

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM) NA DETERMINAÇÃO DE MICROCISTINA- LR

Maria Virgínia da Conceição Albuquerque¹

Kely Dayane Silva do Ó²

José Tavares de Sousa³

Catarina Simone Andrade do Canto⁴

Wilton Silva Lopes⁵

RESUMO

Existem diversos métodos analíticos utilizados para detectar e quantificar cianotoxinas dissolvidas (fração extracelular) na água e em células de cianobactérias (fração intracelular). Esses métodos podem variar quanto ao nível de sofisticação, bem como ao grau de informações que eles fornecem. Métodos relativamente simples e com baixo custo podem ser usados para avaliar rapidamente o risco potencial da presença dessas toxinas em água e permitir a agilidade na tomada de decisões. Por outro lado, técnicas analíticas podem ser aplicadas para determinar com maior precisão, o tipo e a quantidade desse microcontaminante. Este estudo faz uma avaliação do método analítico de determinação de MC-LR por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), classificando os principais parâmetros normalmente utilizados para métodos quantitativos. Concluiu-se que os testes cromatográficos são eficientes na separação e quantificação da toxina em amostras de águas. Por se tratar de um método analítico, estes testes devem ser validados para serem aprovados e registrados na Secretaria de Vigilância da Saúde. Os parâmetros normalmente utilizados para a validação de métodos quantitativos são: especificidade ou seletividade, linearidade, intervalo, precisão, repetitividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, robustez, recuperação e incerteza de medição. Dependendo do propósito do método, alguns dos parâmetros apresentados podem deixar de ser avaliados. Todavia, a exatidão e a precisão do método constituem parâmetros indispensáveis, independente do seu propósito, exceto para métodos com objetivo apenas qualitativo.

Palavras-chave: Validação de método, CLAE-EM, Cianotoxina.

INTRODUÇÃO

Existem diversos métodos analíticos utilizados para detectar e quantificar cianotoxinas dissolvidas (fração extracelular) na água e em células de cianobactérias (fração intracelular).

¹ Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, virginia.albuquerque@yahoo.com.br;

² Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, kely.dayane@hotmail.com;

³ Prof. Dr. em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, tavaresuepb@hotmail.com;

⁴ Dra. em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, csacanto@hotmail.com;

⁵ Prof. Dr. em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, wiltonuepb@gmail.com.

Esses métodos podem variar quanto ao nível de sofisticação, bem como ao grau de informações que eles fornecem. Métodos relativamente simples e com baixo custo podem ser usados para avaliar rapidamente o risco potencial da presença dessas toxinas em água e permitir a agilidade na tomada de decisões. Por outro lado, técnicas analíticas sofisticadas podem ser aplicadas para determinar com maior precisão, o tipo e a quantidade dessas substâncias. Contudo, tanto as técnicas, quanto as metodologias podem ser selecionadas dependendo dos equipamentos e do grau de especificidade e do tipo de informação requerida.

As principais metodologias de detecção e quantificação de microcistinas em amostras de água dividem-se em físico-químicas (CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), bioquímicas (ensaio de inibição da fosfatase, ELISA, biologia molecular) ou biológicas (bioensaios, testes de toxicidade) (MCELHINEY E LAWTON, 2005). Os testes cromatográficos constituem um método analítico de referência nas análises de microcistinas, eficiente na separação e quantificação dessas toxinas em amostras de águas. Sobretudo, por se tratar de um método analítico, os testes cromatográficos necessitam ser validados para serem aprovados e registrados na Secretaria de Vigilância da Saúde (BRASIL, 2006).

Este estudo faz uma avaliação do método analítico de determinação de microcistina-LR por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM), classificando os principais parâmetros normalmente utilizados para métodos quantitativos.

