cerca de 22 g, peso úmido, que corresponde a 30% da alimentação de 72 g de peso seco consumido pelo Flamingo (KRIENITZ *et al.*, 2003).

Após injeção intra peritoneal, a MC acumula-se no fígado e a morte ocorre entre 2 a 4 horas com hemorragia intra hepática maciça e o pré-tratamento do rato com ciclosporina A (CP) ou rifamicina (Rif), protegem os animais da dose letal da toxina (RUNNEGAR, BERNDT e KAPLOWITZ, 1995).

Em razão dos mecanismos de ação apresentados e da tragédia ocorrida em Caruaru – PE, o Ministério da Saúde publicou a Portaria MS 518, que trata da qualidade de água.

1.6 Absorção e Biotransformação das MC

As MC são absorvidas pelos hepatócitos por transportadores de ácidos biliares multi-específicos, explicando assim, a especificidade celular e organotropismo da MC (DING e ONG, 2003; MILUTINOVIC *et al.*, 2003), onde induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando ao aumento dos peróxidos lipídicos (ROOH), depletam a glutathiona intracelular (GSH) e induzem ao dano celular e peroxidação lipídica. Após a indução do estresse oxidativo, ocorre a indução da transição da permeabilidade mitocondrial e a perda do potencial de membrana, resultando na apoptose, em hepatócitos de ratos (BOUAÏCHA e MAATOUK, 2004).

A biotransformação da MC-LR no fígado ocorre via conjugação com a glutathiona pela atividade da glutathiona-S-transferase (GST) e é transportada aos rins e intestino para excreção (GEHRINGER *et al.*, 2004). Este conjugado MC-LR/glutathiona parece ser o primeiro passo para a

biotransformação de cianobactérias em organismos aquáticos (PFLUGMACHER *et al.*, 1998).

ORR *et al.* demonstraram que o risco a saúde humana através do consumo de leite de gado que ingeriu entre 70 e 80 L de água por dia, por 15 dias, com 1×10^5 células de *Microcystis aeruginosa* foi aceitável, pela metodologia da Organização Mundial da Saúde (OMS) (ORR *et al.*, 2003).

1.7 Caracterização das MC por Espectrometria de Massas

Um espectrômetro de massas pode ser entendido, via de regra, como um instrumento contendo uma fonte de íons, um separador filtro de massas - na realidade, massa/carga (m/z) - e um detector. Amostras sólidas, líquidas ou gasosas contendo espécies voláteis ou não e com interesses voltados desde a análise elementar até a composição de proteínas requerem diferentes processos de ionização. Uma vez gerados íons, os processos de separação e detecção podem ser escolhidos de acordo com características mais ou menos comuns como sensibilidade, resolução, precisão de m/z e custo. Neste contexto, surgiu a ionização por *electrospray* como uma alternativa para geração de íons a partir de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida.

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o *electrospray* é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existent em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transferência de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário (MORAES e LAGO, 2003).

Métodos de ionização anteriores ao *electrospray*, no qual íons são transferidos da fase líquida para a fase gasosa, tal como bombardeamento de átomos rápido (FAB) ou dessorção por plasma provocam não só a dessolvatação dos íons, mas muitas vezes, sua fragmentação e formação de íons a partir de moléculas neutras. Isto se deve ao fato de que, nessas técnicas, uma grande quantidade de energia é fornecida de forma focalizada e em um curto período de tempo. A principal vantagem do *electrospray* sobre

estas outras técnicas é que a dessolvatação ocorre gradualmente em temperaturas relativamente baixas (tipicamente, de temperatura ambiente até 80°C), de forma a não gerar fragmentos nem moléculas ionizadas. Assim, muitos dos íons gerados na fase gasosa mantêm exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução, o que é perfeito para análise de espécies não voláteis e para estudos de especiação. No entanto, isto não ocorre para todas as espécies. Muitas vezes uma espécie com carga maior ou igual a dois está estabilizada pela camada de solvatação. À medida que a espécie é dessolvatada, tende a se envolver em processos que levem à redução de sua carga. Além disto, espécies neutras podem ser ionizadas por processos eletrolíticos na fase líquida, por formação de agregados iônicos durante o processo de *electrospray* e por dissociação induzida por colisão (CID) já na fase gasosa. A preservação ou não dos íons originais está intimamente ligada ao processo de ionização por *electrospray*. A ionização por *electrospray* envolve a formação de um *spray* eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. A implementação de uma fonte de *electrospray* é relativamente simples, comparando-se com outras fontes para espectrometria de massas. É necessária uma fonte de alta tensão (1000 a 7000 V) que esteja em contato com a solução contendo eletrólitos. Tipicamente, esta solução é bombeada através de um capilar (d.i. 50 a 100 µm) com uma vazão variável, dependendo da concentração da amostra (MORAES e LAGO, 2003).

A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta muito poderosa na caracterização estrutural de biomoléculas, sobretudo quando a quantidade de material obtido é escassa, pois apresenta maior sensibilidade que outros métodos de caracterização estrutural. O acoplamento desta técnica com métodos de ionização suaves como a ionização por *electrospray* (ESI) permite a análise de substâncias não-voláteis, termos sensíveis e ainda dos componentes de uma mistura após separação por técnicas como HPLC e eletroforese capilar (CE) (CARVALHO, 2001). Estes métodos por ionização branda vêm ganhando espaço ultimamente uma vez que permite a análise de moléculas polares (maioria das biomoléculas)

diferentemente dos métodos clássicos como a ionização por impacto eletrônico.

Na ESI, uma solução contendo um analito atravessa um capilar mantido em alto potencial, sendo que o alto campo elétrico na extremidade do capilar ($\sim 4.000\text{V}$) provoca o desprendimento de gotículas altamente carregadas em direção ao analisador. A dispersão destas gotículas em micro gotículas (*spray*) é auxiliada pela nebulização por fluxo de nitrogênio. Além do gradiente de potencial, as pressões reduzidas no analisador também auxiliam na atração das gotículas. Durante a travessia até o analisador as gotículas reduzem em tamanho pela evaporação do solvente promovido pelo fluxo de nitrogênio perpendicular ao fluxo do *spray* e também pelas “explosões de Coulomb” que gera subdivisões das gotículas por causa da alta densidade de carga. Estes processos se repetem até que os íons estejam totalmente dessolvatados (CARVALHO, 2001).

A análise por espectrometria de massas consiste basicamente em três etapas: gerar íons por meio da ejeção de elétrons, protonação ou desprotonação, separar estes íons de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e determinar as intensidades de cada um destes íons (CARVALHO, 2001).

Um espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador responsável pela separação dos íons em tempo no espaço e um detector. Para a introdução das amostras um sistema adequado deve ser ligado à fonte de ionização como, por exemplo, um sistema cromatográfico (CG ou HPLC). A pressão no percurso dos íons entre a fonte de ionização e o detector deve ser muito baixa ($\sim 10^{-6}\text{Torr}$) para que não ocorram colisões entre os íons e outras moléculas, induções de fragmentações ou bloqueamento dos íons que então não chegaram ao detector. Finalmente, para o controle dos diversos componentes e tratamento dos dados é necessário uma interface computacional. Na figura 4 um esquema dos componentes de um espectrômetro de massa é apresentado.

Figura 4 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas

Fonte: WATERS. Produto. Disponível em:

<http://www.waters.com/WatersDivision/Contentd.asp?ref=RHEY-5LPJLP>.

Acesso em: 07 abr. 05

Atualmente existe uma variedade de métodos de ionização para MS, mas a ionização por *electrospray* cada vez mais tem se destacado principalmente na área de biomoléculas. Esta tecnologia tem sido única no aspecto de fornecer simultaneamente um interfaceamento entre métodos de separação em solução como HPLC e eletroforese capilar e a facilidade na ionização de compostos altamente polares e não voláteis (CARVALHO, 2001).

Embora de alto custo, os analisadores do tipo *tandem* MS ou MS/MS vem se popularizando em razão da possibilidade de obter informações estruturais e um aumento na sensibilidade. Uma análise por MS/MS pode ser definida como a seleção do íon precursor no primeiro analisador, seguido pela detecção do íon produto, gerado na câmara de colisão (segundo analisador), no terceiro analisador. Estes fragmentos filhos são obtidos pela da conversão da energia translacional dos íons parentais em energia interna após a colisão com moléculas de gás energizadas. O MS/MS apresenta duas grandes vantagens que são o aumento da sensibilidade e seletividade quando comparado à espectrometria de massa clássica. O aumento da

sensibilidade está relacionado à diminuição do ruído químico que é provocado por outros componentes da amostra analisada. A filtragem dos íons e a possibilidade de seleção de um determinado íon levam a um ganho na relação sinal/ruído. A seletividade é pelo fato que a probabilidade de duas moléculas gerarem íons pai e filhos idênticos por MS/MS é muito baixa (CARVALHO, 2001).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as toxinas peptídicas cíclicas produzidas por cianobactérias presentes em florações algais ou em cepas cultivadas em laboratório. Além disso, desenvolver procedimentos cromatográficos para extrair e isolar MC bem como métodos espectrométricos para a sua elucidação estrutural.

Os principais objetivos específicos são:

- (i) Determinar as melhores técnicas de extração das MC e suas variantes em amostra de campo (Reservatório Billings) e na cepa cultivada em laboratório BCCUSP235 de *Microcystis aeruginosa*.
- (ii) Avaliar as melhores formas de realizar o preparo do extrato para mitigar os interferentes e concentrar as toxinas.
- (iii) Determinar as fases móveis e estacionárias mais adequadas para a purificação das MC por HPLC.
- (iv) Caracterizar estruturalmente as MC presentes na amostra de campo e de cultura por meio da técnica Espectrometria de Massas em *Tandem* com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e acessórios

Balança analítica Sartorius, Alemanha.

