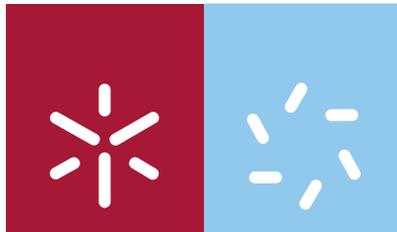


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Paula Alexandra Martins Pereira

**Determinação da anatoxina-a em
amostras de água por SPME-GC/MS**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Paula Alexandra Martins Pereira

Determinação da anatoxina-a em amostras de água por SPME-GC/MS

Dissertação de Mestrado em Química
Área de Especialização em Técnicas de
Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob a orientação da

Doutora Ana Gago - Martínez

e do

Doutor José Manuel Leão Martins

e da

Doutora Dulce Geraldo

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem a ajuda de algumas pessoas, cujo contributo foi determinante para a execução deste trabalho. Fica o meu muito sincero obrigado:

À Universidade do Minho, e ao Departamento de Química de Ciências da Universidade do Minho pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho.

À Universidade de Vigo e ao grupo de Investigação CI8 do Departamento de Química Analítica y Alimentaria.

À Doutora Dulce Geraldo, que me orientou durante este trabalho, pelo apoio e dedicação.

Ao Doutor José Leão Martins e Doutora Ana Gago-Martínez pela aceitação e pelas boas experiências ao longo dos 6 meses de estágio e pelo apoio concedido ao longo deste trabalho.

À Doutora Sandra e restantes elementos do Gabinete de Relações internacionais da Universidade do Minho, por toda a atenção e apoio concedido na realização do projeto via Erasmus Placement.

A todas as minhas colegas de laboratório, por todos os momentos de boa disposição e pelo apoio que me proporcionaram ao longo dos meses.

A todos os meus amigos em especial ao Miguel Ribeiro por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, e pelo apoio concedido.

Um muito obrigado a todos

Resumo

A anatoxina-a é uma neurotoxina produzida por várias espécies de cianobactérias, tais como, *Anabaena*, *Planktothrix* (a anterior *Oscillatoria*), *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* e *Microcystis spp.* Esta toxina atua como um inibidor do neurotransmissor de acetilcolina que irreversivelmente bloqueia o recetor nicotínico de acetilcolina (NACHR), afetando o funcionamento do sistema nervoso. Estudos experimentais tem demonstrado que em apenas alguns minutos após o consumo de água contaminada, animais apresentam sintomas típicos de intoxicação por anatoxina-a, como fasciculação ofegante, convulsões violentas que levam à morte através de paragens respiratória. A dose estimada como necessária para produzir a morte a 50 % dos ratos expostos (LD_{50}) após administração interperitoneal é de apenas 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A anatoxina-a foi pela primeira vez detetada no Canadá (nos anos 1960) e desde então tem sido responsável por uma serie de mortes de animais e humanos, em diferentes partes do mundo. A procura de um método analítico eficiente e viável no controlo deste tipo de cianotoxina revela ser cada vez mais urgente, devido á sua recente descoberta e elevada distribuição mundial. O presente trabalho, resume o desenvolvimento de um método automatizado combinado com a microextração em fase sólida (SPME) com a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) para a determinação rápida e sensível da anatoxina-a em amostras de água. O método tem por base a derivatização direta do analito adicionando isobutilcloroformato na amostra em condições alcalinas. A anatoxina-a derivatizada é extraída por SPME com uma fibra PDMS num vial âmbar durante 20 minutos sob agitação magnética. A técnica GC/MS é utilizada na identificação e quantificação do analito em modo SIM recorrendo ao ião quantificador com a razão m/z 265 e ainda a partir dos fragmentos com m/z de 191e 164. Os parâmetros que afetam a extração, tais como, concentração de sal, quantidade de derivatizante, tempo de extração, tempo de reação e velocidade de agitação foram estudados. Realizou-se a validação do método na análise da anatoxina-a tendo em conta os diversos parâmetros de desempenho, nomeadamente, linearidade, sensibilidade, limiares analíticos e precisão através da repetibilidade e reprodutibilidade.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que este método é uma alternativa rápida e eficiente para o controlo fiável da anatoxina-a presente em águas contaminadas.

Abstract

Anatoxin-a is a neurotoxin produced by various species of cyanobacteria such *Anabaena*, *Planktothrix* (formerly *Oscillatoria*), *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, and *Microcystis* spp. This toxin acts as a mimic of the neurotransmitter acetylcholine and irreversibly binds the nicotinic acetylcholine receptor (NACHR) therefore affecting the functioning of the nervous system. Experimental studies have shown that in few minutes after drinking contaminated water, animals presented typical symptoms of anatoxin-a intoxication such as muscle fasciculation, gasping, violent convulsions, and death due to respiratory arrest. The estimated dosage needed to produce death in 50% of exposed mice (LD_{50}) after interperitoneal administration of approximately 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Anatoxin-a was first detected in Canada (1960's) and since then has been responsible for a number of animal and human fatalities, in different parts of the world. The search for efficient and reliable analytical methods for the control of such cyanotoxins is becoming more and more urgent due to their recent appearance and worldwide distribution. The present work, summarizes the development of an automated method combining Solid Phase MicroExtraction (SPME) with Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS) for fast and sensitive determination of Anatoxin-a in water samples. This method is based on the direct derivatization of the analyte by isobutylchloroformate addition to the sample extract in alkaline conditions. The derivatized anatoxin-a was extracted by SPME procedure, submersing a PDMS fiber in an amber vial for 20 minutes under magnetic stirring. GC/MS is used to identify and quantify the analyte in the SIM mode following the quantification ion of m/z 265 and other fragments of m/z 191 and 164. Parameters affected extraction such as: salt concentration, amount of derivatized agent, time of extraction, time of reaction and stirring speed, were evaluated.

Method was validated taking into account various performance parameters, like linearity, sensibility, detection and quantification limits, precision through repeatability and reproducibility.

From the results obtained in this study, it is possible to conclude that this method is an efficient and fast alternative for the reliable control of anatoxin-a present in contaminated waters.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Abreviaturas Siglas e Símbolos	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas.....	xiii
Capítulo I.....	xvi
Introdução – Anatoxina-a.....	xvi
1.Introdução	17
1.1.Poluição das águas.....	17
1.3.Anatoxina-a.....	21
1.4.Metodologias aplicada à análise da Anatoxina-a.....	23
1.5.Métodos de extração e de pré-concentração	26
Capítulo II	30
2.Parte Experimental	31
2.1.Equipamento de análise	31
2.2.Reagentes	32
2.3.Preparação das soluções	33
2.3.1.Solução mãe.....	33
2.3.2.Solução padrão	33
2.3.3.Amostras.....	34
2.3.4.Método de adição externa de padrão	35
2.1.5.Condições cromatográficas	36
Capítulo III	38
3.1.Apresentação e discussão dos resultados.....	39
3.2.Desenvolvimento e otimização do método SPME-GC/MS.....	40
3.2.1.Condições cromatográficas	40
3.2.2. Reação de derivatização.....	43
3.2.3. Estabilidade do derivado utilizando água como matriz	47
3.3. Desenvolvimento e otimização do método SPME-GC/MS.....	48
3.3.1. Seleção do tipo de fibra de SPME na extração da anatoxina-a.....	48

3.3.2. Otimização das condições de desorção	49
3.3.3. Otimização da extração da anatoxina-a.....	50
3.4. Validação do método SPME-GC/MS	62
3.4.1. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade	63
3.4.2. Estudos de linearidade e calibração.....	65
3.4.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	70
3.4.4. Estudo do efeito de matriz.....	73
Capítulo IV	77
Conclusão	77
Capítulo V	81
Bibliografia	81
Capítulo VI	90
Anexos	90

Abreviaturas Siglas e Símbolos

EDC - Electron capture detection: detecção por captura eletrônica

GC/MS – *Gas chromatography / mass spectrometry*: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

HPLC - *High performance Liquid chromatography*: Cromatografia líquida de alta eficiência

FID – *Flame ionization detector*: detetor de ionização por chama

FLD – *Fluorescence detector*: detetor por fluorescência

FS – *Fused silica*: sílica fundida

UV – *Ultraviolet detection*: detecção por ultravioleta

IBCF - Isobutilcloroformato

LC – *Liquid chromatography*: Cromatografia líquida

ESI/MS - *Electrospray ionization/ mass spectrometry*: ionização eletrospray/espetrometria de massa

ESI/MS/MS – *Electrospray ionisation tandem mass spectrometry*: ionização eletrospray/espetrometria de massas-massas

QTOF - *Quadruple time of flight*: quadrupolo de tempo de voo

QIT – *Quadruple ion trap*: quadrupolo de trampa iônica

LD - Limite de detecção

LLE – *Liquid - liquid extraction*: Extração Líquido – Líquido

LQ – Limite de quantificação

MSPD – *Matrix solid phase dispersion*: dispersão de matriz em fase sólida

NBD-F – 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole

ODS – *Octadecyl siloxane*: octadecil siloxano

PDMS – Polidimetilsiloxano

PP - Polipropileno

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SIM - *Single ion monitoring*: monitorização seletiva de iões

SPE – *Solid phase extraction*: Extração em fase sólida

SPME - *Solid phase microextraction*: Microextração em fase sólida

TLC – *Thin layer chromatography*: Cromatografia em camada fina

UV/DAD – *UV diode-array detection*: detecção UV e Detector Fotodiodos

WCX-SPE – *SPE weak cation-exchange*: Extração em fase sólida com troca catiónica fraca

a – ordenada na origem

b – declive da reta

c - concentração

min – minutos

m/z – Razão massa/carga

n – Número de réplicas

r – coeficiente de correlação

R – Ruído

s – Desvio padrão

S_a - Desvio padrão da ordenada na origem

S_b - Desvio padrão do declive

S_c– Altura do pico cromatográfico

S_{y/x} – Desvio padrão dos pontos

experimentais à reta

t_r – Tempo de retenção

V – Volume

σ_{Vm} - incerteza do volume da micropipeta

Índice de Figuras

Capítulo I: Introdução

Figura 1.1. Estrutura química dos diferentes tipos de anatoxinas. 22

Figura 1.2. Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME): (1) fibra revestida com filme polimérico; (2) agulha de aço; (3) corpo de dispositivo; (4) guia do êmbolo; (5) êmbolo do dispositivo. 29

Capítulo II: Parte Experimental

Figura 2.1. Ilustração do equipamento de GC-MS (A) e de SPME (B) utilizado. 31

Capítulo III: Apresentação e discussão dos resultados

Figura 3.1. Cromatograma correspondente a análise de uma solução de anatoxina-a derivatizada com IBCF por SPME-GC/MS ($c=1,00 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$) e respectivos espectros de massas obtidos em modo SCAN (A) e modo SIM (B). 41

Figura 3.2. Mecanismos de fragmentação da anatoxina-a derivatizada com IBCF originando os iões de m/z : a) 265, b) 209, c) 191 e d) 164 propostos pelo software *Mass Frontier 1.0*. 42

Figura 3.3. Cromatograma correspondente à análise de uma solução de concentração $160,00 \mu\text{g/mL}$ de fumarato de anatoxina-a derivatizada com uma mistura de anidrido acético/piridina (1:1) por GC/MS, no modo SIM ($m/z = 207$). 45

Figura 3.4. Espectro de massa relativo à análise de uma solução de concentração $160,00 \mu\text{g/mL}$ de fumarato de anatoxina-a derivatizada com uma mistura de anidrido acético/piridina (1:1) por GC/MS, no modo SIM ($m/z = 207$). 45

Figura 3.5. Representação esquemática das diferentes etapas que constituem o processo de microextração em fase sólida da anatoxina-a derivatizada com IBCF: A) processo de adsorção; B) desorção na entrada do injetor e C) Cromatograma obtido pela análise da anatoxina-a ($100,00 \mu\text{g/mL}$) derivatizada com $4 \mu\text{L}$ de IBCF, por SPME-GC/MS. 46

Figura 3.6. Esquema da reação de derivatização da anatoxina-a com isobutilcloroformato para a sua posterior análise por SPME-GC/MS. 47

Figura 3.7. Estudo do efeito da adição de NaHCO_3 na extração da anatoxina-a ($0,500 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$) derivatizada com $4 \mu\text{L}$ de IBCF, tempo de reação entre 16 - 24h,

20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), num volume total de solução de 2 mL. 52

Figura 3.8. Cromatogramas relativos ao estudo do efeito do volume de IBCF na eficiência da extração da anatoxina-a (0,100 µg/mL) por SPME-GC/MS: a) 5 µL; b) 10 µL; c) 15 µL e d) 20 µL, para tempo de reação entre 16 - 24h, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), num volume total de solução de 2 mL. 53

Figura 3.9. Estudo do efeito da variação do volume de IBCF na eficiência da extração da anatoxina-a (0,100 µg/mL) usando uma fibra PDMS de 100 µm, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), volume total de solução de 2 mL, para um volume de IBCF adicionado: A) Estudo na gama entre 0 e 20 µL; B) Estudo na gama entre 0 e 8 µL. 54

Figura 3.10. Representação do estudo da variação de concentração de anatoxina-a derivatizada com 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL. 55