METODOLOGIA

No presente estudo, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre validação de método analítico para detecção e quantificação de microcistina-LR por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Para tanto, foram utilizados como recursos: artigos, dissertações e teses científicas com abordagem do tema em estudo. Considerando como os bancos de dados a plataforma SciELO (Scientific Electronic Library Online) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

DESENVOLVIMENTO

Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

O botânico russo Michail Semenovich Tswett foi o descobridor da cromatografia no início do século XX. Usou uma coluna de carbonato de cálcio para separar pigmentos de folhas arrastando-os com um solvente e separando-os numa série de bandas coloridas. Denominou-se assim o termo cromatografia (do grego kroma+graphia, o registro da cor). Depois de Tswett, muitos cientistas fizeram substanciais contribuições para o avanço da teoria e da prática da cromatografia e estima-se que atualmente cerca de 60% das análises feitas no mundo envolvem a cromatografia (DEGANI et al., 1997).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem se destacado nos últimos anos devido à alta sensibilidade de separação dos componentes do analito. Os métodos de separação por cromatografia em coluna, implicam em interações físico-químicas entre os compostos presentes na amostra e a fase estacionária da coluna cromatográfica, e sua aplicação permite a análise qualitativa ou quantitativa de vários microcontaminantes de interesse ambiental. A cromatografia em coluna, permite separar constituintes de uma mistura através de sua distribuição em duas fases: uma estacionária (fixa na coluna cromatográfica) e outra móvel (OEHRLE et al., 2010).

Sendo uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para determinação de compostos orgânicos, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM) permite que compostos pré-separados sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade e sensibilidade. Os compostos eletricamente carregados, ou íons, são selecionados e medidos de acordo com a razão massa/carga (m/z), resultados estes da ação de campos elétricos ou magnéticos gerados na região do analisador do equipamento que, comumente, pode estar disposto em diferentes configurações. Um espectrômetro de massas é constituído de unidades fundamentais como: uma fonte de ionização, na qual são gerados os íons na fase gasosa, um analisador e um detector (INMETRO, 2016).

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10- 25 cm e preparativas em torno de 25- 30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (COLLINS et al, 1997).

Nas análises de microcistinas é comum o uso de colunas de fase reversa C18, com separação realizada pelo gradiente de hidrofobicidade. Este gradiente abrange diferentes polaridades, permitindo a análise de todas as variantes de microcistinas. A identificação pode ser realizada por um detector ultravioleta combinado (CLAE/UV), ou por uma análise sequencial em espectrometria de massa (CLAE/EM). A espectrometria de massas (MS) é atualmente uma das técnicas analíticas mais versáteis e sensíveis, com aplicação em diversas áreas e estudos. A análise consiste na geração de íons através de uma fonte de ionização. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (WELKER et al., 2002).

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

Embora a análise de toxinas por CLAE seja capaz de fornecer informações precisas e específicas sobre a identidade e a quantidade de cada variante de microcistina, na ordem de nanogramas, o método requer elevado custo, instrumentação e pessoal especializado, cuidados na preparação da amostra e a comparação com padrões da toxina (LI et al., 2014)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Deteção e quantificação de MC-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

Grande parte dos estudos que quantificam a cianotoxina microcistina-LR por CLAE tem recorrido a Extração em Fase Sólida (EFS) como etapa de preparo de amostras, especialmente

em amostras com matrizes complexas. Na Tabela 1 apresenta as metodologias de EFS utilizadas para preparo de amostra de microcistina-LR.

Tabela 1. Metodologias de EFS utilizadas para preparo de amostra de microcistina-LR