Centrífuga Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments.

Ultrassom Thorton - Inpec, Vinhedo, Brasil .

Evaporador rotativo 805, Fisatom, Brasil.

Incubator Shaker Series 25, New Brunswick Scientific Co., INC Edison, New Jersey, USA.

Speed-Vac®, Savant Instruments, INC Farmingdale, NY, acoplado a um condensador a vácuo de mesma marca.

Tubos tipo Falcon®.

Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo CLASS VP, Japão, com degaseificador modelo Degasys, DG-2410, Kyoto, Japão, e um cilindro de gás hélio (He), além de 2 bombas (Shimadzu, Japão) e detector de arranjo diodo (PDA) (SPD-M10 VP - Shimadzu, Japão). Intercomunicador modelo SCL – 10 A VP (System Controller), Japão, com Auto-Sampler, modelo SIL – 10 AF.

Coluna analítica Phenomenex C18 Sinergy (250 x 4,6 mm; poro de 5 µm) protegida por uma pré-coluna C18 (4mm x 3 mm, Phenomenex), com e preparativa Shimadzu C18 (250 x 20 mm; poro 5 µm; Kyoto, Japão).

Espectrômetro de Massas, modelo MS Quadrupolo, equipado com *probe electrospray* modelo Quattro Micro Waters/Micromass, Manchester, UK.

Espectrômetro de Massas, modelo Q-Tof, equipado com *probe electrospray* modelo Q-Tof Ultima API Waters/Micromass, Manchester, UK

Seringas de vidro, de 100 µL e 500 µL (Hamilton, Nevada, U.S.A).

Cartuchos Sep-Pak® modelo C18 *Cartridges* (Waters, Ireland).

Freezer modelo -86°C ULT Freezer, ThermoForma.

Vórtex

3.1.2 Reagentes

Fosfato monobásico de sódio (MERCK, Darmstadt, Germany).

Fosfato dibásico de sódio (MERCK, Darmstadt, Germany).

Clorofórmio (J.T.BAKER).

Metanol (MTEDIA Company, INC. USA).

Acetonitrila (MTEDIA Company, INC. USA).

Ácido fórmico (J.T.BAKER).

Ácido fosfórico (J.T.BAKER).

Hélio (Air Liquide).

Nitrogênio (Air Liquide).

3.2 Experimento 1: Amostras do Reservatório Billings

3.2.1 Coleta

As amostras analisadas neste estudo são provenientes da coleta de florações algais da superfície da água do Braço do Taquacetuba, no Reservatório Billings, cujas coordenadas são: latitude sul 23° 50' 41" e longitude oeste 46° 39' 25", em 08 de outubro de 2003, mostrada na Figura 05.

Figura 5 - Mapa do Município de São Paulo com destaque para a localização do Reservatório Billings

Fonte: PREFEITURA DE SÃO PAULO. Disponível em: <http://atlasambiental.prefeitura.sp.gov.br/pagina.php?id=19&B=mapas>. Acesso em 04 Jul 05

A coleta foi realizada conjuntamente com o grupo de monitoramento da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo) (Fig. 07). Após a coleta de aproximadamente 12 L de água com floração, com profundidade de 0 a 30 cm, a biomassa foi acondicionada em frascos apropriados, alocados ao laboratório sob temperatura de aproximadamente -4°C.

Figura 6 - Aparência da floração na represa Billings e a concentração das cianobactérias na rede fitoplâncton

O material coletado foi paulatinamente concentrado, em laboratório, por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 min. Rotações inferiores a essa, não foram suficientes para concentrar a amostra. Em seguida, a fase aquosa foi desprezada e o precipitado transferido a 16 tubos tipo Falcon®, perfazendo um total de 710 g, aproximadamente, de centrifugado algal. Esta biomassa foi armazenada a -80°C, uma vez que o presente trabalho não iria ser realizado imediatamente após tais procedimentos.

Figura 7 - Material após da concentração pela rede para fitoplâncton sendo acondicionado em frascos âmbar, para o transporte, sob refrigeração

3.2.2 Extração hidro-alcoólica das toxinas algais

Quatro tubos tipo Falcon[®] contendo a biomassa foram descongelados e pesados, perfazendo uma massa total de 177 g. Essa biomassa foi transferida a um erlenmeyer de vidro de 1L, onde foi realizada a extração líquido-líquido (LLE) com 500 mL de metanol:água (MeOH:H₂O, 3:1, v:v).

Procedeu-se 20 minutos de sonicação, em banho de gelo, para evitar o aquecimento da amostra e em seguida, 50 min. de agitação, a 150 rpm, à temperatura ambiente.

Após a sonicação e agitação, procedeu-se a centrifugação, onde cerca de 680 mL de amostra, MeOH e H₂O foram distribuídos para cada um dos 6 tubos plásticos com tampa emborrachada anti-vazamento para centrifugação, perfazendo um volume de cerca de 120 mL, para cada um deles, a 10.000 rpm, por 15 min. Foram testadas centrifugações com

menores rotações e período de tempo. Nessas condições, não houve a separação adequada e completa das fases.

Finalizada a centrifugação em que ocorreu a separação do solvente extrator com o centrifugado, procedeu-se a filtração a vácuo da amostra. A fase hidro-alcoólica (FH) do filtrado foi submetida à evaporação, pelo rotavapor, com temperatura controlada a 40°C. Uma vez que o sistema não mais permitia a volatilização dos solventes, ou seja, o MeOH e parte da H₂O foram evaporados, restando apenas a fração aquosa, procedeu-se a partição líquido-líquido (LLE).

3.2.3 Partição líquido-líquido do filtrado aquoso

A seguir, o volume do filtrado aquoso foi mensurado para que se pudesse estabelecer a relação entre os solventes utilizados na LLE. A partição ocorreu utilizando-se CHCl₃:MeOH:H₂O (7:6:3, v:v:v.), onde o volume do CHCl₃ e do MeOH dependiam do volume restante da água, após a roto evaporação, ou seja, à partir da evaporação da mistura azeotrópica, restou no balão de evaporação a água que não foi evaporada, contendo as toxinas. Com o funil de separação tampado, foi realizada uma vigorosa agitação para a extração das hepatotoxinas pela fase FH. Após cerca de 3 minutos de agitação aguardou-se a separação das fases para a coleta da FH - fase superior do sistema. Essa coleta foi realizada diretamente para um frasco de vidro de fundo redondo do rotavapor. A fase inferior (orgânica) foi coletada em frasco âmbar, para posterior análise.

Foram observados picos de absorção máxima sugestivos de MC na FH, mas não na fase orgânica, em análise por HPLC.

3.2.4 Concentração da fração hidro-alcoólica

A FH foi concentrada em rotavapor sob temperatura de 40°C, 130 rpm, pelo tempo suficiente para que não houvesse mais a evaporação da amostra. O objetivo nesta etapa é a evaporação à secagem total, não obstante, a bomba a vácuo não foi suficiente para tal.

Com o intuito de evaporar completamente a amostra, a fração que não foi volatilizada pelo rotavapor foi transferida a tubos de vidro tipo Corex[®] com volumes próximos uns aos outros - o MeOH fora volatilizado pelo rotavapor e o CHCl₃ foi desprezado antes da evaporação, restando a fração aquosa, onde se procedeu a evaporação à secura, por Speed-Vac[®].

3.2.5 Preparo da amostra para purificação das toxinas por HPLC

Para que não houvesse o entupimento das linhas do HPLC, bem como do sistema injetor e da coluna/pré-coluna, a amostra poderia ser filtrada por meio de filtros específicos ou submetida à centrifugação. Quando a segunda opção era adotada, havia a sedimentação das partículas de maior densidade (parte das impurezas) com centrifugação de 1 mL da amostra a 12.000 r.p.m., por 1 min.

3.2.6 Condições cromatográficas para a purificação das microcistinas: fração hidro-alcoólica

A purificação da FH foi realizada pela utilização de uma fase móvel aquosa e outra orgânica. A fase móvel aquosa do sistema analítico do HPLC foi constituída pelo tampão fosfato, 50 mM, pH 3. Cerca de 30 min a 40 min. antes das corridas analíticas a fase móvel aquosa era retirada da refrigeração, para não alterar o tempo de retenção da amostra - temperaturas diferentes do sistema alterariam o tempo de eluição.

A preparação do tampão fosfato foi realizada com a pesagem de 0,230 g de Na₂HPO₄ e de 3,25 g de NaH₂PO₄, para preparar 1L de solução tampão. A correção do pH foi obtida pela instilação de gotas de ácido fosfórico (H₃PO₄) na amostra até a atingir o pH 3, em um béquer plástico.

O medidor de pH foi calibrado com temperatura local de 20°C, mantida artificialmente. Houve a calibração inicial do equipamento com o calibrador de pH 6,9 que fica armazenado sob refrigeração (retirada cerca de 10 minutos antes do uso). Após corrigir o pH supra-citado, houve a correção do mesmo utilizando-se o calibrador 3,9. Antes de cada etapa de calibração,

o sensor do calibrador foi lavado com água ultra-pura e seco com papel absorvente.

A fase aquosa do sistema solvente após correção do pH foi transferida do béquer plástico para o sistema filtrante a vácuo, em que após a filtração, foi transferido à garrafa de HPLC, para que houvesse o devido armazenamento, durante períodos intermitentes ao uso, sob refrigeração.

O solvente orgânico utilizado (ACN) foi filtrado nas condições anteriormente citadas, com a observação da alteração do filtro utilizado: filtro de fase orgânica. Não houve a exigência de armazenamento desta fase sob refrigeração, que ocorreu em ambiente fresco, sob abrigo da luz e de umidade.