Figura 3.11. Estudo do efeito do tempo de reação na eficiência da extração da anatoxina-a (1,00 µg/mL) usando uma fibra PDMS de 100 µm, 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL. 56

Figura 3.12. Cromatograma relativo a extração da anatoxina-a (1,00 µg/mL) por SPME-GC/MS, após 2 horas de reação, 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL. 57

Figura 3.13. Cromatograma relativo a extração da anatoxina-a (1,00 µg/mL) por SPME-GC/MS, após 8 horas de reação, 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL. 57

Figura 3.14. Estudo do tempo de extração ótimo a aplicar na análise da anatoxina-a (1,00 µg/ml) derivatizada com IBCF (5 µL), 200 mg de NaHCO₃, tempo de reação entre 16 - 24h, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL, usando uma fibra PDMS de 100 µm. 59

Figura 3.15. Estudo do efeito da variação da velocidade de agitação, pela

aplicação de diferentes níveis de agitação, na eficiência da extração da anatoxina-a (1,00 µg/mL) derivatizada com IBCF (5 µL), 200 mg de NaHCO₃, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 minutos de tempo de extração, para um volume total de solução de 2 mL, utilizando uma fibra PDMS de 100 µm. 61

Figura 3.16. Curva de calibração obtida por SPME-GC/MS da área de pico de soluções padrão de anatoxina-a derivatizada, na gama de concentração entre 0,030 – 0,150 µg/mL, com 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 minutos de tempo de extração, nível de agitação constante (2), para um volume total de solução de 2 mL. 66

Figura 3.17. Curva de calibração obtida em matriz de água de rio (rio Minho) da área do pico em função da concentração da anatoxina-a derivatizada recorrendo ao método SPME-GC/MS. 67

Figura 3.18. Cromatogramas da anatoxina-a derivatizada em matrizes de água ultrapura (A) e de água de rio Minho (B) obtidos pelo método SPME-GC/MS. Condições experimentais idênticas às da figura 3.16. 69

Figura 3.19. Cromatogramas representativos da análise de anatoxina-a (0,050 µg/mL) numa solução com matriz de: a) água ultrapura e b) água do rio Minho pelo método SPME-GC/MS. Condições experimentais idênticas às da figura 3.16. 70

Figura 3.20. Cromatograma da anatoxina-a derivatizada (0,010 ± 0,003µg/mL) correspondente ao LD do método SPME-GC/MS obtido em matriz de água ultrapura. 71

Figura 3.21. Cromatogramas relativos ao estudo do efeito de matrizes na análise da anatoxina-a (0,100 µg/mL) por SPME-GC/MS: a) água ultrapura; b) água do rio Minho; c) água do rio Lima; d) água do lago Zamanes; e) água do rio Tâmega contaminada com microcistinas 74

Figura 3.22. Estudo do efeito de matriz das soluções de anatoxina-a de diferentes concentrações (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL): a) água ultrapura, b) água do rio Lima, c) água do rio Minho, d) água do lago Zamanes e e) água do rio Tâmega contaminada com microcistinas 75

Índice de Tabelas

Capítulo I: Introdução

Tabela 1.1.1. Níveis de concentração máximo aceitável de diferentes tipos de cianotoxinas em águas para consumo.	20
---	----

Capítulo II: Parte Experimental

Tabela 2.1. Apresentação da concentração das soluções mãe, de trabalho e padrão de fumarato de anatoxina-a preparadas e respectivas incertezas associadas.	34
---	----

Tabela 2.2. Concentração de anatoxina-a utilizada na adição de solução padrão a uma amostra de água não contaminada branco (c_{trabalho}), volume da solução utilizada na fortificação (V_m) e concentração obtida após a adição do padrão (c_i).	35
---	----

Tabela 2.3. Concentração de anatoxina-a utilizada na adição de padrão às amostras (c_{trabalho}), volume da solução utilizada na adição do padrão (V_m) e concentração obtida após a adição do padrão (c_i).	36
--	----

Tabela 2.4. Condições cromatográficas associadas ao sistema GC-MS, testadas em soluções com $1,00 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ de fumarato de anatoxina-a derivatizada com $4 \mu\text{L}$ de IBCF, em água ultrapura.	37
--	----

Capítulo III: Apresentação e discussão dos resultados

Tabela 3.1. Temperaturas recomendadas e algumas características inerentes para a utilização dos diferentes tipos de fibras em GC/MS.	49
---	----

Tabela 3.2. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação da massa de NaHCO_3 na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, de concentração $0,500 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$.	51
---	----

Tabela 3.3. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação de IBCF na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a, para uma concentração final na solução de $0,100 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$.	55
--	----

Tabela 3.4. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação do tempo de reação na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, para uma concentração final na solução de $1,00 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.	56
---	----

Tabela 3.5. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação do tempo de extração na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, para	
---	--

uma concentração final na solução de $1,00 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.	59
Tabela 3.6. Resultados obtidos no estudo do efeito da agitação na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, de concentração $1,00 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.	61
Tabela 3.7. Condições otimizadas para o método de análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS.	62
Tabela 3.8. Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do sistema SPME-GC-MS na determinação da anatoxina-a utilizando água ultrapura como matriz.	63
Tabela 3.9. Resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do sistema SPME-GC/MS na determinação da anatoxina-a utilizando água ultrapura como matriz.	64
Tabela 3.10. Concentração das soluções padrão (c) e áreas de pico (A) e respectivas incertezas associadas obtidas na análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS.	65
Tabela 3.11. Apresentação dos parâmetros estatísticos obtidos na calibração do sistema SPME-GC/MS na análise de soluções padrão na gama de concentração entre $0,030 - 0,150 \mu\text{g/mL}$. A equação de reta é apresentada na forma de $A = (b \pm tSb) c + (a \pm tSa)$.	66
Tabela 3.12. Concentração das soluções padrão (c) e áreas de pico (A) e respectivas incertezas associadas obtidas na análise da anatoxina-a por SPME-GC-MS.	67
Tabela 3.13. Apresentação dos parâmetros estatísticos obtidos na calibração do sistema SPME-GC/MS com água do rio Minho de soluções padrão de anatoxina-a derivatizada, num intervalo de concentração entre $0,030 - 0,150 \text{ ng/mL}$. A equação de reta é apresentada na forma de $A = (b \pm tSb) c + (a \pm tSa)$.	68
Tabela 3.14. Apresentação dos valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema de SPME-GC/MS, baseados na relação sinal/ ruído de 3 e 10 respetivamente, estimados injetando 3 réplicas de uma solução de concentração $1,00 \pm 1,00 \mu\text{g/mL}$.	71
Tabela 3.15. Resultados obtidos para a área de pico da anatoxina-a na análise de 10 réplicas de soluções individuais de concentração $0,050 \pm 0,016 \mu\text{g/mL}$.	72
Tabela 3.16. Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos no estudo do efeito de matriz na análise da anatoxina-a adicionada ($0,030$, $0,050$ e $0,100 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tipos de matrizes.	75

Tabela 3.17. Estudo do efeito de matriz: comparação do sinal obtido para uma concentração de 0,100 µg/mL de anatoxina-a utilizando como matriz: água ultrapura, água do rio Minho, água do rio Lima, água do lago Zamanes e água do rio Tâmega. 76

Capítulo I

Introdução – Anatoxina-a

1. Introdução

1.1. Poluição das águas

A água é a molécula de maior importância para todas as formas de vida na terra. Entretanto, os problemas ambientais relativos à preservação das águas superficiais e subterrâneas têm-se agravado exponencialmente nas últimas décadas, principalmente, devido ao crescimento populacional e do conseqüente aumento da atividade industrial. Atualmente as florações de cianobactérias atraem cada vez mais a atenção de agências ambientais, autoridades responsáveis pela gestão de recursos hídricos e organizações ligada à saúde humana e animal, pois estas podem promover problemas na qualidade da água e no seu tratamento, bem como riscos para a saúde humana e animal [1]. O problema é especialmente agudo no mar Báltico, onde florações de cianobactérias ocorrem todos os verões, cobrindo áreas de mais de 100 000 km². Presentemente já é possível realizar o mapeamento quantitativo das cianobactérias utilizando sensores hiperespectrais [2].

A intervenção humana no uso da água afeta a qualidade dos ecossistemas ambientes e seus recursos. A sua deterioração a nível dos ecossistemas decorre do aumento de:

- Agentes patogénicos (protozoários bactérias, vírus, parasitas);
- Suspensão de sólidos e turbidez;
- Decomposição da matéria orgânica;
- Eutrofização (algas, cianobactérias);
- Nitratos como um poluente;
- Micropoluentes orgânicos (pesticidas, herbicidas, industrial de micropoluentes);
- Metais pesados;
- Salinização;
- Acidificação.

A importância relativa dos tipos de deterioração na qualidade da água depende, claramente, do uso do corpo de água em particular ou fornecimento em causa. Em termos de mortes humanas a nível global, a poluição da água potável por agentes patogénicos é claramente o de maior ameaça.

O aumento crescente da pressão humana sobre os recursos naturais e águas controladas para o fornecimento de água potável, nomeadamente em áreas como a agricultura, a aquacultura, indústria, etc. Tornam a água uma fonte finita surgindo assim a necessidade de tornar prioritário o controlo da qualidade da água [3 e 4].

O aumento das atividades urbanas e industriais, assim como a descarga de seus efluentes acarretam consequências como a acumulação de nutrientes ricos em fósforo e azoto nos corpos de água. Ao fenómeno causado pelo excesso desses compostos dá-se o nome eutrofização, que aliado à elevada temperatura tem como uma das consequências, a rápida proliferação de cianobactérias normalmente conhecida como “floração” ou “*bloom*” [5, 6].

Para além da acumulação de toxinas tanto em água como em organismos vivos, outra consequência da eutrofização consiste na redução da diversidade de espécies presentes em corpos de água [7]. As medidas para reduzir a eutrofização devem ser vistas como uma alta prioridade, contribuindo para os requisitos estabelecidos para o controlo e qualidade da água. Para tal, alguns tratamentos (filtração por membrana, desinfecção UV, processos de oxidação, etc.) são aplicados para eliminação de toxinas e seus produtores e a sua eficiência testada a nível do laboratório [8].

1.2 Cianobactérias e cianotoxinas

As cianobactérias, os fósseis mais antigos até hoje conhecidos, são microrganismos aeróbios fotoautotróficos que desempenharam um papel importante na oxigenação da atmosfera terrestre [9]. Os seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo. Entretanto, sua organização celular demonstra que esses microrganismos são procariontes e, portanto, muito semelhantes bioquimicamente e estruturalmente às bactérias [10].

A sua capacidade de crescimento em diferentes ecossistemas (águas doces, marinhas e solos) e resistência a ambientes hostis como desertos, águas quentes e ambientes com o Ártico e Antártico leva a que sejam microrganismos extremamente adaptáveis. Várias espécies vivem em solos e rochas onde desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na reciclagem de nutrientes. Os fatores ambientais que promovem a proliferação

de cianobactérias em água são principalmente o pH do meio (pH 7,5 e 10), a temperatura entre 15 a 30 °C e alta concentração em nutrientes, principalmente azoto e fósforo [11, 12].

As cianobactérias têm sido estudadas pelo seu possível potencial farmacológico e pela influência que exercem sobre a fertilidade de solos e águas, uma vez que se encontram em suplementos dietéticos, peixes, moluscos, etc. [13]. No entanto, algumas espécies de cianobactérias têm a capacidade de produzir metabolitos secundários que promovem o gosto e odor desagradáveis à água, para além de serem poderosas toxinas. [14].

Na literatura podem-se encontrar evidências que ligam o aparecimento de determinado tipo de sintomas em humanos com florações de cianobactérias produtoras de toxinas. Entre os sintomas mais comuns encontram-se a irritação da pele, resposta alérgica, dores musculares, dores nas articulações, gastroenterites, consolidação pulmonar, disfunções a nível do fígado, rins e ainda um conjunto de efeitos neurológicos [15]. Um dos primeiros estudos elaborados na China comprovou que o aumento da incidência de florações de cianobactérias se relacionava com a incidência de cancro do fígado nos seres humanos [16]. Por outro lado existem provas do aparecimento de deficiências respiratórias após a exposição a florações de *Trichodesmium* e *Lyugbya* em águas marinhas e a florações de *Anabaena* em água doce, devido à inalação destes microrganismos [6]. Os primeiros relatos em França foram diagnosticados em animais domésticos [17]. Em Portugal verificou-se a existência de cianobactérias em águas doces desde 1990. O tipo predominante são as microcistinas (microcistina-LR) que afetam diretamente os ecossistemas e a cadeia alimentar contaminando moluscos, peixes, lagostas, mexilhões e carpas [18]. Em vários pontos do mundo, foi detetado que o contacto com cianobactérias produtoras de toxinas pode conduzir a reações alérgicas associadas ao aparecimento de febre, asma, conjuntivites e irritações a nível da pele e olhos. A inalação, a hemodiálise e a ingestão de água contaminada ou suplementos dietéticos são consideradas algumas das principais vias de contaminação por exposição a toxinas [19]. De entre as florações de cianobactérias em água que causam este tipo de reações encontram-se, por exemplo, as seguintes: *Oscillatoria*, *Microcistis*, *Nodularia*, *Aphanizamenon*, *Anabaena* e *Gloetrichia* [6].