Preparo de Amostra por Método de Extração em Fase Sólida (EFS)					
Cartucho	Condicionamento	Vazão da Amostra (mL.min ⁻¹)	Clean up	Efluente	Autor
C18	10 mL MeOH + 10 mL MeOH 20%	1	MeOH: H ₂ O (10:90)	MeOH, clorofórmio e hexano	Ramanan, et al., (2000)
HLB	MeOH em Ácido Acético (0,1 M)	-	MeOH: H ₂ O (30:70) em Ácido Acético (0,1 M)	MeOH	Yuan, et al., (2006)
C18	10 mL MeOH + 10 mL H ₂ O	< 10	-	MeOH	Reilly e Codd (2007)
C18	10 mL ACN + 10 mL H ₂ O	5	H ₂ O	ACN	Momani et al. (2008)
C18	10 mL MeOH + 10 mL H ₂ O	5	MeOH: H ₂ O (90:10) em 0,1% TFA	MeOH	Mekebri et al. (2009)
HLB	10 mL MeOH 10% + 10 mL MeOH 20%	5	MeOH: H ₂ O (10:90) + MeOH: H ₂ O (20:80)	MeOH (80%)	Miao et al. (2010)
C18	10 mL MeOH	-	MeOH: H ₂ O (20:80)	MeOH	Pinho (2014)

Fonte: Autor, 2019.

Quando se necessita da confirmação e identificação da cianotoxina analisada, um método muito utilizado e sofisticado como o CLAE (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas) pode ser empregado. Este método provê a melhor solução para identificação, pois usa como ferramenta de detecção, além da prévia separação pela cromatografia a líquido, a identificação dos íons gerados pela fragmentação das moléculas sob estudo, produzindo um espectro de massas. Portanto, este método permite a separação e identificação simultânea de compostos (MSAGATI et al., 2006). Através da cromatografia líquida, limites de quantificação relativamente baixos podem ser obtidos e subprodutos de

degradação avaliados (PINHO, 2014). Assim, vários métodos de detecção da toxina já foram desenvolvidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Tabela 2).

Tabela 2. Alguns métodos de detecção de MC-LR desenvolvidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Quantificação de Microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)								
Equipamento	Matriz	F.E	Volume de Injeção (µL)	F.M	Vazão F.M (mL. min ⁻¹)	Temperatura (°C)	LD (µg L ⁻¹)	Autor
CLAE-EM	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (300 x 3,9 mm d.i.)	20	MeOH: H ₂ O (90:10) em 0,1% TFA)	1	-	0,2	Mekebri et al., (2009)
CLAE-DAD	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (150 x 2,1 mm d.i., 3,5µm)	-	Ácido Trifluoroacético 0,1% e Acetonitrila (35%:65%) (Eluição Isocrática)	0,3	-	-	Miao et al., (2010)
CLAE-DAD	Extrato concentrado de cianobactérias	C18 (15 cm x 3,9 mm d. i, 5µm)	25	ACN: H ₂ O, ambos acidificados com TFA 0,1%	-	40	1	Pichardo e Pflugmacher (2011)
CLAE (detector de Espectrometria de Massas Ion Trap)	Biológica (plasma e bile de peixe)	C18 (100 x 2,1 mm d.i.)	10	0,05% Ácido Fórmico em Acetonitrila e 0,05% Ácido Fórmico em Água Ultrapura (Eluição Gradiente)	0,2	40	6	Li et al., (2014)
CLAE - DAD	Meio reacional de AOP	C18 (25 cm x 4,6 mm d. i, 5µm)	20	MeOH: H ₂ O, ambos acidificados com TFA 0,1%	0,9	45	200	Pinho (2015)

Fonte: Autor, 2019. **Legenda:** (-). Não informado; F.E: Fase estacionária; F.M: Fase móvel; (λ) Comprimento de onda; (d.i): Diâmetro interno; LD: Limite de detecção.

Validação do método analítico para a determinação da microcistina-LR

A validação é realizada para garantir que a metodologia analítica seja exata, reproduzível e flexível numa faixa específica, em conformidade com as exigências legais ou com o fim proposto pelo método analítico. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e

Qualidade Industrial, INMETRO e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente. A resolução da ANVISA é o guia mais adequado para a validação de técnicas cromatográficas ligadas aos estudos de cianotoxinas, pois descreve uma metodologia que se aplica às técnicas analíticas diretamente associadas às políticas de proteção de saúde pública (RIBANI et al., 2004).