Durante a análise, houve a coleta dos picos do cromatograma que sugeririam a presença dos congêneres das MC. O trabalho foi realizado sem o emprego de padrões. Picos que apresentavam absorção máxima em 238 nm e que apresentavam espectros característicos foram coletados. Não obstante, dezenas de análises cromatográficas foram realizadas para que fosse obtido um espectro cromatográfico com uma melhor separação de picos.

Após sucessivas tentativas, observou-se que havia vários picos com espectros sugestivos de MC, por comparação destes com os espectros da literatura, a 238 nm de absorção máxima, acompanhada pelo PDA. A separação dos mesmos não era efetiva até que então, após equilibrar a coluna analítica por 20 min. por eluição de 20% da fase aquosa em relação à fase orgânica, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, zerou-se a linha base e executou-se a primeira corrida analítica, pela injeção manual de 50 μL da amostra, através de uma seringa de vidro, de 100 μL , segundo o gradiente demonstrado na tabela 02.

Tabela 2 - Condição da fase móvel para a purificação da amostra

Etapas	Tempo (min)	Função (bomba)	Valor (%)
1	0	Conc. B	20
2	25	Conc. B	60
3	30	Conc. B	95
4	30	Stop	20

A análise cromatográfica foi efetuada com programação por gradiente, com alteração da composição da fase móvel durante a execução da análise. A bomba A representa o tampão fosfato, 50 mM, pH 3 e a bomba B, ACN.

A amostra injetada corresponde a ressuspensão do evaporado do Speed Vac[®], com 1 mL de MeOH:H₂O (7:3) e análise por HPLC, com filtração prévia por cartuchos específicos.

3.2.7 Coleta de picos

Uma vez observada a reprodutibilidade do método, foram registrados os tempos de retenção dos picos cujos espectros sugeriam ser as MC, onde se procederam as coletas. A amostra injetada foi o concentrado da FH, ressuspendido em 2,5 mL de MeOH:H₂O (3:1). Com a coluna preparativa, o volume injetado era de cerca de 650 µL (um volume um pouco maior que o *looping*, para preenchê-lo completamente), sendo que foram necessárias 4 corridas para que toda amostra fosse purificada.

Vários tubos de vidro de 20 mL foram utilizados para a coleta dos picos e tiveram um prévio enxágüe com água ultra-pura e etanol (EtOH) para a limpeza dos mesmos e foram identificados de acordo com o tempo de retenção de cada provável variante da toxina e dispostos sobre a bancada, ao lado do HPLC, em estante adequada - devidamente vedados com papel alumínio, para evitar a contaminação dos mesmos enquanto se processava a análise e para evitar possível fotodegradação das toxinas, após a coleta.

Acompanhou-se a corrida analítica pelo detector de arranjo diodo (PDA), por permitir a verificação dos espectros dos congêneres das toxinas e por onde se procedia a coleta do eluato, ou seja, o monitoramento dos picos no monitor do computador se dava em tempo real: quando as toxinas começavam a absorver a radiação, significava que estavam passando pelo respectivo detector, sendo assim, imediatamente eluídas e coletadas. A monitorização se deu pela comparação do espectro com a referência literária e comprimento de onda de 238 nm.

Finalizada a etapa de coleta de picos, as amostras coletadas em tubos de vidro de 20 mL foram transferidas para tubos tipo Corex[®]. Estes tubos tiveram prévio enxágüe com água ultra-pura e EtOH para ratificação da limpeza dos mesmos e identificados (com os respectivos tempos de retenção). Os tubos foram radialmente distribuídos no Speed-Vac[®] até secagem completa. Em seguida, o concentrado foi ressuscitado com 500 µL de MeOH:H₂O (3:1; v/v) e transferidos a frascos de vidro âmbar de 6 mL, devidamente identificados. Esta alíquota foi concentrada à secagem total por fluxo de nitrogênio gasoso (N₂), sob exaustão, em capela.

3.2.8 Repurificação da amostra

O tampão fosfato utilizado como fase móvel deveria ser removido para que não houvesse interferência na análise por espectrometria de massas, ou seja, caso não fosse eliminado, haveria uma relação sinal-ruído muito baixa, podendo comprometer ou inviabilizar a análise. Desta forma, procedeu-se a dessalinização da amostra coletada pela repurificação da mesma, inicialmente por cartuchos C18 e posteriormente, por HPLC, onde o fase móvel constituiu de MeOH:H₂O (3:1; v/v), numa corrida isocrática, por 12 minutos, em coluna preparativa e *looping* de 500 µL e cerca de 650 µL de amostra (o volume utilizada em cada injeção sempre foi um pouco maior que o volume total do *looping*), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Condição da fase móvel para a repurificação da amostra: corrida isocrática, sem variação da proporção dos solventes, ao longo da corrida

Etapas	Tempo (min)	Função (bomba)	Valor (%)
1	0	Conc. B	75
2	12	Conc. B	75
3	12	Conc. B	0

A repurificação da amostra foi efetuada mantendo-se a composição da fase móvel, constante durante a análise cromatográfica. A bomba A representa a H₂O ultrapura e a bomba B, MeOH.

3.3 Experimento 2: *Microcystis aeruginosa* (Cepa BCCUSP 235)

Trezentos mg de extrato bruto (centrifugado) de algas da Cepa 235 de *Microcystis aeruginosa* foram utilizados para a extração de toxinas por MeOH:H₂O (75:25, v/v), com rompimento celular realizado por ultra-som, em banho de gelo, por 20 min. Após a extração, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g, por 15 min. O sobrenadante foi evaporado à secua por Speed-Vac[®].

Neste experimento, o *clean up* ocorreu por meio de uma extração em fase sólida (SPE), com o emprego de cartuchos específicos e não por LLE. Assim, o cartucho Sep Pack[®] foi equilibrado, antes do uso, da seguinte forma: conectou-se uma seringa plástica de 1.000 µL à menor extremidade do cartucho Sep-Pak[®] e eluiu-se lentamente, 3 mL de MeOH, por 3 vezes, 1 mL por vez. Em seguida, eluiu-se lentamente, 3 mL de água ultra-pura, 1 mL por vez. Nesta fase, a coluna Sep-Pak[®] estava preparada para receber a amostra, propriamente dita. A tabela 5 mostra o protocolo de purificação da Cepa 235, com SPE.

Tabela 4 - Protocolo de *clean up* por cartucho Sep-pak®

Etapa	Solvente	Volume total injetado (mL)	Nº repetições da eluição (1 mL por repetição)
1	MeOH 100%	3	3
2	H ₂ O 100%	3	3
3	Amostra	1	1
4	H ₂ O 100%	5	5
5	H ₂ O:MeOH 1:1	5	5
6	MeOH 100%	5	5

Após nova substituição da seringa plástica de 1 mL, eluiu-se lentamente, 5 mL de água ultra-pura, 1 mL por vez. Embora fosse esperado que nenhuma toxina fosse encontrada nessa fase, procedeu-se a coleta da mesma em tubo de vidro âmbar, de 6 mL, evaporado a fluxo de N₂ à secagem total, devidamente identificada e armazenada a -80°C.

A fase seguinte é a mais importante: à luz do conhecimento das propriedades físico-químicas, presumivelmente seria nesta fase que as toxinas iriam eluir. Assim, eluiu-se lentamente, 5 mL de MeOH:H₂O (1:1, v:v), 1 mL por vez. Procedeu-se a coleta da mesma em tubo de vidro âmbar, de 6 mL, previamente autoclavado e seguidamente procedeu-se a evaporação, por N₂, à secagem total, com o frasco devidamente identificado e armazenado a -80°C.

A fase posterior de purificação foi realizada com o intuito de evitar possíveis perdas de toxinas por eluição, ou seja, por procedimento operacional inadequado ou por uma polaridade inesperada da toxina - as MC apresentam aproximadamente 70 congêneres caracterizados - poderia haver a eluição da mesma em fase “não esperada”. Novamente houve eluições de solvente através de outra seringa plástica estéril, de 1 mL, conectada à menor extremidade do cartucho Sep-Pak®, onde eluiu-se

lentamente, 5 mL de MeOH, 1 mL por vez. A coleta da mesma ocorreu em tubo de vidro âmbar, de 6 mL, evaporada a fluxo de N₂ à secagem total, devidamente identificada e armazenada a -80°C. Essa evaporação foi muito mais rápida que as anteriores.

O eluato do MeOH:H₂O (1:1) foi coletado, concentrado por Speed-Vac[®] e após prévia ressuspensão da amostra por 1.000 µL de MeOH:H₂O (7:3, v:v), procedeu-se a corrida analítica por HPLC, com coleta dos picos e análise por MS.

Como as toxinas possuem grande capacidade de adsorção às superfícies sólidas, principalmente material plástico - durante todo estudo, priorizou-se o uso de materiais de vidro e não plástico - procedeu-se breve sonicação para o desprendimento de partículas eventualmente adsorvidas nas paredes dos tubos.

3.4 Experimento 3: comparação da extração com metanol x ácido acético

Quinhentos mg de extrato bruto (centrifugado de algas) da amostra de campo foram utilizados para a extração de toxinas por 10 mL de MeOH:H₂O (3:1, v/v) e outros 500 mg para a extração com ácido acético (HAc) a 5%, com rompimento celular realizado por ultra-som, em banho de gelo, por 20 min. Após a extração, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g, por 15 min. A amostra foi filtrada e o sobrenadante foi evaporado à secura por Speed-Vac[®].

Após evaporação completa, a amostra foi ressuspensa em 1 mL MeOH e submetida à cromatografia líquida (CL). A análise foi realizada em triplicata e a condição do experimento está descrita no item 3.2.6.