Como já foi referido as cianobactérias produtoras de toxinas, denominadas cianotoxinas, causam graves lesões em animais, terrestres e aquáticos, e humanos, através da ingestão ou através do contacto direto com água contaminada. As principais e mais perigosas toxinas produzidas pelos géneros já mencionados de cianobactérias são *microcistinas*, *nodularinas*,

anatoxinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas [20]. Algumas das principais cianotoxinas e algumas das suas características encontram-se enumeradas em anexo (anexo I). As cianotoxinas são classificadas atendendo ao seu mecanismo de ação como hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas ou promotoras da inibição da síntese de proteínas [21]. Com base em estudos epidemiológicos em animais estabeleceram-se as concentrações máximas aceitáveis em água para consumo, para os diferentes tipos de cianotoxinas. Os resultados obtidos para esses estudos encontram-se apresentados na tabela 1.1 [22].

Tabela.1.1. Níveis de concentração máximo aceitável de diferentes tipos de cianotoxinas em águas para consumo [22].

Cianotoxinas	Diretrizes	Concentração máxima aceitável
Hepatotoxinas		
Microcistinas	WHO	1.0 µg/L
	Austrália	1.3 µg/L*
	Canada	1.5 µg/L†
	Nova Zelândia	1.0 µg/L, 0.1 µg/L‡
	EUA	1.0 µg/g §
Nodulinas	Não existem diretrizes definidas para esta toxina, embora a sua presença deva ser considerada como um risco para a saúde	
Cilindrospermopsina	Não existem diretrizes oficiais, mas sugeriu na literatura o valor referência de 1,0 mg / L com base em suspeitas de genotoxicidade	
Neurotoxinas		
Anatoxinas	Não existem diretrizes oficiais, mas a anatoxina-a tem um valor de referência sugerido de 3 mg / L	
Saxitoxinas	Não existem diretrizes oficiais, mas na Austrália está considerando um valor de 3 mg / L com base em dados toxicidade em marisco	

Nota: *Toxicidade total para microcistinas-LR, algumas variantes são convertidas em microcistina-LR e somadas;

† Total de microcistina-LR; ‡ inclui o fator promotor de tumores; § produtos à base de algas.

1.3. Anatoxina-a

A anatoxina-a (2-acetil-9-azabicyclo [4.2.1] non-2-eno) foi a primeira cianotoxina a ser quimicamente e funcionalmente definida, por se tratar de uma amina secundária [23]. Trata-se de um alcaloide que estruturalmente apresenta um anel heterocíclico nitrogenado de baixo peso molecular. Atualmente sabe-se que a anatoxina-a é produzida por mais de uma espécie de cianobactérias como: *Anabaena*, *Aphanizomnion*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Cylindrospermum*, *Arthrospira*, *Phormidium*, *Nostoc* e *Oscillatoria* [24]. Sabe-se também que esta toxina é instável em condições naturais, sendo praticamente ou parcialmente degradada em produtos não tóxicos, como por exemplo, dihidroanatoxina-a e epoxianatoxina-a [25].

Existem três tipos de anatoxinas atualmente descritos na literatura: (1) anatoxina-a, (2) homoanatoxina-a são aminas secundárias e (3) anatoxina-a (s) um éster de fosfato com uma estrutura cíclica [8]. As respectivas estruturas químicas destas anatoxinas são apresentadas na figura 1.1. A (+) -anatoxina-a (enantiómero positivo da anatoxina-a) é um agente bloqueador neuromuscular pós-sináptico, interfere com a transmissão dos impulsos nervosos e liga-se fortemente aos recetores nicotínicos [26 - 28]. Contudo, o enantiómero negativo (-) anatoxina-a é menos potente e nunca foi relatada a sua produção por parte das cianobactérias [29, 30]. Relativamente à homoanatoxina-a foi descoberto, por Aas e colaboradores, que esta aumenta o fluxo de iões Ca^{2+} em nervos terminais colinérgicos a nível dos brônquios e cérebro de ratos [31]. Ambas podem causar a morte rápida em mamíferos, aves, moluscos e peixes, através de paragem respiratória [32, 33]. Relativamente à anatoxina-a (s) pode dizer-se que é uma toxina mais potente e ao mesmo tempo um inibidor de acetilcolinesterase. Ao contrário de anatoxina-a, a anatoxina-a (s) induz hipersalivação em mamíferos, assim como outros sintomas mais típicos de neurotoxicidade, como a diarreia [34]. Embora existam várias vias de intoxicação, tais como ingestão de suplementos dietéticos, inalação, contacto com a pele ou mesmo pela hemodiálise, a forma mais comum das toxinas ingressarem no corpo é através do consumo da água contaminada [35, 36].

Embora o seu mecanismo de ação não seja conhecido em detalhe, esta liga-se e estimula os recetores de acetilcolina e inibe irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase [34]. Este tipo de toxina age muito rapidamente e os sintomas começam a manifestar-se em alguns minutos após a sua ingestão.

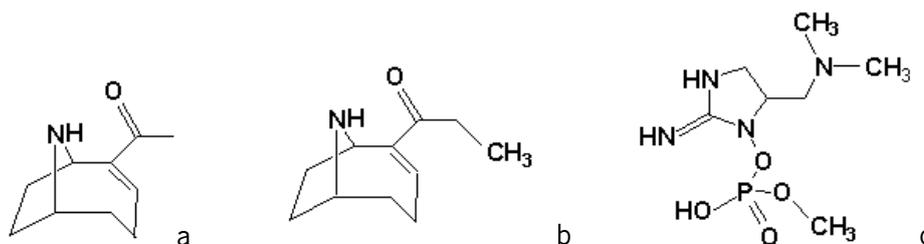


Figura 1.1 Estrutura química dos diferentes tipos de anatoxinas: a) Anatoxina-a; b) Anatoxina-a (s) e c) Homoanatoxina-a.

Anatoxina-a também é conhecida como um “*Very Fast Death Factor*” (VFDF) [34] dado que as vítimas começam por sofrer de espasmos musculares e paralisia, podendo ocorrer paragem respiratória [37]. A morte pode ocorrer em minutos ou horas, dependendo da dose ingerida. As doses letais para animais já foram estudadas em ratos e relatadas na literatura, no entanto para os humanos esta dose não é conhecida, mas é estimada em menos de 5 mg para um adulto do sexo masculino [38, 39]. Esta toxina pode ser quimicamente sintetizada e alguns dos métodos encontram-se evidenciados na literatura com forma de potencializar a sua deteção e facilitar o reconhecimento e o modo de atuação da anatoxina-a nas cianobactérias e ecossistemas aquáticos [34, 40, 18]. A homoanatoxina-a é estruturalmente e toxicologicamente muito semelhante à anatoxina-a. Foi a primeira a ser preparada sinteticamente e mais tarde encontrada na Noruega em florações de cianobactérias do tipo *Oscillatoria* [39]

Não existe até ao momento um tratamento específico no caso de intoxicação com anatoxina-a, no entanto são conhecidos os seus efeitos sobre vertebrados [41]. A deteção e identificação deste tipo de compostos é difícil e só é possível em laboratórios de análises devidamente equipados para a sua deteção. Carmichael e Gorham foram os primeiros a contribuir para o estudo da toxicidade da anatoxina-a, publicando o seu primeiro trabalho em 1964 [34]. Desde aí começaram a surgir um leque de métodos de deteção para a análise desta toxina, associado com a rapidez dos bioensaios, de modo a avaliar a toxicidade em amostras naturais. Mais tarde surgiu a investigação da toxicidade da anatoxina-a em ratos e tecidos [42 - 46]. Após alguns anos com o crescimento das ações contra o uso de animais em experiências e com o aumento de relatos relacionados com a toxicidade desta toxina, como por exemplo, aparecimento de tumores, lesões e mortes em animais ou seres humanos, levaram à necessidade de monitorização e identificação rápida de florações de cianobactérias tóxicas em águas, alimentos, etc. Para este efeito dispõe-se da contribuição de diversos métodos biológicos,

químicos e até bioquímicos que possibilitam a detecção e a quantificação destas toxinas em vários tipos de matrizes [47].

1.4. Metodologias aplicada à análise da Anatoxina-a

Aparentemente, a maioria das cianotoxinas uma vez sintetizadas na fase de crescimento são mantidas no interior das células. De acordo com Chorus et al., a libertação de cianotoxinas para o meio circundante pode decorrer, embora não exclusivamente, durante o período de envelhecimento celular onde ocorre morte e lise celular [48]. Existem alguns indícios de que a anatoxina-a seria libertada durante a etapa de crescimento, especialmente em condições de baixa luminosidade [6].

Os métodos que permitem a determinação qualitativa e quantitativa de algumas cianotoxinas apenas começaram a estar disponíveis a partir da década de oitenta [49].

Nas primeiras tentativas de detetar a anatoxina-a em amostras ambientais, foram propostos protocolos de bioensaios testados em ratos. Alguns dos métodos aplicados neste âmbito classificam-se como bioensaios bacteriológicos, onde se destacam os bioensaios a invertebrados e bioensaios a vertebrados (bioensaio a ratos e a peixes) ou bioensaios utilizando culturas de células *in vitro*. Apesar de serem técnicas de baixo custo, estas apenas permitem determinar a toxicidade total em misturas complexas e apenas pela exposição durante algumas horas, sendo pouco sensíveis e específicos. É importante evidenciar que apenas um método não é suficiente para promover uma informação adequada sobre a toxicidade de todos os tipos de cianotoxinas. Contudo estes procedimentos não puderam monitorizar níveis sub-letais nem diferenciar variantes [6, 50]. Araoz, et al, foi o responsável pelo estudo da afinidade elevada da anatoxina-a e homoanatoxina-a para os recetores ou colinérgicos nicotínicos e a adaptar o ensaio radioligante vincutivo na detecção em rotina destas toxinas a partir de extratos de células de cianobactérias. A posterior confirmação destes resultados e identificação da anatoxina-a e homoanatoxina-a foram obtidos por GC/MS [51].

Para além dos ensaios biológicos na literatura são também evidenciados um conjunto de métodos bioquímicos, tanto na análise de microcistinas como de neurotoxinas. A avaliação da toxicidade da anatoxina-a revelou que este alcoide liga-se aos recetores de acetilcolina na rede neuromuscular e é também capaz de se ligar a recetores nicotínicos de acetilcolina em tecidos de *Torpedo acellata* [49]. Apesar de este princípio ser conhecido há bastante tempo, apenas

recentemente foi posto em prática na detecção analítica da anatoxina-a em extratos de cianobactérias, utilizando ensaios competitivos com inibidores de radiomarcção e não-reativos de acetilcolina [51 - 53]. Um outro método aplicado na análise da anatoxina-a é o método ELISA, aplicado essencialmente em amostras de milho com um limite de detecção próximo de 1µg/L [54].

Os métodos analíticos disponíveis atualmente para a determinação da anatoxina-a em florações, culturas de cianobactérias, água, entre outros, são baseados principalmente nas suas propriedades físicas e químicas e usam preferencialmente técnicas cromatográficas para proceder à sua detecção. Técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com ultravioleta (LC-UV) ou detecção baseada na fluorescência (LC-FLD) ou ainda acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) são exemplos de técnicas aplicadas no estudo e análise da anatoxina-a.

Uma das primeiras técnicas a ser aplicada na análise da anatoxina-a foi a cromatografia em camada fina (TLC), utilizada na purificação de toxinas, principalmente por se tratar de um método de baixo custo. Este método apresenta um limite de detecção de apenas 10 µg/g no que diz respeito à análise da anatoxina-a a partir de estratos de cianobactérias [55].

Apesar dos problemas relacionados com a rápida degradação desta toxina (tempo de vida menor que um dia, dependendo das condições de pH, luminosidade, temperatura e nutrientes), esta toxina pode ser determinada por diversos métodos mesmo a quando se encontra a baixas concentrações. Uma desvantagem advém da falta de padrões ou materiais de referência comercialmente disponíveis na análise da anatoxina-a e homoanatoxin-a e os seus produtos de degradação [56].

Os primeiros estudos sobre a determinação de anatoxina-a em água doce foram realizados usando LC/UV, no entanto este método demonstrou ter inúmeras limitações no que toca à sensibilidade e um grande número de interferências inerentes a matrizes complexas. Além disso, esta técnica não permite a detecção dos produtos de degradação de anatoxina-a. A sensibilidade e limite de detecção desta técnica melhoraram pela introdução da derivatização com 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) e posterior detecção fluorimétrica. Por outro lado o método de LC/FLD acrescentou também a possibilidade da determinação simultânea de

anatoxina-a (LD <10 ng/L em amostras de água), o seu análogo a homoanatoxin-a e os seus produtos de degradação, recorrendo também à extração em fase sólida (SPE) com uma resina de troca catiónica fraca [53, 57, 58]. Uma melhoria deste método foi apresentada por Rawn e seus colaboradores para a análise de anatoxina-a em algas azuis - verdes recorrendo a técnicas de pré concentração (C18-SPE) [59]

A técnica de GC é outra das inúmeras técnicas aplicadas na análise da anatoxina-a em água doce, acoplada a MS ou através da deteção por captura de eletrões (ECD). Neste caso a derivatização, com base na acetilação e alquilação da anatoxina-a é um dos pré-requisitos para se atingir uma maior sensibilidade na análise cromatográfica. A aplicação da GC acoplada com deteção ECD permitiu uma determinação mais sensível (ng) e aplicada com sucesso após uma extração líquido - líquido (ELL) e derivatização com brometo de pentafluorobenzil ou após C18-SPE e derivatização com anidrido tricloroacético [60].

