

Novo Método de Preparo de Amostra para a Análise de Microcistinas por MALDI-TOF-MS

Talitta C. Duarte Barbosa (IC) e Humberto M. S Milagre (PQ)*

hmilagre@rc.unesp.br

Laboratório Hooke de Espectrometria de Massas, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Rio Claro, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP.

Palavras Chave: Microcistinas, MALDI-TOF, Cianobactéria

Introdução

As Microcistinas (MCs) são heptapeptídeos cíclicos e hepatotóxicos produzidos durante as florações de cianobactérias. Devido à elevada toxicidade dessas cianotoxinas, torna-se importante sua detecção, identificação e caracterização em águas de abastecimento e de recreação.

Atualmente a técnica MALDI-TOF-MS tem se mostrado uma eficiente ferramenta para a análise de MCs e um dos principais fatores que afeta a resolução e sensibilidade desta técnica é o preparo de amostra. O objetivo deste trabalho é desenvolver um método mais eficiente para a análise de MCs por MALDI-TOF-MS.

Resultados e Discussão

A primeira etapa do trabalho consistiu na análise do padrão comercial da microcistina-LR (MC-LR) por 10 métodos clássicos de preparo de amostras para MALDI-TOF-MS em comparação com um novo método desenvolvido em nosso laboratório (método Hooke). Em todas as análises foi utilizado como matriz o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (4-HCCA). Os métodos foram avaliados em relação à qualidade da cristalização da matriz e resolução do espectro. A **Figura 1** apresenta os melhores resultados deste estudo.

Comparando-se os espectros da **Figura 1** é possível verificar que enquanto nos outros métodos de preparo de amostra há presença de interferentes (íons m/z 885, 861 e 877) no método Hooke o espectro é bem mais limpo contendo apenas o sinal do íon m/z 995 relativo ao íon $[M + H]^+$ da MC-LR. Em relação ao limite de detecção, no método Hooke é possível detectar a presença de MC-LR na concentração de 30 nM enquanto nos demais este limite é de 100 nM.

O método Hooke consiste em aplicar 1 μ L da amostra (padrão de MC-LR) sobre a placa de MALDI, secá-la à vácuo e, em seguida, aplicar 1 μ L da solução saturada de matriz (4-HCCA) sobre a amostra seguida de secagem à vácuo.

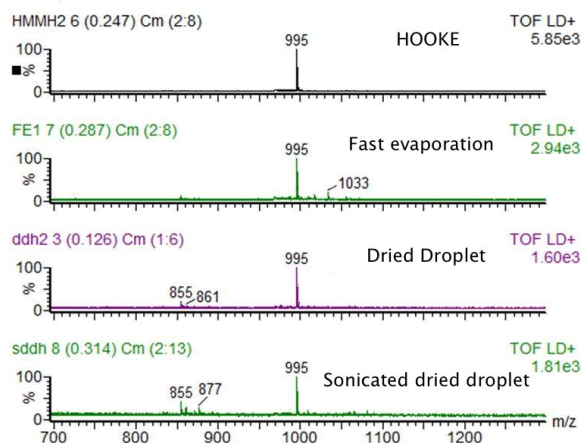


Figura 1. Espectros de MALDI-TOF-MS, no modo positivo, da MC-LR obtidos através dos 4 melhores métodos de preparo de amostra.

Diferentes solventes para o preparo da matriz foram avaliados para o método Hooke. Os melhores resultados foram obtidos com uma solução de Acetonitrila : H₂O : ácido trifluoroacético 7 : 2,9 : 0,1. Outras 3 matrizes, ácido genticóico, ácido sinapínico e ácido ferúlico, ainda foram testadas, porém nenhuma delas superou o desempenho da matriz 4-HCCA.

A utilização do método Hooke foi empregada na análise de outros 6 diferentes padrões de microcistinas: LA, LR, LY, LF, LW, RR e YR. Em todos os casos a sensibilidade e resolução do método Hooke se manteve superior aos demais métodos avaliados.

Conclusões

O método Hooke de preparo de amostra para a detecção e identificação de Microcistinas por MALDI-TOF-MS se mostrou eficiente e superior aos métodos descritos na literatura.

Agradecimentos

PROPe – UNESP, FAPESP, CNPq.

¹ Cañas, B.; Piñeiro, C.; Calvo, E.; López-Ferrer, D.; Gallardo, J. M. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1153, 235.