3.5 Espectrometria de massas

Os picos 1 e 2 obtidos da FH foram ressuspensados em ACN/ácido fórmico 0,1% (1:1, v/v), e foram introduzidos na fonte de íons por infusão

direta usando uma bomba de seringa integrada, fluxo de $2\text{-}10\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. O espectro de massas de varredura foi adquirido em modo positivo, onde a fonte e os parâmetros analisados foram otimizados para o íon molecular protonado. Os espectros de MS/MS (varredura de íons produto) foram adquiridos usando Ar como um gás da colisão ($4\cdot 10^{-3}$ mbar) em diferentes energias de colisão (5-60 eV).

4. RESULTADOS

4.1 Extração líquido-líquido com amostra de campo

Após a LLE, a amostra apresentou alguns picos de interesse, como mostra a Figura 10, os quais mostraram espectros no UV característicos de MC. Por essa razão, foram coletados conforme descrito no item 3.2.7, em análise por HPLC preparativo.

Figura 8 - Perfil cromatográfico (Método descrito no item 3.2.6) referente à análise da amostra de campo após a realização da LLE (CHCl_3 :MeOH:H₂O, 7:6:3; v:v:v) da fração hidroalcoólica (FH)

O critério da coleta dos picos foi a característica dos espectros, sugestivos de MC e as Figuras 11 e 12 apresentam os espectros dos Picos 1 e 2, da FH.

Figura 9 - Espectro do Pico 1 (tempo de retenção de 17.930) com *scan* de 205 a 320 nm

Figura 10 - Espectro do Pico 2 (tempo de retenção de 20.816) com *scan* de 205 a 320 nm

Os picos 1 e 2 da FH foram repurificados por HPLC preparativo conforme descrito no item 3.2.8., e seus perfis cromatográficos são mostrados nas Figuras 13 e 14.

Figura 11 - Repurificação da amostra do Pico 1, com corrida isocrática MeOH:H₂O, item 3.2.8, com máxima absorção em 238 nm

Figura 12 - Repurificação da amostra do Pico 2, com corrida isocrática MeOH:H₂O, com absorção a 238 nm. O espectro UV do pico 2 está no quadrante superior direito da figura

4.2 Análises dos picos 1 e 2 por ESI-MS/MS

Os picos 1 e 2 foram analisados por ESI-MS/MS conforme item 3.4. Na figura 12, pode-se observar o espectro de massa do pico 1, o qual apresentou o pico íon *quasi-molecular* de 1038,8, $[M+H]^+$. Segundo a Tabela 1, essa massa molecular corresponde a MC-RR.

Os espectros dos produtos iônicos da MC-LR ($[M + H]^+$, $m/z = 995,6$), de MC-YR ($[M + H]^+$, $m/z = 1045,6$) e MC-RR ($[M + H]^+$, $m/z = 1038,8$) foram mensurados numa faixa m/z variável, em modo positivo, utilizando dissociação de colisão ativada (CDA) com gás argônio no quadrupolo. Duas faixas de relação massa:carga (m/z) foram utilizadas: de 900-1100 para $[M + H]^+$ e m/z de 500 a 550, para $[M + 2H]^{2+}$. As MC com duas argininas, como a MC-RR formam íons duplamente carregados sob condições de *spray* iônico.

A Figura 15 evidencia o espectro de massas do pico 1 da FH em *scan* de 950 a 1150 m/z e a Figura 16, o padrão de fragmentação do mesmo pico, com seleção do íon com m/z 1038, a 55 eV.

Figura 13 - Espectro de massas do pico 1 da FH em scan de 950 a 1150 m/z

DAUGHTERS OF 1039

Figura 14 - Espectro de massas do pico 1 da FH com fragmentação da toxina com m/z 1039 (MC-RR), a 55 eV

A partir da fragmentação das MC, procedeu-se a inferência dos resíduos dos aminoácidos obtidos. A tabela 5 mostra as inferências da MC-RR.

Tabela 5 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-RR, a 55 eV

<i>m/z</i>	MS ² Inferência - MC-RR
1021	[<i>m/z</i> 1039-H ₂ O] ⁺
997	[<i>m/z</i> 1039-CH ₅ N ₂] ⁺
979	[<i>m/z</i> 997-H ₂ O] ⁺
910	[Arg-Adda-Glu-Mdha-Ala-Arg] ⁺
892	[<i>m/z</i> 910-H ₂ O] ⁺
868	[<i>m/z</i> 997-Asp] ⁺
754	[Arg-Adda-Glu-Mdha-Ala] ⁺
729	[Asp-Arg-Adda-Glu] ⁺
683	[Arg-Adda-Glu-Mdha] ⁺
600	[Arg-Adda-Glu] ⁺
443	[Adda-Glu] ⁺
425	[<i>m/z</i> 443-H ₂ O] ⁺
286	[Asp-Arg] ⁺
213	[Glu-Mdha] ⁺
174	[Arg-NH ₃] ⁺
135	[PheC ₂ H ₃ OCH ₃] ⁺
112	Imonium da Arg

A estrutura química da MC-RR está representada na Figura 15.

Figura 15 - Estrutura química da MC-RR, com substituição dos fragmentos X e Z pela arginina

Figura 16 - Espectro de massas do pico 1 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 1067 (MC-hRhR), a 60 ev

Tabela 6 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-hRhR, a 60 eV

	1067 – 60 eV	MS ² Inferência - MC – hRhR
1049	[m/z 1067-H ₂ O] ⁺	
1039	[m/z 1067-CO ₂]	
1008	[m/z 1067-CH ₅ N ₃] ⁺	
896	[Adda-Glu-Mdha-Ala-HArg-Asp] ⁺	
868	[m/z 896-CO] ⁺	
766	[Adda-Glu-Mdha-Ala-HArg] ⁺	
738	[m/z 766-CO]	
596	[Adda-Glu-Mdha-Ala] ⁺	
578	[m/z 596-H ₂ O] ⁺	
526	[Adda-Glu-Mdha] ⁺	
498	[m/z 526-CO] ⁺	
443	[Adda-Glu] ⁺	
392	[m/z 526-134] ⁺	
213	[Glu-Mdha] ⁺	
135	[PheC ₂ H ₃ OCH ₃] ⁺

Figura 17 - Estrutura da MC-hRhR com a substituição dos resíduos 2 (X) e 4 (Z) pela homo-arginina

Figura 18 - Espectro de massas do pico 2 da FH, com a seleção de 135 m/z para a determinação dos íons precursores, com scan de 800 a 1100 m/z , apresentando fragmentos que correspondem a MC-LR (995,8, $[M+H]^+$) e MC-YR (1045,8, $[M+H]^+$)

Figura 19 - Espectro de massas do pico 2 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com $m/z\ 1045,8$ (MC-YR), a 50 eV

Tabela 7 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-YR, a 50 eV

<i>m/z</i>	MS ² Inferência - MC - YR
1018	[<i>m/z</i> 1046-CO] ⁺
974	[<i>m/z</i> 1046-Ala] ⁺
917	[<i>m/z</i> 1046-DAsp] ⁺
889	[<i>m/z</i> 1046-Asp-CO] ⁺
811	[<i>m/z</i> 1046-Ala-Tyr] ⁺
761	[<i>m/z</i> 1046-Asp-Arg] ⁺
682	[<i>m/z</i> 1046-Ala-Tyr-DAsp] ⁺
600	[<i>m/z</i> 1046-DAsp-Tyr-Ala-Mdha] ⁺
572	[<i>m/z</i> 600-CO] ⁺
448	[<i>m/z</i> 1046-DAsp-Arg-Adda] ⁺
319	[<i>m/z</i> 1046-DAsp-Arg-Adda-Glu] ⁺
236	[<i>m/z</i> 1046-DAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha] ⁺
213	[<i>m/z</i> 1046-Ala-Tyr-Asp-Arg-Adda] ⁺
163	Tyr
136	Imonium da Tyr
135	[PheC ₂ H ₃ OCH ₃] ⁺
112	Imonium da Arg
70	Imonium da Arg

Figura 20 - Estrutura da MC-YR com a substituição dos resíduos 2 e 4 pela tirosina e arginina, respectivamente

Figura 21 - Espectro de massas do pico 2 da FH com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 996 (MC-LR), a 45

Tabela 8 - Inferência dos fragmentos obtidos para a MC-LR, a 45 eV

996,4	MS ² Inferência - MC - LR
996,4	Hciclo(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha) ⁺
967,5	Hciclo(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha) ⁺ -CO
599,3	HL-Arg-Adda-D-Glu ⁺
571,2	HD-MAsp-L-Arg-Adda ⁺ -CO
553,2	HMdha-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg ⁺
470,1	HD-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg ⁺
397,2	HMdha-Ala-L-Leu-D-MeAsp ⁺
375,1	HAdda-D-Glu-Mdha-D-Ala ⁺ -NH ₃ -135
286,1	HD-MeAsp-L-Arg ⁺
268,1	HMdha-DAla-L-Leu ⁺
213,1	HDGlu-Mdha ⁺
174,1	L-Arg+NH ₄ ⁺
135,2	PheCH ₂ OCH ₃ ⁺
86,1	L-Leu

Figura 22 - Estrutura da MC-LR (m/z 996) com a substituição dos resíduos 2 e 4 pela leucina e arginina, respectivamente

4.3 Extração em fase sólida da cepa de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 235.

À partir da CL da Cepa 235, foi coletado o pico de tempo de retenção 18 min., como descrito no item 3.2. A figura 18 mostra o perfil cromatográfico da referida Cepa e o pico coletado para a análise por ESI-MS/MS.