A técnica de GC/MS melhorou significativamente a identificação e deteção da anatoxina-a, homoanatoxina-a e os seus produtos de degradação. Edwards et al. foi o primeiro a aplicar GC/MS após C18-SPE como técnica confirmativa na análise da anatoxina-a, com acetilação prévia do grupo amina com piridina e anidrido acético [61]. A sensibilidade atingida por este método revelou ser similar à obtida por GC/ECD. Na Irlanda a anatoxina-a foi pela primeira vez detetada em três grandes lagos, a partir de florações de cianobactérias, usando como método de deteção GC/MS, após acetilação [53].

Tal como a maioria das aplicações, o desenvolvimento de métodos sofisticados como LC/MS e LC/MS/MS levou a que decorressem avanços importantes quanto à sensibilidade e rapidez da análise da anatoxina-a, eliminando assim a necessidade da derivatização [62]. Problemas como a baixa resolução cromatográfica foram superados pelo uso de pré-colunas de derivatização on-line usando o pentafluoropropionico (LD 2,1 ng/L) [63]. A anatoxina-a tal como algumas hepatoxinas foram ambas determinadas em simultâneo em água usando SPE suportada e LC/ESI/MS/MS [64]. O limite de quantificação reportado foi de 50 ng/L para a anatoxina-a e uma recuperação superior 90%. Posteriormente Dell'Aversano e seus colaboradores adequaram as interações hidrófilas da técnica de LC/ESI/MS na análise de vários tipos de toxinas, sem recorrer a qualquer tipo de limpeza da amostra ou etapa de pré-concentração. O método demonstrou ser bastante robusto atingindo limites de deteção na ordem de 225 pmol de anatoxina-a injetada [65, 66].

No entanto, a análise por LC/MS demonstrou ser insuficiente e limitativa quando aplicada na área forense [67, 68]. Em 2002 a morte de um jovem nos EUA foi atribuída a envenenamento por anatoxina-a sobre a prova da identificação desta toxina usando LC/MS com quadropolo simples. Tal identificação revelou ser incorreta e o erro encontrava-se associado à incapacidade da técnica de LC/MS em distinguir a fenilalanina da anatoxina-a, uma vez que estas demonstram as mesmas capacidades de retenção, massa molecular e produzem fragmentos de iões isobáricos nos seus respetivos espectros [34]. Tal facto refletiu a necessidade de complementar ou adicionar outros métodos como UV/DAD, dado que cada um apresenta uma atividade espectral diferente. Recentemente, a intoxicação de cães num lago em França associada com a presença da anatoxina-a, levou a que se recorrer à técnica referida anteriormente para apurar quais a verdadeira causa dos incidentes ocorridos [17].

James e seus colaboradores focaram-se as suas atenções na investigação e elucidação dos mecanismos de fragmentação para a anatoxina-a, homoanatoxina-a e os produtos de degradação em amostras na área forense. Tendo como apoio ao seu estudo, analisadores de massa do tipo quadropolo com “ion trap” e quadropolo com tempo de voo. Toda a pesquisa teve também como objetivo desenvolver metodologias em LC/MS/MS de modo a evitar os problemas no que toca à identificação da anatoxina-a investigações forenses, relacionadas com intoxicações agudas neurotóxicas [69].

Mais recentemente, a aplicação da técnica de ressonância nuclear magnética (RMN) permitiu a quantificação precisa na ordem dos microgramas da anatoxina-a em amostras diluídas [70].

1.5. Métodos de extração e de pré-concentração

A complexidade das matrizes nas quais a anatoxina-a está presente, causando uma toxicidade relativa a baixos níveis de concentração, remete a uma etapa de preparação da amostra relativamente crítica, que deve ser cuidadosamente realizada não apenas para a aquisição de dados analíticos precisos e confiáveis, mas também para um desempenho cromatográfico eficiente. Neste caso a limpeza e extração são as etapas mais críticas no protocolo de pré-tratamento da amostra.

Em certos casos a extração seletiva pode ser recomendada, pois acelera todas as operações seguintes, simplificando assim a preparação da amostra e em alguns casos permite a

análise cromatográfica direta. No entanto, em muitos casos as interferências presentes em extratos fazem com que o passo de purificação da amostra passe a ser necessário. A pré-concentração é um outro dos passos a ser considerado nas situações em que se pretende uma melhor sensibilidade.

A anatoxina-a pode ser extraída a partir de células de cianobactérias, em matrizes diferentes (biomassa ou água), com sucesso utilizando diferentes tipos de solventes. Os mais comumente usados são a água, água acidificada, metanol acidificado [58] ou uma mistura de metanol/água [61, 71 - 74]. Hadara e seus colaboradores começaram por comparar a eficiência de quatro tipos de solventes diferentes (água, ácido acético 0,05 M em água, metanol e ácido acético em metanol 0,05 M). Verificou que a extração com ácido acético aquoso é a mais eficiente [75]. Mais tarde foi avaliada a eficiência de diferentes tipos de solventes para executar a extração da anatoxina-a em cianobactérias liofilizadas. Neste caso específico a água provou ser o solvente mais eficaz, porém a mistura de água/metanol (50/50) demonstrou reduzir a quantidade de picos interferentes e proporcionou uma eficiência de extração elevada (87%). Por outro lado o metanol tem como vantagem adicional de permitir a concentração rápida apenas através de evaporação [76].

A extração da anatoxina-a e da homoanatoxina-a do interior das cianobactérias é difícil sem que seja quebrada a parede celular das células. Para este efeito, diversas metodologias como a liofilização combinado com secagem, centrifugação e/ou ultrassonicação com extração prévia com metanol, metanol acidificado, ácido acético ou solução de Tirode são aplicadas na análise de vários tipos de toxinas [77]. Contudo com a evolução científica, surgiu a extração com líquido pressurizado como uma alternativa à ultrassonicação, no entanto a anatoxina-a demonstrou-se instável às condições experimentais, onde a recuperação obtida foi de apenas 50% [78].

No caso de misturas complexas, como é o caso de amostras de moluscos, a extração é efetuada com uma mistura de metanol, água e acetona. No caso de ser realizada a purificação com SPE é adicionado ao resíduo aquoso uma mistura de etanol e água. A gama de recuperações obtidas para a anatoxina-a ronda os 70-73% [79]. Em estudos aplicados a suplementos alimentares contendo *Spirulina* foi aplicada a extração por sonificação com metanol num banho ultrassónico, para posterior análise da anatoxina-a por LC/MS [80]. De entre as técnicas aplicadas na extração da anatoxina-a encontra-se também a extração líquido-líquido

(ELL) usando diclorometano, recorrendo ao aumento do pH dos extratos (pH=11) [72, 81]. Contudo o inconveniente relacionado com a necessidade do uso de elevadas quantidades de solventes orgânicos tóxicos torna esta técnica pouco viável em laboratório.

É importante evidenciar que para além dos métodos de extração já referidos, a SPE é o mais utilizado na purificação e concentração da anatoxina-a. Recorre-se ao ajuste do pH, utiliza-se um cartuxo de sílica gel octadecil siloxano (ODS) para a uma eluição eficiente com metanol, antes da análise por LC/UV e LC/MS [74]. Uma outra possibilidade de limpeza das amostras de água ou extratos de cianobactérias remete o uso de SPE com um material de troca catiónica fraca (WCX), ajuste do pH=7 e eluição com metanol contendo 0,2% de ácido trifluoroacético. Neste caso específico as recuperações atingem os 83-85% [58]. Este procedimento teve como base um método aplicado por Hadara et al., onde extraiu simultaneamente a anatoxina-a, homoanatoxina-a e os seus produtos de degradação, para posterior análise por LC/FL [82]

Mais recentemente, a microextração em fase sólida (SPME), desenvolvida em 1990 por Pawliszyn e Lord, foi aplicada simultaneamente na extração, purificação e concentração da anatoxina-a [83, 84]. Com esta técnica foi possível introduzir também a automatização da extração e análise on-line das amostras. O dispositivo básico de SPME, apresentado esquematicamente na figura 1.2, consiste de um bastão de fibra óptica, de sílica fundida (FS), com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero [85, 86]. O método de SPME possui várias vantagens sobre os métodos tradicionais de extração. É rápido, simples, livre de solventes, sensível, compatível com a separação e deteção do analito por diferentes sistemas, fornece resultados lineares para uma ampla gama de concentração do analito e conveniente para a conceção de dispositivos portáteis aplicados na análise de campo. Proporciona resultados quantificáveis de concentrações muito baixas de analitos e evita perdas que possam ocorrer durante a extração, concentração e etapas de limpeza dos métodos de extração tradicionais. Por outro lado, uma das principais desvantagens da técnica é o número limitado de fases estacionárias que se encontram comercialmente disponíveis. Algumas das fibras atualmente disponíveis são as seguintes: PDMS (polidimetilsiloxano), PA (poliacrilato), CW / DVB (Carbowax divinilbenzeno), PDMS / DVB, PDMS / CAR (Carboxen), CW / TR (resinas templated) ou DVB / CAR / PDM. Outra desvantagem está relacionada com o uso limitado da fibra devido à exposição a solventes orgânicos e ao número limitado de utilização para a mesma fibra [87].

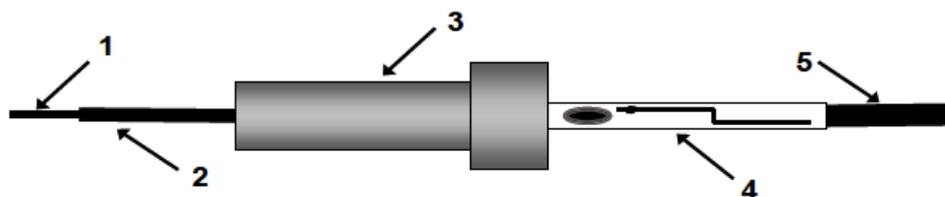


Figura 1.2 Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME): (1) fibra revestida com filme polimérico; (2) agulha de aço; (3) corpo de dispositivo; (4) guia do êmbolo; (5) êmbolo do dispositivo.

Trata-se de uma técnica que pode ser acoplada com várias técnicas de forma muito eficiente, como por exemplo, LC/FL (LD 20 ng/mL) [88], tendo surgido algumas melhorias obtidas nesta análise em diferentes amostras (LD 0,47 ng) [89]. O método de SPME, acoplado ao GC/MS foi também aplicado à análise da anatoxina-a, em que o passo fulcral foi a derivatização [90]. A utilização comum da derivatização em aplicações SPME é o tratamento de compostos polares ou termicamente instáveis, a fim de aumentar as taxas de recuperação. Esta permite a sua conversão em formas facilmente extraíveis, termicamente estáveis, mais voláteis e com melhor comportamento cromatográfico [88]. Em comparação com a SPME direta, a SPME com derivatização permite baixar muito os limites de deteção. Para além de possibilitar o aperfeiçoamento da separação, seletividade e / ou sensibilidade dos métodos analíticos [87, 91].

Aspetos como o tipo de fibra a usar e a natureza do seu revestimento, condições ideais adsorção e desorção, foram estudados e melhorados ao longo dos anos por diversos analistas [92]. O uso de revestimento de polianilina foi relatado por Rodrigues et al e demonstrou ser uma estratégia viável na análise da anatoxina-a por GC/MS em amostras de água (LD 2 ng/mL) [93].

O método de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) é mais um dos métodos aplicados na extração da anatoxina-a a partir de tecido muscular de peixes. Embora o seu uso não seja muito amplo, este novo procedimento oferece vantagens como simplicidade, redução do uso de solventes tóxicos e elimina a possibilidade de formação de emulsões [24].

O anexo II, apresenta resumidamente os métodos mais relevantes desenvolvidos para a determinação da anatoxina-a.

Capitulo II

Parte Experimental

2. Parte Experimental

Neste trabalho otimizou-se um método de cromatografia de gases acoplado a espectrometria de massa, utilizando a microextração em fase sólida (SPME-GC/MS) com uma técnica de pré-tratamento na análise da anatoxina-a em amostras de águas. O método desenvolvido foi aplicado na análise de diferentes amostras de águas recolhidas em diferentes locais nomeadamente, rio Minho, rio Lima, lago Zamanes e rio Tâmega.

Neste capítulo serão descritos os equipamentos e reagentes utilizados, assim como os procedimentos de preparação das amostras de água e das soluções padrão.

2.1. Equipamento de análise

Neste trabalho, foi utilizado um equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa cuja ilustração é apresentada na figura 2.1, juntamente com o equipamento para a microextração em fase sólida. As instruções de funcionamento do equipamento encontram-se apresentadas em anexo (anexo III).



Figura 2.1. Ilustração do equipamento para SPME (A) e de GC/MS (B) utilizados.