A primeira etapa da validação é a definição de uma condição analítica proveniente de uma revisão da literatura e de um desenvolvimento prático. Em relação aos métodos cromatográficos, esta padronização deve considerar a influência da variação causada pelo uso de diferentes lotes e/ou fabricantes de colunas, da variação da temperatura, da composição da fase móvel e do pH da fase móvel (INMETRO, 2016). Os testes de validação envolvem a avaliação de diferentes parâmetros de desempenho do método, conhecidos como parâmetros de validação que são: especificidade ou seletividade, linearidade, intervalo, precisão, repetitividade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, robustez, recuperação e incerteza de medição (RIBANI et al., 2004; ALBUQUERQUE JUNIOR, 2007).

Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas com o evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico a um único analito, enquanto a seletividade atribui a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles (FIGUEIREDO, 2012). Na técnica de CLAE para análises de microcistinas, por exemplo, a variação da fase móvel permite a eluição de diferentes variantes de microcistinas em diferentes tempos de retenção, permitindo a seletividade de cada variante (RAPALA et al., 2002; MCELHINEY E LAWTON, 2005).

Linearidade

A metodologia tem que provar que a resposta do analito é linearmente proporcional à concentração do mesmo na amostra, dentro de um intervalo especificado. De acordo com LEITE (2008), a linearidade é determinada por meio de curvas de respostas, para isso faz-se necessário a construção de um gráfico de resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo. A equação da reta obtida que relaciona as duas variáveis, utiliza a equação 1 abaixo:

$$y = ax + b$$

1

No qual: y: resposta medida (área do pico); x: concentração; a: coeficiente angular - expressa a inclinação da curva em relação aos eixos; b: coeficiente linear - expressa a intersecção da curva com os eixos.

Precisão

Este parâmetro determina o erro de uma medição analítica e são critérios primários para se avaliar a eficiência da técnica analítica. Pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade. Condições de repetibilidade são aquelas em que resultados independentes são obtidos usando o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo instrumento, pelo mesmo analista, no mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Condições de reprodutibilidade são aquelas em que os resultados são obtidos usando o mesmo método, para a mesma amostra, em diferentes equipamentos, diferentes locais e por diferentes analistas (RIBANI et al. 2004).

Intervalo

Dependente da aplicação pretendida do método, o intervalo normalmente é derivado do estudo de linearidade, sendo estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras entre a menor e maior concentração de analito, na amostra para a qual se demonstrou o procedimento dentro do intervalo especificado (ICH, 2005).

Repetitividade

As condições de repetitividade incluem o mesmo procedimento de medição, o mesmo observador, o mesmo instrumento de medição, utilizado nas mesmas condições, mesmo local e repetições em curto período de tempo. Na repetitividade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A precisão pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula 2:

$$DPR = \frac{DP}{CMd} \times 100\%$$

2

Na qual: DP: é o desvio padrão e CMD: a concentração média determinada

Limite de Detecção (LD)

Este parâmetro é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ICH, 2005; NATA, 2013). No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. E pode ser determinado pela equação 3:

$$LD = \frac{DP_U}{IC} \times 3$$

3

Em que: DP_U: é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. IC: é a inclinação da curva de calibração.

Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. É um parâmetro determinado principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação e é expresso como concentração do analito na amostra (ICH, 2005). O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação 4:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

4

Em que: DP: é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. IC: é a inclinação da curva de calibração.

Recuperação e Incerteza de medição

O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Neste método, são realizados testes de significância, utilizando o teste "t" de Student de acordo com a seguinte fórmula 6:

$$t = \frac{(Rec - 100)}{\frac{SRec}{\sqrt{n - 1}}} \quad 6$$

Na qual: Rec: a média das recuperações obtidas para n repetições; 100: a recuperação percentual desejada; n: número de determinações; SRec: desvio padrão das recuperações.