Figura 23 - Perfil cromatográfico da análise obtida da Cepa 235 de *M. aeruginosa*

Após a análise por ESI-MS do pico da Cepa 235, adquiriu-se o espectro demonstrado na figura 20, com fragmentos da $[Asp^3]MC-LR$ ($981,5 [M+H]^+$).

Figura 24 - Espectro de massas da cultura da Cepa BCCUSP 235, com fragmentação da estrutura da toxina com m/z 981,5 ([Asp³]MC-LR), a 45 eV

Tabela 9 - Inferência dos fragmentos obtidos para a [Asp³]MC-LR, a 45 eV

981	MS ² Inferência - MC[Asp ³]MC-LR
982,5	Hciclo(DAla-HArg-MAsp-HArg-Adda-DGlu-Mdha) ⁺
953,3	Hciclo(D-Ala-L-Leu-D-Asp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha) ⁺ -CO
599,2	HL-Arg-Adda-D-Glu ⁺
539,1	HMdha-D-Ala-L-Leu-D-Asp-L-Arg ⁺
466,1	HD-Ala-L-Leu-D-Asp-L-Arg ⁺
383,1	HMdha-D-Ala-L-Leu-D-Asp ⁺
272,2	HD-Asp-L-Arg ⁺
213,0	HD-Glu-Mdha ⁺
174,3	L-Arg ⁺ NH ₄ ⁺
135,3	[PheCH ₂ OCH ₃] ⁺
86,2	L-Leu ⁺

Figura 25 - Estrutura da [Asp³]MC-LR (m/z , 981) com a substituição dos resíduos 2 e 4 pela leucina e arginina, respectivamente

4.4 Experimento 3: comparação da extração com metanol x ácido acético

Ao realizar extrações das MC da amostra de campo, em triplicata e com diferentes solventes (MeOH:H₂O, 3:1 e HAc, a 5%), adquiriram-se as áreas dos picos 1 e 2.

Com a extração realizada por MeOH:H₂O, 3:1, obteve-se uma área média de 1070622, com desvio padrão relativo de 0,917% e média de 1190314, com desvio padrão relativo de 1,602%, para os picos 1 e 2, respectivamente.

O perfil cromatográfico da extração com o referido solvente é mostrado na Figura 26.

Figura 26 - Perfil cromatográfico da extração de MC por MeOH:H₂O (3:1), como descrito no item 3.4., com áreas dos picos 1 e 2 muito próximas

À partir da extração realizada por HAc a 5%, obteve-se uma área média de 975138, com desvio padrão relativo de 0,076% e média de 662240, com desvio padrão relativo de 0,257%, para os picos 1 e 2, respectivamente.

O perfil cromatográfico da extração com o referido solvente é mostrado na Figura 29.

Figura 27 - Perfil cromatográfico da extração de MC pelo HAc 5%, como descrito no item 3.4. Os picos 1 e 2 apresentam visível diferença de área

5. DISCUSSÃO

5.1 Extração das toxinas

Até o presente momento, não há na literatura científica uma uniformidade e concordância dos métodos de extração empregados na purificação das MC, provavelmente em razão da abrangência das variantes das hepatotoxinas que podem diferir entre as amostras - de campo ou de cultura, liofilizado ou centrifugado (FASTNER, FLIEGER e NEUMANN, 1998; LAWTON e EDWARDS, 2001) – e por isso apresentam polaridade e solubilidade diferentes, com distintos comportamentos.

VAN der WESTHUIZEN e ELOFF (1982), apud (LAWTON e EDWARDS, 2001) relataram a adequabilidade do uso da água em pH ligeiramente alcalino, utilizando NH_4HCO_3 , a 0,1 M, pH 8,4, para a referida extração e ressaltaram que a extração em baixo pH apresenta baixa recuperação. Não obstante das observações realizadas pelos pesquisadores, a extração aquosa das MC, em condição alcalina, é muito pouco empregada (LAWTON e EDWARDS, 2001).

Em 1984, SIEGELMAN *et al.*, apud (LAWTON e EDWARDS, 2001) descreveram uma extração utilizando 1-butanol-metanol-água (5:20:75, v:v:v). Há inúmeros pesquisadores utilizando este método atualmente, mas as informações sobre a eficiência da extração são pouco discutidas e relatadas, além de co-extrair inúmeros compostos, resultando em uma amostra complexa. Há um estudo que relata satisfatória extração de MC-LR, -LY, -LW, -LF, embora se acredite que o MeOH extraia uma concentração maior de cada variante.

MATTHIENSEN *et al.* (2000) utilizaram HAc em meio aquoso (5%, v:v) para proceder a extração de material liofilizado, bem como HARADA *et al.* (1996) também utilizaram HAc a 5%, com pH 2,7. No entanto, o HAc extrai as ficocianinas, substâncias hidrossolúveis que conferem a cor azulada às *Microcystis*, embora não extraia pigmentos como a clorofila-a, que torna difícil a purificação. As ficocianinas não são retidas pelo cartucho C18, após a extração. A extração com o ácido acético é 15% menos eficaz para a MC-LR (LAWTON e

EDWARDS, 2001) e duas vezes mais eficaz para a MC-RR, se comparado com a extração metanólica pura, provavelmente por seu caráter mais hidrofílico, se comparado às demais (FASTNER, FLIEGER e NEUMANN, 1998).

A extração de cianobactéria com HAc a 5% limita a extração de proteínas, enquanto que a extração com metanol, suprime a extração de glicoproteínas e materiais lipossolúveis, embora extraia consideráveis teores de pigmentos (MERILUOTO, 1997).

Segundo LAWTON e EDWARDS (2001), a melhor extração foi observada a 50-80% de solução hidro-alcoólica, onde 70% de solução aquosa é a mais adequada e FASTNER, FLIEGER e NEUMANN (1998) explicam que a extração da MC-RR pelo MeOH 100% e MeOH a 75% ocorre com igual eficiência em culturas axênicas em razão da presença incomum de mucilagem hidrofílica das *Microcystis*, que normalmente não estão agregadas em colônias quando em cultura, sendo mais eficientemente extraídas com solventes mais polares. AGUETE *et al.* (2003) e GAGO-MARTINÉZ *et al.* (2003) realizaram a extração de alga liofilizada utilizando MeOH:H₂O (75:25), semelhantemente ao presente estudo, embora a amostra seja de campo.

Há também a possibilidade de se proceder a uma extração seqüencial, ou seja, extrai-se inicialmente toxinas hidrofílicas com HAc a 5%, e posteriormente realiza-se uma segunda extração, com MeOH a 100%. Se o objetivo primário da análise for purificar e caracterizar todas as toxinas presentes, devem-se extrair todos os congêneres igualmente. Opostamente, se o escopo for determinar toxinas específicas, deve-se utilizar o sistema extrator mais adequado (LAWTON e EDWARDS, 2001).

A extração utilizada neste trabalho foi realizada com MeOH:H₂O (3:1, v:v) segundo o protocolo proposto por LAWTON e EDWARDS (2001). Segundo SHEN *et al.* (2003), a MC-RR foi extraída de forma igualitária por essa condição a despeito do HAc a 5% em água, que extraiu menos que os demais solventes, em cultura de laboratório, embora haja controvérsia no resultado encontrado.

Segundo o protocolo de comparação da extração das MC entre o MeOH e HAc, concluiu-se que, no pico 1 do perfil cromatográfico, onde a MC-RR foi caracterizada, o rendimento da extração pelo MeOH foi cerca de 9% maior que o HAc. Apenas uma pequena diferença de extração entre as extrações era esperada, uma vez que o pico 1 estava presente a MC-RR, com 2 grupamentos amina, hidrossolúvel. A extração mais efetiva, realizada pelo MeOH, pode ter ocorrido pelo rompimento celular mais efetivo, com respectiva liberação das toxinas, além do rompimento da mucilagem.

Diferença expressiva ocorreu entre a extração do MeOH e HAc, no pico 2: houve um rendimento 40% maior, com a extração realizada pelo MeOH. Como no pico 2 há variantes mais lipofílicas, como caracterizadas anteriormente, o MeOH extrairia, em maiores teores, as variantes mais lipofílicas.

Um terço das toxinas presentes no pico 2 deixou de ser extraído, em relação ao pico 1 do perfil cromatográfico, na extração pelo HAc. As toxinas com maior hidrossolubilidade seriam extraídas, com rendimento também maior, por efeito dos grupamentos hidrofílicos expostos, em sua cadeia lateral (MC-RR).

Dois por cento. Essa foi a diferença do rendimento entre as toxinas presentes nos picos 1 e 2 do perfil cromatográfico, por meio da extração com o MeOH:H₂O (3:1, v/v), evidenciando ser uma boa opção de solvente extrator, em uma amostra de campo.

5.2 Isolamento das toxinas

5.2.1 Partição líquido-líquido

Segundo RAMANAN, TANG e VELAYUDHAN (2000), experimentos realizados com solventes parcialmente miscíveis com água, como n-butanol e metiletilcetona, resultaram na formação de uma camada intermediária após a partição líquido-líquido e as MC estariam freqüentemente presentes em mais que uma fase, com conseqüente diminuição da eficiência da extração. Contemplaram a distribuição das MC nas fases com consequentes proporções: 7% no butanol, 43% na camada intermediária e 50% na fase aquosa. Sugerem que o hexano seria o solvente mais eficiente em termos de facilidade de separação e remoção de impurezas altamente apolares e que as MC não estariam concentradas e sim dispersas na fase aquosa.

Neste trabalho, houve inicialmente a tentativa de realizar o isolamento das MC utilizando-se as fases descritas por RAMANAN, TANG e VELAYUDHAN (2000). No entanto, observou-se que os solventes sugeridos, com suas respectivas concentrações apresentavam alguns inconvenientes: o n-hexano extraía pigmentos altamente hidrofóbicos, mas não os de polaridade intermediária. Procedeu-se então, um estudo de uma nova condição onde os solventes a serem utilizados não apresentassem três fases, tampouco ampla distribuição das MC em tais fases.