Sistema de cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

- a) Sistema GC, HP 6890, equipado com:
- ❖ Coluna cromatográfica 30 m × 0,25 mm HP-5MS
 - ❖ Gás hélio comprimido para cromatografia gasosa, Alphagaz, 200 Bar
 - ❖ Injetor manual
 - ❖ Sistema de aquisição e tratamento de dados: Chemstation para GC/MS, Hewlett Packard

b) Espectrómetro de massa de quadrupolo simples: HP 5973 Mass Selective Detector, equipado com:

- ❖ Fonte de ionização por impacto eletrónico

Microextração em fase sólida (SPME)

- ❖ Agitadores magnéticos
- ❖ Dispositivo portador da fibra para análise por SPME-GC/MS (“manual holder”). Supelco, Bellefonte, PA, USA;
- ❖ Fibra para SPME: 100 µm polidimetilsiloxano (PDMS), adquirida em Supelco, Bellefonte, USA;
- ❖ Placa magnética, RTC Basic, IKA® Werke;
- ❖ Sistema de amostragem fixo para SPME
- ❖ Viais âmbar, 1,5 e 4 mL, Supelco;
- ❖ Lacradores de viais, Agilent, USA;
- ❖ Cronómetro

Outro material e equipamento

- ❖ Balança analítica, Salter HA – 120 M ($\pm 0,00001$ g);
- ❖ Micropipetas com volumes reguláveis: 2 a 20 µL ($\pm 0,06$ µL), Ecopipette; 10 – 100 µL ($\pm 0,44$ µL), Wito Pet, Witeg Germany; 1000 µL ($\pm 3,05$ µL) Eppendorf Research;
- ❖ Banho de ultrassons, Soltec®, 3200 MH;
- ❖ Purificador de água – Millipore, Milli-Q® (18 MΩcm)
- ❖ Azoto comprimido, Alphagaz;
- ❖ Material volumétrico de vidro diverso, de classe A

2.2. Reagentes

Foram utilizados reagentes de pureza analítica (p.a) sem qualquer tratamento prévio. As características e respetivas frases de risco e segurança encontram-se em anexo (anexo IV).

- ❖ Metanol, grau HPLC, Merck;
- ❖ Fumarato de anatoxina-a, Trocris (Bristol, UK);
- ❖ Acetato de etilo, qualidade PA, Panreac;

- ❖ Anidrido acético, para GC, Fulka;
- ❖ Piridina, para GC, Fulka;
- ❖ Água ultrapura, Milli-Q (18 MΩcm);
- ❖ Hidrogeno carbonato de sódio, qualidade PA, Panreac;
- ❖ Isobutilcloroformato, 98%, Sigma Aldrich.

2.3. Preparação das soluções

As soluções padrão utilizadas foram obtidas por diluição da solução mãe devidamente preparada e armazenada. A apresentação das incertezas é efetuada com dois dígitos e o número de algarismo significativo da grandeza é dependente da incerteza determinada.

2.3.1. Solução mãe

A solução mãe ($1,00 \pm 0,01$ mg/ml) de Fumarato de anatoxina-a, Trocris (Bristol, UK) foi preparada em água Milli-Q e armazenada em duas aliquotas distintas em vials de vidro âmbar a -20 °C na ausência de luz. A partir destas foram preparadas as soluções de trabalho mediante diluição em água ultrapura e armazenadas em vials âmbar a 4 °C na ausência de luz. Os restos de solução obtidos ao longo do trabalho experimental foram descartados para um bidão em plástico devidamente rotulado.

2.3.2. Solução padrão

Foram preparadas várias soluções padrão de fumarato de anatoxina-a com concentrações compreendidas entre $1,00 \times 10^{-2}$ e $1,00 \times 10^2$ µg/mL. As soluções foram preparadas no dia anterior à análise, devido ao tempo necessário para que se estabeleça o equilíbrio da reação. Preparam-se soluções padrão por diluição direta da solução mãe, no entanto as mais diluídas foram obtidas por diluição de uma solução padrão mais concentrada, chamada de soluções de trabalho de $1,00 \times 10^2$ µg/mL. Na tabela 2.1 são apresentadas as concentrações das soluções padrão, assim como as concentrações ($c_{\text{diluição}}$) utilizadas para preparar as soluções para análise.

Tabela 2.1. Apresentação da concentração das soluções mãe, de trabalho e padrão de fumarato de anatoxina-a preparadas e respetivas incertezas associadas.

Solução	c ± σc (µg/mL)
Solução mãe	1000,00 ± 10,00
Solução de trabalho	100,00 ± 1,13
	160,00 ± 1,60
	100,00 ± 1,09
Soluções padrão	1,00 ± 0,01
	0,500 ± 0,007
	0,150 ± 0,003
	0,100 ± 0,001
	0,0800 ± 0,0012
	0,0500 ± 0,0007
	0,030 ± 0,0005
	0,025 ± 0,0004
	0,010 ± 0,0002

2.3.3. Amostras

As amostras de água doce foram recolhidas em diferentes pontos do Norte de Portugal e a sul da Galiza (rio Minho, rio Lima e lago Zamanes) onde normalmente são utilizadas para consumo direto ou indireto pelo ser humano. As amostras foram recolhidas segundo um processo de amostragem simples, tendo sido tomados 90 mL de amostra diretamente da superfície. O armazenamento foi conduzido no frio e na ausência de luz. Cada amostra foi conservada a -4 ° C até ser analisada num período curto de tempo após a sua recolha.

A amostra de água do rio Tâmega foi recolhida em Marco Canaveses, Portugal, em 1999. Esta amostra de água, existente no laboratório de investigação onde decorreu este trabalho, estava contaminada com microcistinas. Foi armazenada no frio a -22 °C e na ausência

de luz até à realização das análises por SPME-GC/MS. Não sofreu qualquer tratamento prévio antes da sua utilização.

2.3.4 Método de adição externa de padrão

a) Branco fortificado com anatoxina-a

Para se proceder à determinação dos parâmetros de desempenho do método SPME-GC/MS, nomeadamente dos limiares analíticos foi necessário adicionar uma quantidade de padrão a uma amostra de água não contaminada (branco). Realizou-se a adição de anatoxina-a obtendo-se uma concentração de 0,0500 µg/mL na amostra de água não contaminada, (tabela 2.2).

Tabela 2.2. Concentração de anatoxina-a utilizada na adição de padrão à amostra de água não contaminada, branco (c_{trabalho}), volume da solução utilizada na adição do padrão (V_m) e concentração obtida após a adição do padrão (c_i)

$c_{\text{trabalho}} \pm \sigma c$ (µg/mL)	$V_m \pm \sigma V_m$ (µL)	$c_i \pm \sigma c$ (µg/mL)
1,00 ± 0,01	100,00 ± 0,44	0,0500 ± 0,0007

b) Amostras de água com adição de padrão

Para proceder ao estudo do efeito de matriz e aos ensaios de recuperação e assim avaliar a exatidão do método, foram adicionadas diferentes quantidades de padrão às amostras de água do rio Minho, rio Lima, lago Zamanes e rio Tâmega, a partir de soluções padrão de anatoxina-a de concentrações 1,00 e 0,10 µg/mL, preparadas por diluições sucessivas com água ultrapura (1:10) da solução de trabalho de 100,00 µg/mL. Obtiveram-se concentrações finais de 0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Concentração de anatoxina-a utilizada na adição de padrão das amostras (c_{trabalho}), volume da solução utilizada na adição de padrão (V_m) e concentração obtida após a adição de padrão (c_i),.

$c_{\text{trabalho}} \pm \sigma c$ ($\mu\text{g/mL}$)	$V_m \pm \sigma V_m$ (μL)	$c_i \pm \sigma c$ ($\mu\text{g/mL}$)
$1,00 \pm 0,01$	$200,00 \pm 0,75$	$0,10 \pm 0,001$
$1,00 \pm 0,01$	$100,00 \pm 0,44$	$0,050 \pm 0,0007$
$0,100 \pm 0,001$	$600,00 \pm 3,05$	$0,030 \pm 0,0005$

2.1.5. Condições cromatográficas

Neste trabalho foram estudadas as condições desenvolvidas por Rellán et al. [35] para a análise da anatoxina-a por GC/MS. As quais por sua vez resultam da otimização prévia das mesmas, proposta por Himberg [72] e Edwards [61].

Num estudo inicial estas condições foram testadas de forma a comprovar a sua aplicabilidade, neste estudo específico. Uma vez finalizada a verificação das condições experimentais, tanto para o método cromatográfico como para a espectrometria de massa, consideraram-se estas as condições ótimas na aplicação do método SPME-GC/MS na análise da anatoxina-a derivatizada com IBCF em matriz de água ultrapura.

As condições ótimas para proceder às análises da anatoxina-a estão apresentadas na tabela 2.4.

Tabela 2.4. Condições cromatográficas associadas ao sistema GC/MS, testadas em soluções com $1,00 \times 10^2$ $\mu\text{g/mL}$ de fumarato de anatoxina-a derivatizada com 4 μL de IBCF, em água ultrapura.

Parâmetros	Condições
Programa de temperatura do forno	Temperatura inicial: 80 °C Gradiente de temperatura: 15 °C/min Temperatura final: 275 °C
Injeção	5 min Splitless; 250 °C
Intervalo de massas (SCAN)	100-300 u.m.a
Ionização	Impacto eletrônico (70 eV)
Temperatura da interface	280 °C Fonte de ionização: 230 °C Quadrupolo: 150°C
Iões selecionados em modo SIM	m/z 265, 209, 191, 164, 150, 136, 122
Voltagem do electro fotomultiplicador	SIM: 800 volts SCAN: 400 volts
Fluxo da fase móvel	0,9 mL/min
Resolução espectroscópica	Baixa (0,8 u.m.a.)

Capitulo III

Microextração em fase Sólida e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa aplicada na análise da anatoxina-a

3.1. Apresentação e discussão dos resultados

A importância do estudo de diferentes tipos de toxinas, com especial atenção para a anatoxina-a, como contaminantes naturais do meio aquático e de organismos vivos (peixes, moluscos, cães, aves, algas e o homem), encontra-se evidenciada na Introdução deste trabalho. De entre os diversos tipos de toxinas de cianobactérias as anatoxinas são as responsáveis pelos efeitos nocivos a nível neurológico e foi com base nessa toxicidade que surgiu o interesse no seu estudo. A sua crescente incidência, distribuição e os estudos limitados nesta área, levaram a que na atualidade se estudem como mais frequência esta toxina em todo mundo. Com isto justifica-se o objetivo deste trabalho que aqui se apresenta, o qual se centra em aspetos relacionados com o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas para levar a cabo o controlo da anatoxina-a, com um elevado nível de fiabilidade, assim como as condições mais adequadas especialmente no que toca à sensibilidade e seletividade ao analito.

Quando se pretende abordar estudos analíticos deve se dar especial atenção à natureza do analito, ao tipo de matriz onde este se encontra e ainda os níveis de concentração em que ele existe para selecionar a técnica analítica de extração e a forma de deteção mais eficazes. A matriz de água ultrapura será utilizada na otimização da etapa de preparação de amostra e na validação do método de forma a testar a aplicabilidade do acoplamento das técnicas (SPME-GC/MS), sem que a presença de componentes endógenos possam interferir nas análises. Contudo num trabalho posterior poderá testar-se a aplicabilidade do método SPME-GC/MS na análise da anatoxina-a presente em matrizes complexas, principalmente a nível dos vestígios.

De um modo geral os objetivos destacados e que estruturam sequencialmente o presente trabalho são os seguintes:

1. Verificação das condições cromatográficas ótimas a utilizar na análise da anatoxina-a pelo método SPME-GC/MS, tendo como ponto de partida as condições propostas por Rellán et al [35]. Esta etapa inclui a verificação da eficiência da reação de derivatização, as condições cromatográficas e a deteção mediante Espectrometria de Massa
2. Avaliação dos parâmetros experimentais que afetam diretamente a extração da anatoxina-a por SPME-GC/MS.

3. Estudo da eficiência do sistema SPME-GC/MS na análise da anatoxina-a em água, derivatizada com IBCF, em termos de precisão, limites de detecção e quantificação e linearidade.

4. Aplicação do método SPME-GC/MS na análise de diferentes matrizes de água de rios.

A execução dos objetivos anteriormente descritos permitirá dispor de dados suficientes para avaliar a eficiência na determinação da anatoxina-a pela metodologia analítica proposta.

3.2. Desenvolvimento e otimização do método SPME-GC/MS

3.2.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando uma solução contendo anatoxina-a derivatizada com IBCF de concentração 100,00 µg/mL. Em função dos resultados obtidos estudou-se a eficiência deste tipo de derivatização, bem como a aplicação das mesmas na análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS.

Na figura 3.1 apresenta-se um cromatograma correspondente à análise da solução de concentração de $100,00 \pm 1,00$ µg/mL de fumarato de anatoxina-a derivatizada com IBCF por SPME-GC/MS assim como os seus respetivos espectros de massas, obtidos em modo SCAN e modo SIM.