Exatidão

Definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (AMARANTE, 2001), a exatidão constitui a chave para o propósito da validação. Os quatro métodos principais, propostos para o estudo da exatidão, são baseados no uso de material de referência certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos.

Robustez

A medida da capacidade de o método não sofrer alterações devido a pequenas variações que podem ocorrer nos parâmetros durante as análises, é o que chamamos de robustez. Os testes de robustez são importantes para que o analista saiba quais fatores devem ser controlados durante a execução de um método. Vários fatores devem ser avaliados: pH, força iônica, concentração da fase móvel, temperatura da coluna, vazão da fase móvel, diferentes colunas, procedimentos envolvidos no preparo das amostras, etc. Na avaliação da robustez de um método, são aplicados experimentos estatísticos conforme o tipo de influência de cada uma das variações na resposta do método estudado (INMETRO, 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes cromatográficos são eficientes na separação e quantificação de toxinas em amostras de águas. Por se tratar de um método analítico, estes testes necessitam ser validados para serem aprovados e registrados na Secretaria de Vigilância da Saúde.

A validação é imprescindível para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Dependendo do propósito do método, alguns dos parâmetros apresentados podem deixar de ser avaliados. Todavia, a exatidão e a precisão do método constituem parâmetros indispensáveis, independente do seu propósito, exceto para métodos com objetivo apenas qualitativo. O método pode ser considerado válido, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE JÚNIOR. Use of solid-phase extraction, highperformance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [DLeu1] MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**. V. 52, n. 1. 2007.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, v. 12, p. 116-131, 2001.

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

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 212p, 2006.

CASSIANO, N.M; BARREIRO, J.C; MARTINS, L.R.R; OLIVEIRA, R.V; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. 32, n4, p. 1-10, 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, Campinas, 1997.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. **Cromatografia: um breve ensaio**. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21- 25, 1997.

FIGUEIREDO, T. M.P. Validação de métodos analíticos-Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar. **Dissertação de metrado**. Universidade de Coimbra, p.104,2012.

GAMBARO, A.; BARBARO, E.; ZANGRADO, R.; BARBANTE, C. Simultaneous quantification of microcystins and nodularin in aerosol samples using high-performance liquid chromatography/negative, Hoboken, v. 26, n. 12, p. 1497–1506, Jun. 2012.

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

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2016.

LEITE, F. **Validação em Análises Química**. 5ª edição-Editora Átomo, Campinas, SP, 357p, 2008.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos, SP: RiMa, 46 p. 2009.

LI, W.; XIE, P.; CHEN, J.; HE, J.; GUO, X.; YU, D.; CHEN, L. Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. **Journal of Chromatography B**. V. 963, p. 113–118, 2014.

MIAO, H-F.; QIN, F.; TAO, G-J.; TAO, W-Y; RUAN, W-Q. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**. V. 79, p. 355–361, 2010.

MSAGATI, T. A.; SIAME, B. A. & SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78: 382-397, 2006.

PICHARDO, S.; PFLUGMACHER, S. Study of the Antioxidant Response of Several Bean Variants to Irrigation with Water Containing MC-LR and Cyanobacterial Crude Extract. **Environmental Toxicology**. p. 300-306, 2011.

PINHO, L. X. Photocatalytic Degradation of Cyanobacteria and Cyanotoxins using Suspended and Immobilized TiO₂. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Porto. Cidade do Porto, 2014.

RAMANAN, S.; TANG, J.; VELAYUDHAN, A. Isolation and preparative purification of microcystin variants. **Journal of Chromatography A**. v. 883, p. 103–112, 2000.

RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. **Analytica Chinica Acta**. n.466, p.213-231. 2002.

REILLY, M.; CODD, G. A. **Laboratory analysis of microcystins in samples from environmental waters**. Universidade de Dundee, 2007.

VALIDATION of analytical procedures: methodology. London: ICH, 2005. 9 p. (ICH Harmonised Tripartite Guideline). CPMP/ICH/281/05.

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