Analisando-se a polaridade, a miscibilidade dos solventes, número de fases formadas e provável distribuição das MC nessas fases segundo a hidrofobicidade de cada MC, chegou-se a conclusão que a utilização dos solventes CHCl_3 :MeOH:H₂O (7:6:3, v:v:v), seria uma boa opção.

O sistema comportou conforme o planejado: houve a formação de 3 fases inicialmente, com o desaparecimento da fase intermediária, em questão de minutos. A fase com maior densidade relativa (CHCl_3) tornou-se esverdeada ao extrair pigmentos de polaridade intermediária e a superior, transparente (FH).

Algumas corridas analíticas por HPLC mostraram que não havia a presença de MC na fase orgânica, apenas na FH, diferentemente da observação dos autores descritos anteriormente.

Ressalta-se que a relação MeOH:H₂O (6:3, v:v), utilizada durante a partição líquido-líquido, representa aproximadamente 70% de MeOH na solução, caracterizando a concentração hidro-alcoólica utilizada na extração “per se” das MC, ou seja, atinge uma ampla faixa de solubilidade das MC. A amostra foi facilmente concentrada por rotavapor e a secagem foi completada por Speed-Vac[®].

5.2.2 Concentração por cartuchos Sep-Pak[®]

O extrato da Cepa 235 foi aplicado em cartuchos SEP-PAK[®] C18, após prévio equilíbrio, utilizando-se H₂O (100%) e MeOH (50%) e MeOH (100%), respectivamente, com a coleta da amostra eluída com MeOH (50%). SHEN *et al.* (2003) realizaram a concentração sem a eluição prévia de H₂O (100%), iniciando o processo diretamente com MeOH (60%) e posteriormente, MeOH (100%).

HUMMERT *et al.* (2001) realizaram o *clean up* da amostra submetendo-a a uma SPE com acondicionamento do cartucho C18 por MeOH (5 mL) e H₂O contendo 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e em seguida, eluição com água contendo 0,05% de TFA (5 mL) e logo após, uma mistura de água contendo 0,05% de TFA e metanol (60:40, v:v, 5 mL). Após evaporação sob fluxo de nitrogênio, a ressuspensão foi realizada com H₂O / MeOH (200 mL, 1:1; v:v).

A SPE C18 permite a concentração das MC presentes em extrato aquoso de *Microcystis* e contribui com a desproteinização da amostra e polipeptídeos acima de 15.000 Da (MERILUOTO, 1997).

5.2.3 Isolamento das toxinas: cartucho Sep- Pak®

Após a extração, havia a possibilidade de uma pré-purificação por extração em fase sólida (SPE) utilizando-se um cartucho pré-condicionado Sep-Pak® C18 (0,5 g) ou LLE. Realizou-se a pré-purificação por LLE na amostra de campo e SPE, para a cultura de algas (cepa BCCUSP 235), utilizando-se o cartucho Sep-Pak® C18.

A maioria dos pesquisadores opta pela extração em cartucho C18 por promover o isolamento das toxinas e simultaneamente, concentrá-las. No entanto, quando a amostra é de campo a concentração de impurezas é elevada, levando ao uso de grandes quantidades do cartucho (dispendiosos) e o espectro dos interferentes é considerável, algumas vezes saturando os cartuchos.

SIREN *et al.* (1999) empregam o cartucho C18 para a remoção do tampão utilizado na análise (acetato de amônio) mostrando mais uma aplicação para o cartucho. Nas análises realizadas pelo presente estudo, verificou-se que o tampão fosfato não foi devidamente removido pelos respectivos cartuchos, suprimindo os sinais das MC durante a análise por espectrometria de massas, sendo necessária a re-purificação por HPLC, que mostrou-se bastante eficiente.

5.3 Purificação das MC por HPLC

Os métodos analíticos capazes de separar as toxinas e permitir a identificação individual são contemplados apenas pela cromatografia e eletroforese capilar, onde a fase estacionária do HPLC é representada por coluna de fase reversa C18, que é a escolha típica para a separação de inúmeros peptídeos pequenos. Normalmente envolve o uso de fase móvel com gradiente, consistindo de ACN e H₂O (MERILUOTO, 1997).

5.3.1 Condição cromatográfica: fase móvel e eluição por gradiente x isocrática

A fase aquosa consistiu de um tampão utilizado para aumentar a resolução do cromatograma, promover a eluição das MC mais polares e evitar o efeito de cauda dos picos pela protonação de grupos funcionais expostos, como as que apresentam o peptídeo arginina - a MC-RR e a MC-LR - que possuem 2 e 1 argininas, respectivamente, que se protonam em meio ácido.

Uma das primeiras preocupações em relação à fase móvel aquosa foi a de preparar um tampão que não apresentasse uma elevada molaridade, para que não houvesse precipitação da fase nas linhas do HPLC e em relação à possibilidade de haver contaminação fúngica no sistema. Para evitar tal contaminação, houve o cuidado especial de manter a garrafa do solvente em questão sob constante refrigeração, quando não estava em uso.

É importante que a fase móvel aquosa esteja com pH 3, para possibilitar a protonação dos peptídeos e evitar o efeito de calda dos picos. Para a correção do pH, utilizou-se um medidor de pH, cuja calibração se fez necessária.

MERILUOTO (1997) relata que as eluições por gradiente apresentam superior poder de resolução, mas muitos pesquisadores ainda prestigiam a eluição isocrática, devido sua simplicidade e menor tendência de erro instrumental. Relata-se ainda que a separação das MC em pH neutro pode ser difícil por eluição isocrática, utilizando o HPLC com fase reversa ou fases estacionárias alternativas.

IKAWA *et al.* (1999) utilizaram MeOH como fase orgânica e tampão fosfato (PBS) 0,05 M, pH 3 na fase aquosa. Esta última condição foi utilizada inicialmente neste trabalho. Não obstante, não havia a separação adequada dos picos cromatográficos e o MeOH foi então substituído pela ACN, numa corrida por gradiente.

Seguindo o modelo da extração das MC, não há unanimidade entre os pesquisadores no que tange os solventes empregados nas fases móveis. EDWARDS *et al.* (1996) realizaram a purificação das MC utilizando a água e ACN, ambas contendo 0,1% de TFA com gradiente, cuja condição inicial era de 30% de fase aquosa, atingindo 65% em 25 min. O presente trabalho analisou a amostra segundo este protocolo, mas o método não foi reprodutivo e não houve uma adequada separação dos picos.

SHEN *et al.* (2003) utilizaram como fase móvel MeOH e H₂O com TFA (0,05%) com corrida isocrática (6:4). AGUETE *et al.* (2003) utilizaram como fase móvel a H₂O contendo 0,05% (v:v) de TFA e ACN, também contendo 0,05% (v:v) de TFA, com gradiente linear inicial de 10% de H₂O. GAGO-MARTÍNEZ *et al.* (2003) realizaram uma eluição isocrática com fase móvel consistindo de ACN e H₂O com ácido fórmico (pH entre 2 e 3). A utilização do TFA por inúmeros pesquisadores refere-se ao fato de manter o pH do meio baixo, com protonação constante da molécula e também pelo fato dele atuar como par iônico, aumentando o tempo de retenção de variantes mais polares. No entanto, o presente trabalho não observou este comportamento, após ter realizado análises com o TFA para verificar se o mesmo atuaria como par iônico e a corrida por gradiente com tampão fosfato 0,05 M, pH 3, com ACN, foi a condição com melhores resultados.

5.3.2 Condição cromatográfica: detecção ultra-violeta

A monitorização das MC ocorre pela sua absorção máxima de radiação e pela característica de seu espectro. O dieno conjugado do resíduo Adda é considerado o principal agente cromóforo das MC. LAWTON e EDWARDS (2001) dividiram o espectro UV das MC em uma categoria que apresentam típico espectro de absorção, a 238 nm e espectros de absorção de variantes que contém triptofano, com máximo comprimento de onda em 222 nm.

Normalmente as MC são monitoradas a 238 nm, embora também possam ser usados 214 nm ou 206 nm.

Assim, deve-se evitar a monitorização das MC por HPLC com detector UV com comprimento de onda fixo, com finalidade de *screening*. Até mesmo os resultados do PDA devem ser examinados criteriosamente, uma vez que as matrizes tendem a dificultar a análise e pode ocorrer a co-eluição dos compostos análogos das MC (MERILUOTO, 1997). O detector UV foi utilizado no presente experimento, mas o PDA foi mais amplamente empregado, para a comparação dos espectros adquiridos durante a análise.

Os perfis cromatográficos das MC apresentam grande similaridade, normalmente relacionadas a pequenas alterações das caldas (anterior e posterior à absorção máxima), mas preservam o aspecto geral, com rápido decréscimo de absorção.

5.4 Co-eluição das MC

No pico 2 do perfil cromatográfico da FH, observou-se que houve a co-eluição de MC, embora tenha havido a tentativa de separá-los por alterações da fase móvel, que inicialmente era constituída de MeOH e H₂O (tamponada) e, posteriormente, houve a alteração da mesma para ACN e H₂O (tamponada).

O tipo de corrida analítica também foi alterado, uma vez que inicialmente era isocrática e posteriormente, por gradiente. Houve uma melhora acentuada na separação das MC, embora ainda pôde-se constatar a co-eluição das mesmas.