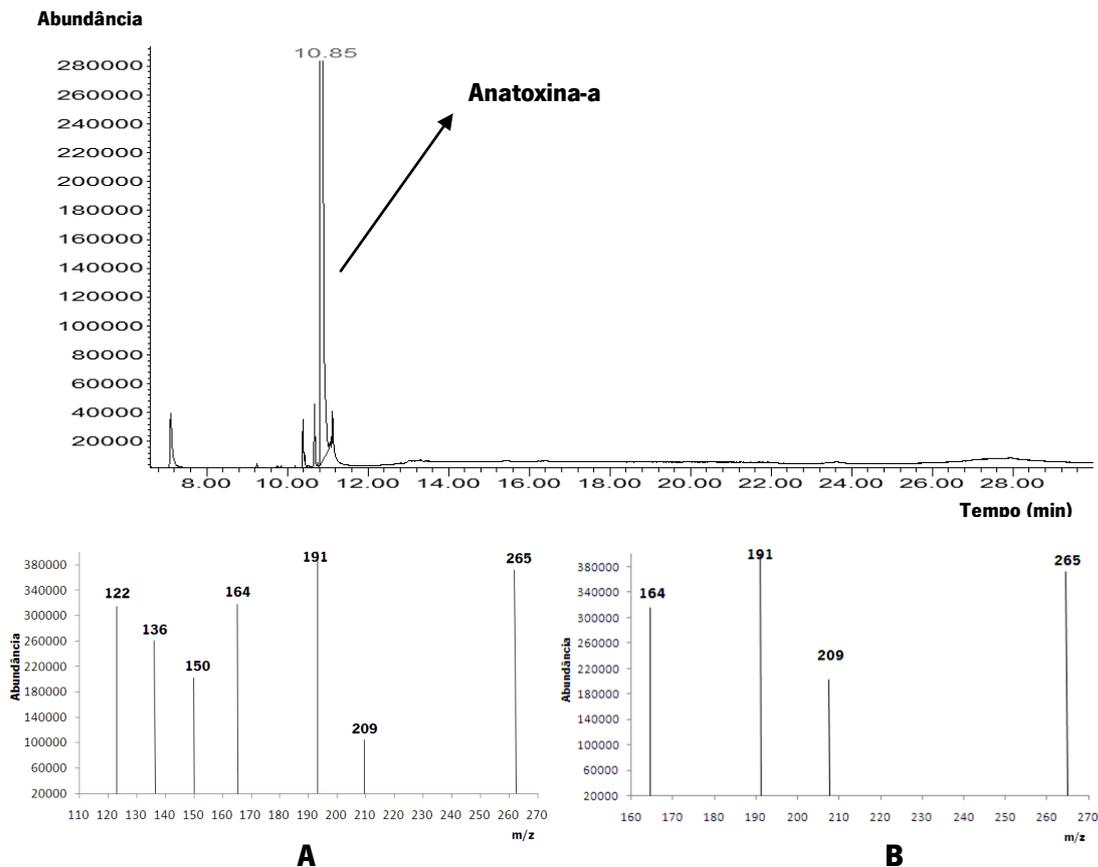


Figura 3.1. Cromatograma correspondente a análise de uma solução de anatoxina-a derivatizada com IBCF por SPME-GC/MS ($c = 1,00 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$) e respectivos espectros de massas obtidos em modo SCAN (A) e modo SIM (B).

No cromatograma apresentado na figura 3.1, o pico mais intenso (pico base) corresponde ao íon com razão massa/carga de 265 cuja formação pode ser explicada pelo mecanismo de fragmentação da anatoxina-a derivatizada com IBCF, apresentado na figura 3.2 A. O espectro de massa da figura 3.2 A foi obtido pelo método SCAN, no intervalo de massas de 100 a 300.

A análise pelo modo SIM tem como vantagem, analisar apenas os íões que apresentam uma massa/carga que está compreendida numo intervalo fixado, aumentando assim a seletividade e sensibilidade do método. Neste trabalho foram selecionados para a identificação da anatoxina-a os íões resultantes da fragmentação do íão molecular nomeadamente os que apresentam $m/z = 265, 209, 191$ e 164 (ver figura 3.1B). Na figura 3.2 encontram-se os mecanismos de fragmentação para os íões ($164, 191, 209$ e 265) selecionados para a análise no modo SIM.

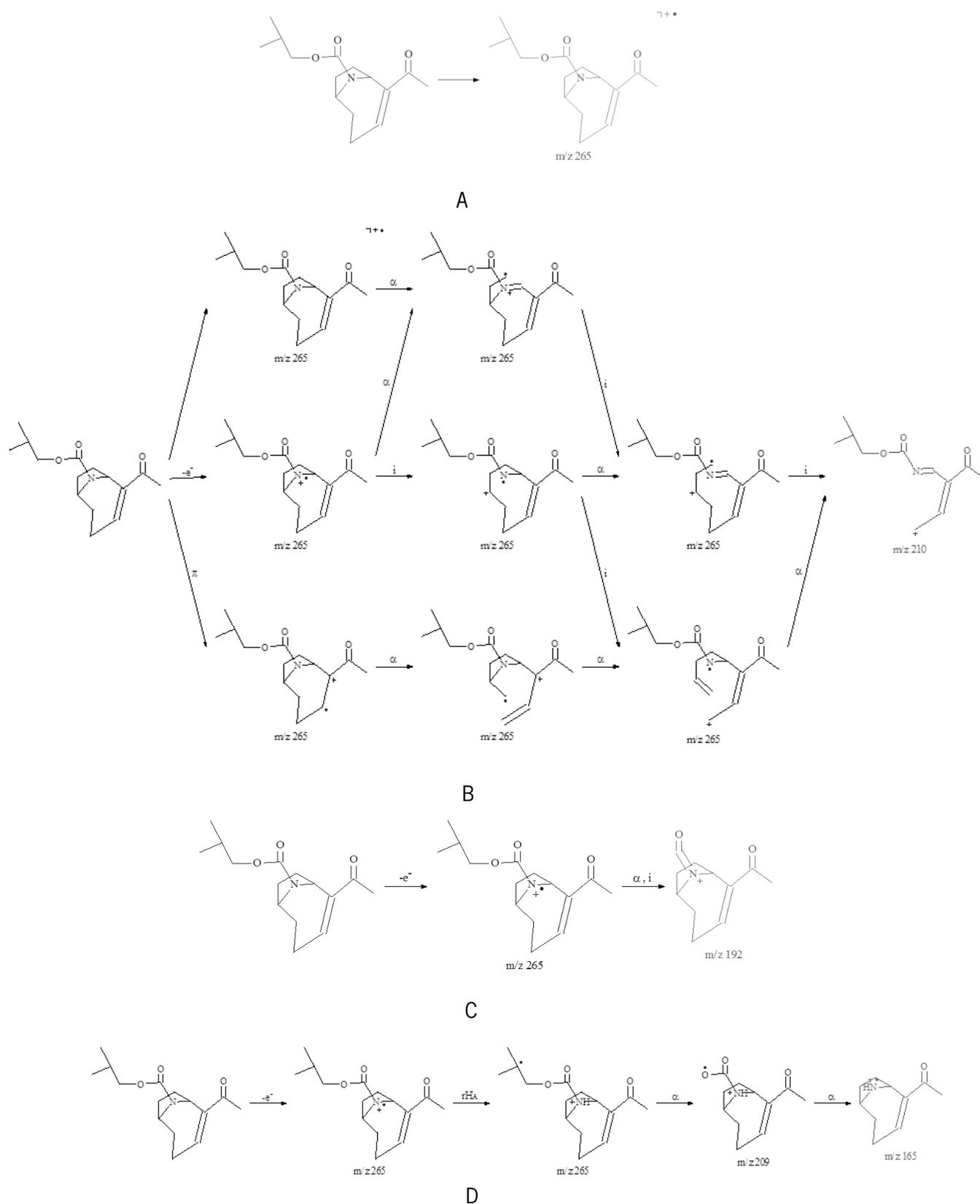


Figura 3.2. Mecanismos de fragmentação da anatoxina-a derivatizada com IBCF originando os íões de m/z: A) 265, B) 209, C) 191 e D) 164 propostos pelo software *Mass Frontier 1.0*.

Ao proceder à análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS recorrendo à ionização positiva no detetor de massas, pelo método SIM, obtém-se o pico mais intenso de razão massa/carga de 265 cuja formação se explica pelo mecanismo apresentado na figura 3.2A. A análise do mecanismo da figura 3.2B, indica que ocorreu a perda de um grupo $\bullet\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ pela abertura do anel, devido à deslocalização eletrónica no mesmo. Neste mecanismo ocorre a formação do ião de menor intensidade de m/z 209. A figura 3.2C demonstra a formação o segundo componente de maior intensidade (m/z 191), onde decorre apenas a perda de $\bullet\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Por último, o aparecimento do ião de m/z 164 deve-se simplesmente à perda do grupo isobutilcloroformato. Este último pertence à forma ionizada da anatoxina-a.

3.2.2. Reação de derivatização

A aplicação da técnica SPME-GC/MS na análise e determinação da anatoxina-a em água é relativamente recente e requer a otimização de um conjunto de etapas sequenciais para a sua elaboração correta. A primeira a considerar é a reação de derivatização do analito. Esta etapa, elaborada antes ou durante a extração da anatoxina-a possibilita uma maior sensibilidade e seletividade, tanto no passo de extração como na deteção da neurotoxina. Torna a reação mais seletiva, acompanhada pela produção do análogo específico e torna a reação mais livre de interferências na quantificação. É com base nestes pressupostos que se baseiam as vantagens do uso da derivatização na determinação de uma variedade de analitos em matrizes complexas [94].

A reação de derivatização é o procedimento analítico que consome o período de tempo mais extenso desta análise. Apesar de não passar de um tratamento químico da amostra, onde se estabelece a substituição dos átomos de hidrogénio ativos da estrutura química (ou apenas de alguns dos grupos mais reativos) por grupos funcionais que tornam o analito com características mais adequadas. Na generalidade é importante e desejável que esta substituição se estabeleça de forma rápida, com o menor número de reagentes e passos de reação. É fundamental que ao escolher o agente derivatizante se reúnam as condições físico - químicas para a análise por GC/MS, tanto em termos de volatilidade e estabilidade térmica do produto final. No caso da anatoxina-a, a sua polaridade intermédia faz com que seja necessária a etapa de derivatização de modo a torna-la mais hidrofóbica e volátil. Além disso, vista a diferença de polaridades entre a fibra PDMS e a anatoxina-a é fundamental utilizar o tratamento prévio da mesma, para que esta se converta numa forma apolar e seja adsorvida à superfície da fibra. Tal

facto foi comprovado com alguns testes, onde não se obteve qualquer sinal cromatográfico, na ausência do agente derivatizante.

Existem diferentes protocolos que permitem levar a cabo a derivatização da anatoxina-a em meio aquoso e neste trabalho foram analisados dois deles: i) derivatização com anidrido acético e piridina [61] e ii) derivatização com IBCF em meio aquoso tamponado [93]. Iniciou-se o trabalho testando a derivatização utilizada anteriormente por Sandra Rellán, 2009, na determinação da anatoxina-a por SPME-GC/MS. Esta reação é mais sensível e é utilizada na maioria dos métodos descritos na bibliografia [95] e consiste na acetilação da anatoxina-a formando um produto mais volátil, a n-acetilanatoxina-a. A derivatização foi efetuada com 200 μ L de solução padrão de fumarato de anatoxina-a (1000 ppm) que foram levados à secura com corrente de azoto. O resíduo foi redissolvido em 200 μ L de uma mistura de anidrido acético/piridina (1:1) e deixou-se a reação decorrer durante 12 horas à temperatura ambiente e na ausência de luz [61]. Contudo, devido à instabilidade da n-acetilanatoxina-a na presença da piridina, removeu-se o excesso com uma corrente suave de azoto e por fim redissolveu-se a n-acetilanatoxina-a em 400 μ L de acetato de etilo [35].

Os primeiros ensaios foram aplicados diretamente às soluções derivatizadas (80 μ g/mL de fumarato de anatoxina-a) por injeções diretas no GC/MS. Os primeiros resultados obtidos, utilizando este método de derivatização, demonstraram que a resposta obtida não era satisfatória, mesmo após a tentativa de otimização da resolução cromatográfica alterando os diferentes parâmetros cromatográficos. Da análise do cromatograma da figura 3.3, obtido pelo método SIM ($m/z=207$), pode observar-se que ocorreu o fenómeno de adsorção da n-acetilanatoxina-a à coluna e que o pico apresenta uma baixa resolução.

Na figura 3.4 encontra-se o espectro de massa referente à análise em modo SIM ($m/z = 207$) para a anatoxina-a derivatizada com uma mistura de anidrido acético piridina. E através deste pode comprovar-se a presença do ião que caracteriza o derivado n-acetilanatoxina-a em solução bem como dos fragmentos que constituem a molécula após a análise no modo SIM, seleccionando os iões de $m/z = 207, 165, 150, 136$ e 122 . Neste caso foram seleccionados para a identificação da anatoxina-a derivatizada com anidrido acético e piridina os iões resultantes da fragmentação do ião molecular nomeadamente os que apresentam $m/z = 207, 165, 150$ e 136 e 122 .