RAPALA *et al.* (2002) estudaram a eficiência das colunas analíticas na separação das MC e obtiveram resultados que apresentam bastante similaridade com os resultados alcançados pelo presente trabalho no que tange a co-eluição das mesmas: ao utilizar a coluna Hypersil ODS, houve a co-eluição das MC-RR e [Dha⁷]MC-RR – ao analisarem separadamente, houve uma diferença do tempo de retenção de aproximadamente 0,5 min. A MC-LR, suas

variantes desmetiladas, bem como a MC-RR, [D-Asp³]MC-RR e MC-YR co-eluíram pela análise realizada utilizando-se a coluna Zorbax®.

5.5 Caracterização das MC por espectrometria de massas

Os resultados da purificação das MC por LC/UV foram analisados por ESI/MS, ou seja, os picos da cromatografia líquida coletados, com absorção máxima em 238 nm, foram caracterizados por espectrometria de massas. Os espectros foram adquiridos em *full scan*, modo positivo, com intervalo de relação m/z variável, mas que no total contemplou a faixa de 100 a 1250 m/z , *range* pela qual as MC podem estar presentes.

Houve em determinadas análises uma relação sinal/ruído muito baixa, ou seja, os interferentes prejudicaram a aquisição. Em uma das circunstâncias, constatou-se que o interferente era o PBS, sugerindo uma melhor purificação da amostra. Até este momento, a remoção do PBS era realizada pelo cartucho Sep-Pak® que, além de saturar fácil e rapidamente em amostras de campo, não conseguia retirar completamente o sal utilizado no tampão. Assim, passou-se a ser realizada uma re-purificação, por meio da CL, corrida isocrática com MeOH:H₂O (3:1; v/v; 12 minutos).

O trabalho com materiais plásticos tornou-se absolutamente restrito quando dados adquiridos por MS apresentavam interferentes (44 Da) com um padrão de fragmentação característico, sugerindo contaminação por polímeros. Por essa razão, passou-se a utilizar apenas materiais de vidro, quando possível.

Durante o *scan* do pico 1 da FH, observaram-se fragmentos típicos de MC: o íon com relação m/z de 135 estava presente e correspondem ao fragmento típico de MC resultantes da α -clivagem do grupo metoxi do Adda, aminoácido incomum, presente nas MC (HUMMERT *et al.*, 2001).

Para estabelecer a identidade estrutural dos peptídeos, foram gerados íons $[M+H]^+$ de m/z 1038,7, 1066,7, 1045,3 e 995,3 para as amostras de campo (Figuras 14, 16, 19 e 21, respectivamente). A região de massa baixa ($m/z < 200$) de tais espectros MS/MS, frequentemente contém íons que são indicativos da presença de resíduos de aminoácidos, nos peptídeos.

Os íons imonium $(H_2N CHR)^+$, onde o “R” representa o grupo da cadeia lateral, advém da fragmentação de duas ligações internas. As regiões de massas baixas da Figura 14 contêm íons de m/z 112, sugerindo a presença de resíduos de arginina para o peptídeo “X” ou “Z”, da estrutura da MC. A Figura 19 contém íons com m/z 70, 112 e 136, sugerindo a presença de arginina e tirosina.

Todos os espectros apresentam um íon com m/z 135, atribuído ao fragmento $[C_9H_{11}O]^+$ do resíduo Adda. Um mecanismo proposto para explicar a formação da m/z 135 é a clivagem heterolítica da ligação C8-C9 do resíduo Adda, da MC. O íon de m/z 135 é um importante diagnóstico, uma vez que geralmente está presente na microcistina com resíduos Adda, não modificados.

No espectro de massas *Tandem* do peptídeo com m/z 1038, foram observados na faixa de massa alta, intensos picos gerados pela perda da amônia (m/z 1021) e de guanidina $(NH_2)_2C=NH$ (m/z 997) (Figura 14), corroborando com a presença do aminoácido arginina.

O espectro do íon produto do peptídeo representado na Figura 16, co-eluído com a MC-RR, também apresenta intensos íons fragmentos produzidos pela perda da amônia (m/z 1049) e pela perda do grupamento guanidina (1008). A diferença entre esses íons fragmentos e os íons fragmentos presentes no espectro de MC-RR é de 28 u.m.a. Baseado nestes resultados e nos íons fragmentos listados na Tabela 6, concluímos que o peptídeo da Figura 16 corresponde a MC-hRhR, descrita aqui, pela primeira vez.

O espectro dos íons produtos 5a (Figura 21) mostra a presença de m/z 86 e 112 como íons imonium. Esses valores de m/z indicam a presença de leucina e arginina. Este resultado foi corroborado pela massa molecular de 995

Da. A posição da Leu e Arg foram determinadas pela presença de alguns íons diagnósticos, como $m/z = 268$ [HMdha-DAla-L-Leu⁺], mostrando que a leucina está ligada ao resíduo da Ala e $m/z 599,3$ [HL-Arg-Adda-D-Glu⁺], mostrando que o resíduo Arg está ligado ao resíduo Adda. A Tabela 8 mostra alguns íons fragmentos presentes no espectro massas *Tandem*, na MC-LR.

Ao analisar os íons do espectro do peptídeo da Figura 19, é possível observar a presença da $m/z 135$ como fragmento do resíduo Adda (indicando um peptídeo de MC). O íon imonium de $m/z 112$ e 136 sugere a presença de Arg e Tyr. Como sugerido pelo peso molecular (1044 Da) e comportamento cromatográfico, presumimos que possa ser a MC-YR.

A posição da Arg e Tyr foi sugerida em função da $m/z 811$ produzida pela perda do fragmento Ala-Tyr, $m/z 682$, pela perda do fragmento Ala-Tyr-Asp pelo íon molecular indicando que o resíduo Tyr está localizado entre os aminoácidos Ala e Asp.

O íon com $m/z 761$, obtido com a perda de um fragmento Asp-Arg e o íon com $m/z 448$, resultante da perda do fragmento Asp-Arg-Adda do íon molecular, indicam que o resíduo Arg situa-se entre os resíduos Asp e Adda. Outros fragmentos do espectro da MC-YR são mostrados na Tabela 7.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A extração hidro-alcoólica na proporção utilizada demonstrou boa resposta para a obtenção de toxinas em teores necessários para a análise físico-química, possibilitando a extração de heptapeptídeos diferentes, sem promover a extração de impurezas extremamente polares ou apolares.
- ✓ A purificação das amostras por SPE ou LLE confere mitigação de impurezas. A LLE demonstrou eficiência na amostra de campo e pode ser empregada quando a análise é realizada com grandes quantidades de impurezas.
- ✓ Análises dos picos coletados no HPLC, por MS, possibilitou a caracterização das MC-RR e MC-hRhR do pico 1 e MC-YR e MC-LR do pico 2, bem como a massa do peptídeo incomum - Adda - de 135 m/z, característico das MC que confirmou a presença das referidas toxinas no Reservatório Billings e denota ser importante ferramenta na determinação dos metabólitos secundários das cianobactérias.
- ✓ O método de extração e purificação apresentado nesse trabalho pode ser utilizado para a obtenção de MC em grande quantidade para fins de padronização, testes toxicológicos e validação de métodos analíticos.
- ✓ Pela primeira vez na literatura, a MC-hRhR parece ser relatada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUETE, E.C.; GAGO-MATÍNEZ, A.; LEÃO, J.M.; RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, J.A.; MEN'ARD, C.; LAWRENCE, J.F. **HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction.** Talanta. Amsterdam, v.59, p.697-705, 2003.
- ARANDA-RODRIGUEZ, R; KUBWABO, C.; BENOIT, F.M. **Extracton of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns.** Toxicon. Amsterdam, v.42, p.587-599, 2003.
- AVERSANO, C.D., EAGLESHAM, G.K., QUILLIAM, M.A. **Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry.** J. Chromatogr., A. Amsterdam, v.1028, p.155-164, 2004.
- BARCO, M.; RIVERA, J.; CAIXACH, J. **Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectroscopy.** J. Chromatogr. Amsterdam, v.959, n.103-111, 2002.
- BEATTIE, K.A.; KAYA, K.; SANO, T.; CODD, G.A. **Three Dehydrobutyrine-containing microcystins from Nostoc.** Phytochemistry. Amsterdam, v.47, n.7, p.1289-1292, 1998.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA-, M.C. **Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker.** Harmful Algae. Amsterdam, v.3, p.51-60, 2003.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; KUJBIDA, P.; CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; MOURA, A.N.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. **A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al.** BBRC. Amsterdam, n.326, p.687-694, 2005.

- BOUAÏACHA, N.; MAATOUK, I. **Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reative oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes.** Toxicol. Lett. v.148, p.53-63, 2003.
- CARVALHO, V.M. **Adutos de DNA gerados por produtos da lipoperoxidação: Caracterização, detecção, incorporação e, oloigonucleotídeos e implicações biológicas.** Tese de doutoramento IQUSP, São Paulo, 2001.
- CODD, G.A.; METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A. **Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigaton with water containing cyanobacteria.** Toxicon. Amsterdam, v.37, p.1181-1185, 1999.
- DAWSON, R. M.; **The toxicology of microcystins.** Toxicon. Amsterdam, v.36, p953, 1998.
- DING, W.; ONG, C.N. **Role of oxidative stresse and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity.** FEMS Microbiol. Lett. Amsterdam, v.220, p.1-7, 2003.
- EDWARDS, C.; LAWTON, L.A.; COYLE, S.M.; ROSS, P. **Laboratory-scale purification of microcystins using flash chromatography and reverser-phase high-performance liquid chromatography.** J. Chromatogr., A. Amsterdam, v.734, p.163-173, 1996.
- FASTNER, J.; FLIEGER, I.; NEUMANN, U. **Optimised extraction of microcystins from fiel samples - a comparison of different solvents and procedures.** Water Res. Amsterdam, v.32, n.10, p. 3177-3181, 1998.
- FIGUEIREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. **Microcystin-producing blooms - a serious global public health issue.** Ecotoxicol. and Environ. Saf. New York, n.59, p.151-163, 2004.
- GAGO-MARTÍNEZ, A.; PIÑEIRO, N.; AGUETE, E.C.; VAQUERO, E.; NOGUEIRAS, M.; LEÃO, J.M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J.A.; DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.