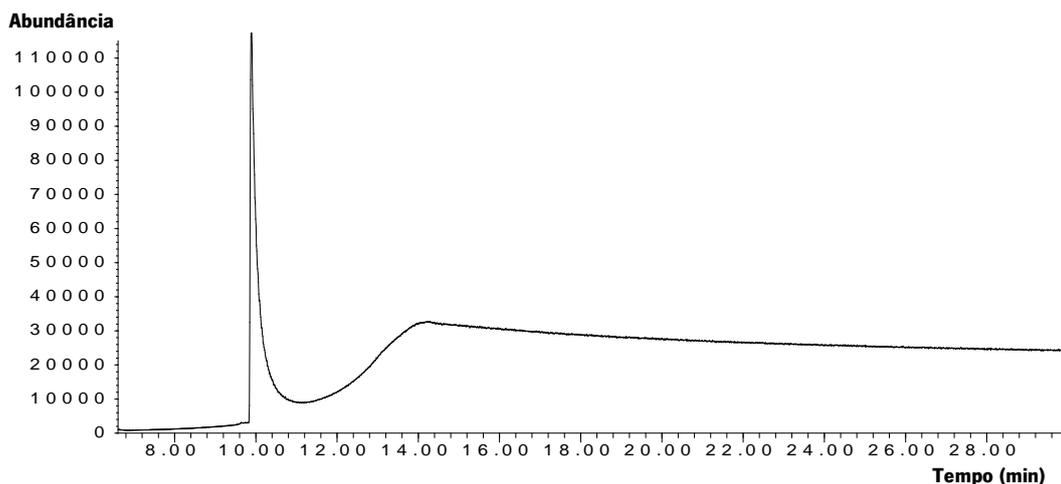


Figura 3.3. Cromatograma correspondente à análise de uma solução de concentração 160 $\mu\text{g/mL}$ de fumarato de anatoxina-a derivatizada com uma mistura de anidrido acético/piridina (1:1) por GC/MS, no modo SIM ($m/z = 207$).

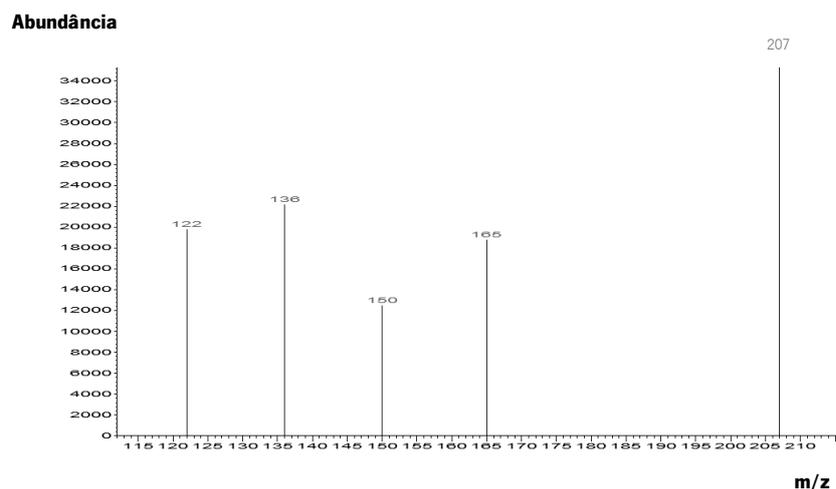


Figura 3.4. Espectro de massa relativo à análise de uma solução de concentração 160 $\mu\text{g/mL}$ de fumarato de anatoxina-a derivatizada com uma mistura de anidrido acético/piridina (1:1) por GC/MS, no modo SIM ($m/z = 207$).

Tendo em conta o espectro de massa da anatoxina-a derivatizada da figura 3.4, juntamente com o cromatograma da figura 3.3 conclui-se que este tipo de derivatização não foi eficiente na extração da anatoxina-a. Para suportar esta ideia verificou-se com o auxílio do software do equipamento do GC/MS, a pureza do respetivo pico e comprovou-se que a pureza do pico correspondente ao pico molecular ($m/z = 207$) era baixa.

A partir das conclusões tiradas do estudo anterior, alteram-se alguns parâmetros experimentais para permitir melhorar tanto a resolução do pico como a estabilidade do derivado. Para o efeito começou-se pela alteração do agente derivatizante e na introdução da técnica de

purificação da amostra de água (SPME). Optou-se em primeiro lugar pela seleção de um método de derivatização alternativo que fosse mais simples e rápido para a análise da anatoxina-a. Nesta abordagem considerou-se a aplicabilidade dos alquilcloroformatos como agentes derivatizantes e a sua capacidade de reagir com aminas à temperatura ambiente, podendo ser convertidas facilmente a carbamatos em meio aquoso [95].

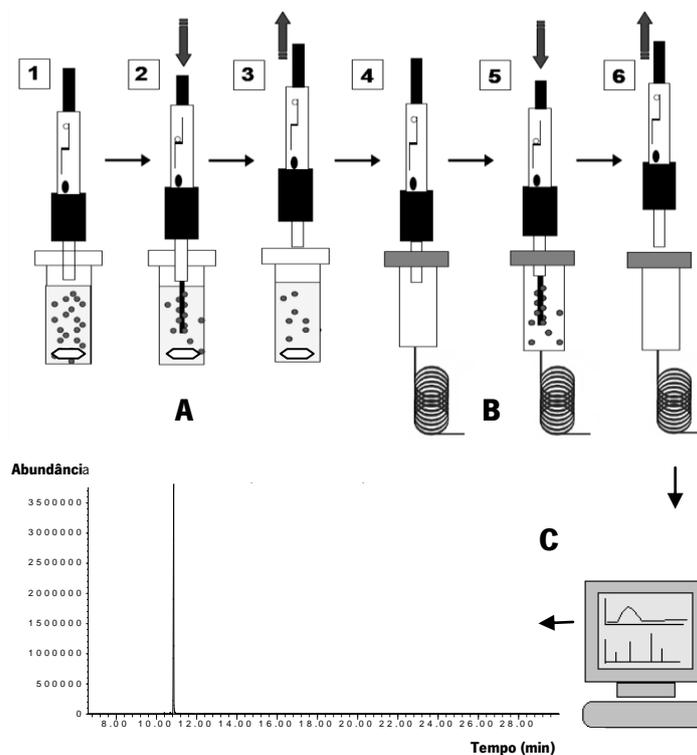


Figura 3.5. Representação esquemática das diferentes etapas que constituem o processo de microextração em fase sólida da anatoxina-a derivatizada com IBCF: A) processo de adsorção; B) desorção na entrada do injetor e C) Cromatograma obtido pela análise da anatoxina-a (100,00 µg/ml) derivatizada com 4 µL de IBCF, por SPME-GC/MS.

O procedimento adotado por Rodriguez et al, aplicado neste trabalho, consistiu na introdução de 200 mg de hidrogenocarbonato de sódio ($c_i = 100$ mg/ml), 4 µL de isobutilcloroformato (IBCF) de concentração final de 1950 µg/mL e adição de água ultrapura perfazendo um volume total de 2 mL de solução, dentro de um vial de 4 mL. O vial selado é colocado no ultrassons durante 10 minutos e armazenado à temperatura ambiente e na ausência de luz até ao dia seguinte. A microextração em fase sólida é efetuada por imersão direta da fibra PDMS de 100 µm na solução, com um tempo de extração de 20 min sob agitação magnética constante. Após a extração o dispositivo é diretamente inserido na entrada do injetor (250 °C), com um tempo de desorção de 20 min [93]. A figura 3.5 ilustra de forma sucinta o

processo adotado, como também o cromatograma obtido pela derivatização da anatoxina-a com IBCF.

Como se pode observar no cromatograma da figura 3.5 a cinética da reação é favorecida pela utilização do IBCF apresentando várias vantagens face ao primeiro processo de derivatização estudado. Uma vantagem consiste na melhor resposta quer em termos de resolução e quer em termos de intensidade de pico obtida. Outra vantagem reside no facto deste método de derivatização ser mais simples e evitar etapas como a evaporação inicial do solvente e a evaporação intermédia destinada a eliminar a piridina em excesso do meio, etapa que interfere negativamente na reprodutibilidade final dos resultados no primeiro método de derivatização.

Uma vez selecionado o método adequado de derivatização, cuja reação está esquematizada na figura 3.6, testaram-se vários parâmetros experimentais para otimizar a extração. Um dos parâmetros analisados foi a quantidade necessária de reagente a utilizar de forma a garantir que a anatoxina-a presente em amostras de água reagisse de forma completa.

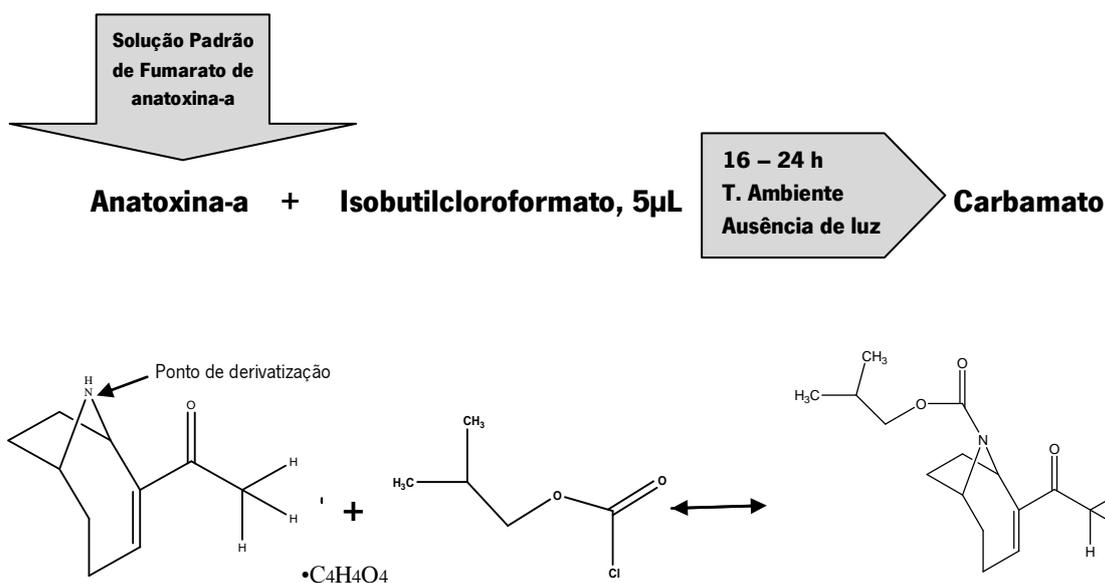


Figura 3.6. Esquema da reação de derivatização da anatoxina-a com isobutilclorofornato para a sua posterior análise por SPME-GC/MS.

3.2.3. Estabilidade do derivado utilizando água como matriz

A maior parte das reações de derivatização utilizam reagentes apolares que não são diretamente compatíveis com a água. Contudo os clorofornatos têm sido aplicados como

agentes derivatizantes na conversão de aminas em carbamatos em meio aquoso tamponado. Estas reações procedem de forma rápida à temperatura ambiente e aplicam-se frequentemente na análise de aminas por vários tipos de métodos. De entre vários tipos de agentes de derivatização, o isobutilcloroformato (IBCF) revelou ser o reagente de eleição no que toca à derivatização de aminas, tendo em conta o compromisso entre o facto de ser um derivatizante de massa elevada e por conferir uma elevada estabilidade [96].

Apesar de apresentar estas características, este agente derivatizante quando aplicado na derivatização de aminas necessita de um período de estabilização antes que seja atingido o equilíbrio da reação. Ao iniciar a aplicação deste derivatizante, observou-se uma instabilidade do mesmo que impedia a execução imediata da análise das soluções. Tal instabilidade derivava apenas da incompatibilidade entre o agente e a matriz. Este problema foi resolvido levando cada solução preparada ao banho de ultrassons durante 10 min e deixando reagir num período de tempo entre 8 e 24 h. Posteriormente foi estudado o tempo de reação ideal para atingir o equilíbrio da reação.

3.3. Desenvolvimento e otimização do método SPME-GC/MS

O desenvolvimento do método de SPME-GC/MS para a análise da anatoxina-a requer a otimização de uma serie de parâmetros que afetam tanto a etapa de extração, como a derivatização sobre a fibra ou na posterior desorção da anatoxina-a.

A otimização foi conduzida utilizando água ultrapura à qual se adiciona a solução padrão de fumarato de anatoxina-a e o agente derivatizante. Para a extração, a fibra foi submersa manualmente (imersão direta) no vial da solução para análise. O processo de transferência de massa foi otimizado introduzindo um agitador magnético (agitação constante) dentro do vial selado com papel de alumínio. Por fim, a fibra com a anatoxina-a derivatizada foi colocada na interface de SPME-GC/MS durante um tempo determinado para decorrer a desorção.

3.3.1. Seleção do tipo de fibra de SPME na extração da anatoxina-a

Um dos componentes principais constituintes da fibra é a fase estacionária, sendo determinante que exista afinidade entre o analito e a fibra de extração. Neste âmbito é importante a seleção da fase estacionária mais apropriada, já que este fator afeta a eficiência da extração, bem como a sensibilidade do método.