- Further improvements in the application of high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and capillary electrochromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environmental.** *J. Chromatogr., A.* Amsterdam, v.992, p.159-168, 2003.
- GEHRINGER, M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWING, T.G.; WIEGAND, C.; NEILAN, B.A. **An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice.** *IJBCB.* Amsterdam, n.36, p.931-941, 2004.
- HARADA, K.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI, M.; KONDO, F. **Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria.** *Toxicon.* Amsterdam, v.34, n.6, p.701-710, 1996.
- HOEGER, S.J.; SHAW, G.; HITZFELD, B.C.; DIETRICH, D.R. **Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants.** *Toxicon.* Amsterdam, v.43, p.639-649, 2004.
- HORNE, A.J.; GOLDMAN, C.R. **Limnology.** 2.ed. Singapore: McGraw-Hill, 1994.
- HUMMERT, C.; REICHELT, M.; WEIB, J.; LIEBERT, H.; LUCKAS, B. **Identification of microcystins in cyanobacteria from the Bleiloch former drinking-water reservoir (Thuringia, Germany).** *Chemosphere.* Amsterdam, v.44, p.1581-1588, 2001.
- IMANISHI, S.; HARADA, K. **Proteomics approach on microcystin binding proteins in mouse liver for investigation of microcystin toxicity.** *Toxicon.* Amsterdam, v.43, p.651-659, 2004.
- IKAWA, M.; PHILLIPS, N.; HANEY, J.F.; SASNER, J.J. **Interference by plastics additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR.** *Toxicon.* Amsterdam, v. 37, p.923-929, 1999.
- KAYA, K.; TOMOHARU, S.; INOUE, H.; TAKAGI, H. **Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS.** *Anal. Chim. Acta.* Amsterdam, v.450, p.73-80, 2001.

- KRIENITZ, L.; BALLOT, A.; KOTUT, K.; WIEGAND, C.; PÜTZ, S.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; PFLUGMACHER, S. **Contribution of ot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya.** *FEMS Microb. Ecol.* Amsterdam, n. 43, p. 141-148, 2003.
- LAWRENCE, J.F.; MENARD, C. **Determination of microcystin in blue-green algae, fish and water using chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography.** *J. Chromatogr., A.* Amsterdam, v.922, p.111-117, 2001.
- LAWTON, L.A.; EDWARDS, C. **Purification of microcystins.** *J. Chromatogr.* Amsterdam, v.912, p.191-209, 2001.
- MAATOUK, I.; MOUAÏCHA, N.; FONTAN, D.; LEVI, Y. **Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant.** *Water. Res.* Amsterdam, v.36, p.2891-2897, 2002.
- MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K.A.; YUNES, J.S.; KAYA, K.; CODD, G.A. **[D-Leu1]Microcystin-LR, from the cyanobacterium Microcystis RST 9501 and from a Microcystis bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil.** *Phytochemistry.* Amsterdam, v.55, p.383-387, 2000.
- MERILUOTO, J. **Chromatography of microcystins.** *Anal. Chim. Acta.* Amsterdam, v. 352, p.277-298, 1997.
- MILUTINOVIC, A.; ZIVIN, M.; ZORC-PLESKOVIC, R.; SEDMAK, B.; SUPUT, D. **Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR.** *FEMS Microbiol. Lett.* Amsterdam, n.42, p.281-288, 2003.
- MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. **Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas.** *Química Nova.* São Paulo, vol 26, n.4, 556-566, 2003.
- ORR, P.T.; JONES, G.J.; HUNTER, R.A.; BERGER, K. **Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation,**

- physiological effects and human health risk assessment.** *Toxicon*. Amsterdam, v.41, p.613-620, 2003.
- ORR, P.T.; JONES, G.J.; HUNTER, R.A.; BERGER, K.; PAOLI, D.A.; ORR, C.L.A. **Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk.** *Toxicon*. Amsterdam, v.39, p.1847-1854, 2001.
- LOUDRA, B.; LOUDIKI, M.; SBIYYAA, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V.; NAMIKOSHI, N. **Isolation, characterization and quantifications of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takeroust lake - reservoir (Morocco).** *Toxicon*. Amsterdam, v.39, p.1375-1381, 2001.
- PARK, H.; NAAMIKOSHI, M.; BRITTAIN, S.M.; CARMICHAEL, W.W.; MURPHY, T. **[D-Leu] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake.** *Toxicon*. Amsterdam, v.39, p.855-862, 2000.
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A.; STEINBERG, C.E.W. **Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication.** *Biochem. and Biophys.* Amsterdam, n. 1425, p.527-533, 1998.
- RAMANAN, S.; TANG, J.; VELAYUDHAN, A. **Isolation and preparative purification of microcystins variants.** *J Chromatogr., A*. Amsterdam, v.883, p.103-112, 2000.
- RAPALA, J.; ERKOMAA, K.; KUKKONEN, J.; SIVONEN, K.; LAHTI. **Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay Comparison of methods.** *Anal. Chim. Acta*,. Amsterdam, v.466, p.213-231, 2002.
- REYNALDS, C.S. **The ecology of freshwater phytoplankton.** Great Britain: Cambridge University Press, p.183-185. 1990.

- RIVASSEAU, C.; MARTINS, S.; HENNION, M. **Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using chromatography.** J. Chromatogr., A. Amsterdam, v.799, p.155-169, 1998.
- RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KAPLOWITZ, N. **Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of cheoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters.** Toxicol. and Appl. Pharmacol. New York, v. 134, p.264-272, 1995.
- RUDOLPH-BÖHNER, S.; MIERKE, D.F.; MORODER, L. **Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins.** FEBS Lett. n.349, p.319-323, 1994.
- RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KONG, S.; LEE, E.Y.C.; ZHANG, L. ***In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A.** Biochem. and Biophys. Res. Commun. Orlando, v.216, n.1, p.162-169, 1995.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D.R.; NAEGELI, H. **Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (ble-green algae) hepatotoxins in fish.** Toxicology. Amsterdam, v.106, p.123-130, 1995.
- SAITO, K.; ISHII, H.; NISHIDA, F.; SAITO, H.; ABE, T.; TOYOTA, Y. **Purification of microcystin by DEAE and C18 cartridge chromatography.** Toxicon. Amsterdam, v.40, p.97-101, 2001.
- SHEN, P. P.; SHI, Q.; HUA, Z. C.; KONG, F. X.; WANG, Z. G.; ZHUANG, S. X.; CHEN, D. C. **Analisis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Laka, China.** Environ. Internation. Amsterdam, v. 29, p. 641-647, 2003.
- SIRÉN, H.; JUSSILA, M.; LIU, H.; PELTONIEMI, S.; SIVONEN, K.; RIEKKOLA, M. **Separation, purity testing and edentification of cyanobacterial hepatotoxins with capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry.** J. Chromatogr., A. Amsterdam, v.839, p.203-215, 1999.

- SPOOF, L.; K, KRISTER; MERILUOTO, J. **High-performace liquid chromatography separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptides toxins, on C18 and amide C16 sorbentes.** J. Chromatogr. Amsterdam, v.909, p.225-236, 2001.
- SPOOF, L.; MERILUOTO, J. **Rapid separation of microcystins and nodularin using a monolithic silica C18 column.** J. Chromatogr. Amsterdam, n.947, p. 237-245, 2002.
- SPOOF, L.; VESTERKVIST, P.; LINDHOLM, T.; MERILUOTO, J. **Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples byreverser-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry.** J. Chromatogr., A. Amsterdam, v.1020, p.105-119, 2003.
- TAKENADA, S.; TANAKA, Y. **Behavior of microcystins and its decomposition product in water treatment process.** Chemosphere. Amsterdam, v.31, n.7, p.3635-3641, 1995.
- TOIVOLA, D.M.; ERIKSSON, J.E.; BRAUTIGAN, D.L.; **Identification of protein phosphatase 2A as the primary target fot microcystins-LR in rat liver homogenates.** FEBS Lett. v.344; p.175-180, 1994.
- TSUJI, M.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; WATANABE, M.F.; NAKAZAKA, H.; SUZUKI, M.; UCHIDA, H.; HARADA, K. **Stability of microcystins from cyanobacteria -IV. Effect of chlorination on decomposition.** Toxicon. Amsterdam, v.15, n.7, 1033-1041, 1997.
- VESTERKVIST, P.S.M.; MERILUOTO, J.A.O. **Interaction between microcystins of different hydriphobicities and lipid monolayers.** Toxicon. Amsterdam, n.41, p.349-355, 2002.
- WETZEL, R.W. **Limnologia.** Saunders. Lisboa: Fundação Caluste Gulbenkian, 1993. 679p.

- ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A.; CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.C.R. **Manual de Orientações em Casos de Florações de Algas Tóxicas: um Problema Ambiental e de Saúde Pública**. São Paulo: CETESB, p.9-19, 1997.
- ZAMBRANO, F; CANELO, E. **Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺-K⁺pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio linneo*)**. *Toxicon*. Amsterdam, v.34, n.4, p.451-458, 1996.
- ZECK, A.; EIKENBERG, A.; WELLER, M.G.; NIESSNER, R. **Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins**. *Anal. Chim. Acta*. Amsterdam, n.441, p.1-13, 2001.