Para este estudo foi escolhida a fibra de PDMS (100 μm), por ser a que se encontrava disponível no laboratório, mas também por ser aquela que satisfaz os requisitos necessários para uma extração eficiente da anatoxina-a. Uma outra possibilidade consistia na utilização da fibra mista de PDMS/DVB, pois permitia a extração de componentes voláteis e não voláteis, de baixa e elevada polaridade. A mistura de filmes poliméricos aumenta a capacidade de retenção à fase estacionária, principalmente para analitos de baixo peso molecular.

3.3.2. Otimização das condições de desorção

A otimização do processo de desorção é uma etapa importante na qual se deve assegurar a completa desorção dos analitos e evitar o possível efeito de “carry-over”, que pode afetar extrações posteriores [97, 98]. O principal responsável pelo processo é o revestimento polimérico que deve inicialmente ser ativado a uma temperatura constante num tempo determinado (1 hora a 250 °C no caso da fibra PDMS). Por outro lado, a temperatura máxima de desorção é limitada pela estabilidade do revestimento polimérico (reportado pelo fabricante). Deste modo, a desorção é otimizada assumindo um compromisso para a temperatura do injetor que deve considerar a temperatura permitida pela fibra e a volatilidade dos analitos. As temperaturas recomendadas e atualmente utilizadas para os vários tipos de fibras encontram-se apresentadas na tabela 3.1

Tabela 3.1. Temperaturas recomendadas e algumas características inerentes para a utilização dos diferentes tipos de fibras em GC/MS [86].

Tipo	Composição química	Espessura do filme (μm)	ΔT (°C)	Aplicação
Não-polares	PDMS	100;	200 – 270 °C	Compostos apolares e polares.
		30;		
		7	220 – 320 °C	
Polares	PA	85	220 – 310 °C	Média ou elevada polaridade. Voláteis de média a alta polaridade.
	CW-DVB	65	200 – 260 °C	
Bi-polares	PDMS-DVB	65	200 – 270 °C	Voláteis e não voláteis de baixa e alta polaridade.
	Carboxen-PDMS	75	—	

As condições de desorção foram estipuladas considerando o tempo de desorção de 20 min, tempo suficiente para que ocorra a detecção da anatoxina-a (aproximadamente aos 11 min), uma temperatura de 250 °C na entrada do injetor e uma temperatura máxima de análise de 275 °C.

3.3.3. Otimização da extração da anatoxina-a

No que diz respeito à microextração em fase sólida, a quantidade de analito extraída pela fibra não depende apenas da polaridade e da espessura da fase estacionária, mas também do tempo de extração e da concentração de analito presente na solução. Essa extração é também melhorada pela agitação, adição de sal, alteração do pH e em determinados casos pela temperatura. O tempo de extração encontra-se principalmente afetado pela velocidade de agitação e pelo coeficiente de partição do analito entre o revestimento da fibra e a matriz aquosa. Na SPME a sensibilidade máxima é obtida quando se atinge o equilíbrio da transferência de massa. No entanto para que seja atingido o equilíbrio e de modo a obter análises com maior fiabilidade e precisão, é necessário o auxílio de agitação e a adição de sal, acelerando ambos o processo de transferência de massa [99]. Como se tratam de variáveis que afetam diretamente a extração, devem ser estudadas de forma a serem bem controladas. Como forma de otimizar a SPME, foram avaliadas todas as variáveis que possam afetar direta ou indiretamente a sua eficiência, tais como: i) força iônica; ii) quantidade de derivatizante; iii) tempo de reação; iv) tempo de extração e v) velocidade de agitação.

3.3.3.1. Estudo do efeito da força iônica

O efeito da adição de sal de modo a aumentar a quantidade máxima de analito a extrair por SPME foi estudado em detalhe por diversos autores [97, 98]. A adição de sal a soluções para posterior análise por SPME é bem conhecida como a forma de melhorar a extração de componentes orgânicos a partir de soluções aquosas, sendo portanto difíceis de extrair. Quando os analitos se encontram na sua forma dissociada pode observar-se uma diminuição da quantidade extraída, é portanto importante converter o analito na sua forma neutra antes de proceder à extração. Tendo em conta que a anatoxina-a possui um pka de 9,6, a extração deve ser desenvolvida a pH 10 para que se obtenha assim a sua forma neutra, ou seja, tornar a solução alcalina para que se possa extrair a forma básica em que se encontra a anatoxina-a.

Teoricamente, quanto maior a concentração de sal, maior a constante de equilíbrio fibra/água (K^{FW}) e a quantidade extraída [98]. Deste modo, o efeito da força iônica sob a extração da anatoxina-a foi estudado preparando várias alíquotas de 2 mL de água ultrapura com concentração 0,500 $\mu\text{g/mL}$ de anatoxina-a. É seguindo um procedimento padrão [93], variando a quantidade de hidrogenocarbonato de sódio adicionada: 100, 200 e 300 mg (concentração final de sal na solução para análise: 50, 100 e 150 mg/mL, respetivamente). Os valores das áreas do pico obtidos por GC/MS estão apresentados na tabela 3.2. Cada amostra foi analisada em triplicados.

Tabela 3.2. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação da massa de NaHCO_3 na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, de concentração 0,500 \pm 0,007 $\mu\text{g/mL}$.

Massa NaHCO_3 (mg \pm 0,01 mg)	A \pm σA
0	0
100,00	(14,6 \pm 5,5) $\times 10^4$
200,00	(28,0 \pm 4,0) $\times 10^4$
300,00	(27,7 \pm 7,5) $\times 10^4$

Como o objetivo era determinar a quantidade de sal que permita extrair uma elevada quantidade de anatoxina-a sem comprometer significativamente o tempo de vida da fibra PDMS, iniciou-se a análise de soluções por ordem crescente em concentração de sal. A figura 3.7 apresenta o efeito da variação da concentração de NaHCO_3 (efeito salting out), na extração da anatoxina-a derivatizada com IBCF por SPME-GC/MS.

O perfil de extração apresentado na figura 3.7 é o esperado, uma vez que existe uma proporcionalidade entre a quantidade de NaHCO_3 adicionada e a área de pico obtida para a anatoxina-a, até atingir o ponto de saturação da solução quando se adiciona uma elevada concentração de sal (superior a 200 mg/mL). Deste estudo verifica-se ainda que 200 mg de NaHCO_3 é a quantidade necessária para que ocorra a transferência máxima da anatoxina-a, da matriz aquosa para a superfície da fibra de PDMS. É importante referir que quantidades superiores a 200 mg de NaHCO_3 apenas vão dificultar o contacto da anatoxina-a com a fibra,

para além de causar a deterioração prematura da fase estacionária. Por esta razão, após a desorção, a fibra deve ser cuidadosamente lavada com água ultrapura para retirar restos de sal e aumentar assim o seu tempo de vida útil.

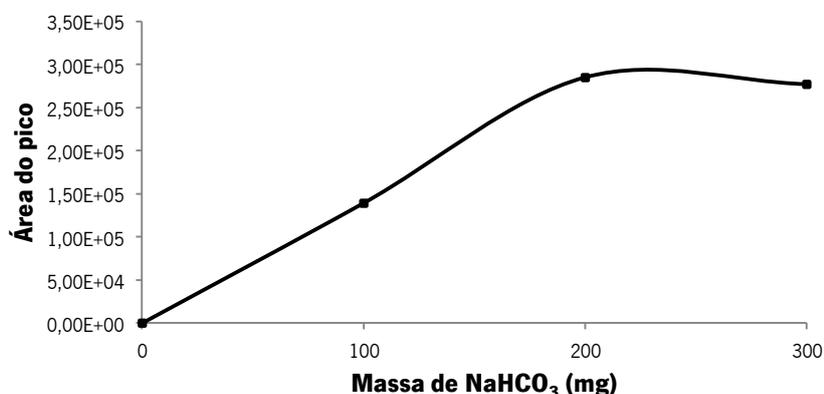


Figura 3.7. Estudo do efeito da adição de NaHCO₃ na extração da anatoxina-a ($0,500 \pm 0,007$ µg/mL) derivatizada com 4 µL de IBCF, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), num volume total de solução de 2 mL.

3.3.3.2. Otimização da quantidade de derivatizante

Num procedimento de derivatização transformam-se componentes polares numa forma mais volátil e hidrofóbica, antes de proceder à análise por SPME-GC/MS, melhorando também a eficiência da extração pela fibra PDMS. De facto, em estudo iniciais com a anatoxina-a verificou-se que esta praticamente não se adsorvia à superfície da fibra de PDMS mesmo para elevadas concentrações de analito. Foi necessário derivatizar a anatoxina-a com o IBCF convertendo-a num carbamato em meio básico à temperatura ambiente.

Nos primeiros estudos com a anatoxina-a por SPME-GC/MS, pretendeu-se determinar o volume ótimo para derivatizar a anatoxina-a e foi utilizada uma quantidade de IBCF de 4 µL, tempo de extração de 20 min sob agitação constante, para assegurar o processo de derivatização e extração. A reação de derivatização foi realizada preparando as soluções ($c = 0,100$ µg/mL) num volume total de 2 mL de água ultrapura num vial de 4 mL, adicionando 200 mg de NaHCO₃ e variando o volume de IBCF: 5, 10, 15 e 20 µL ($c_i = 2633, 5265, 7898$ e 10530 µg/mL). Na figura 3.8 apresenta-se os cromatogramas relativos ao primeiro estudo da variação do volume de IBCF adicionado à solução padrão de $0,100$ µg/mL de anatoxina-a.

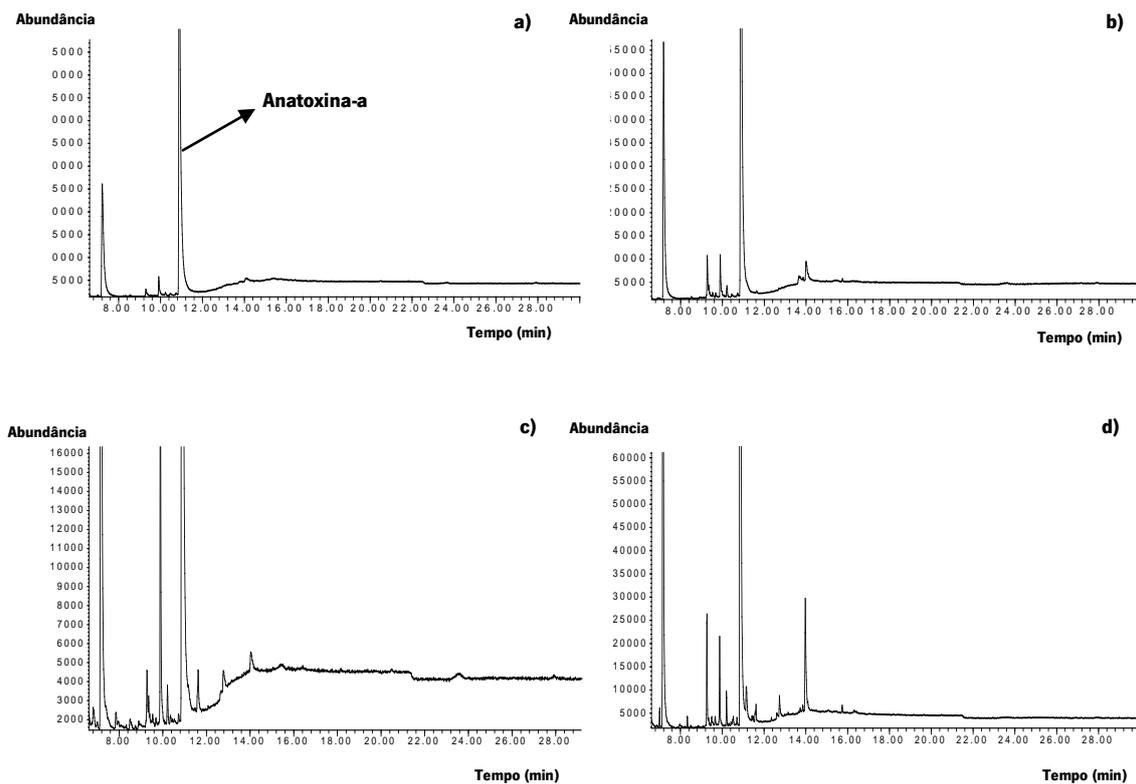


Figura 3.8. Cromatogramas relativos ao estudo do efeito do volume de IBCF na eficiência da extração da anatoxina-a ($0,100 \mu\text{g}/\text{mL}$) por SPME-GC/MS: a) 5; b) 10; c) 15 e d) 20 μL , para tempo de reação entre 16 - 24h, 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), num volume total de solução de 2 mL.

Na figura 3.9A apresenta-se o efeito do volume do agente derivatizante na extração da anatoxina para uma gama de volume mais reduzida. Como a extração aumentou com o volume de IBCF até 5 μL , decrescendo para valores superiores e aumentando mais abruptamente a partir de 15 μL , optou-se por reduzir o volume de IBCF para analisar esse efeito na extração. Os valores seleccionados foram: 2, 5, 8 μL ($c_i = 1053, 2633, 4212 \mu\text{g}/\text{mL}$) e os resultados estão apresentados na figura 3.9B. Os valores das áreas do pico determinados por SPME-GC/MS estão apresentados na tabela 3.3. Cada um dos volumes foi analisado em triplicado.

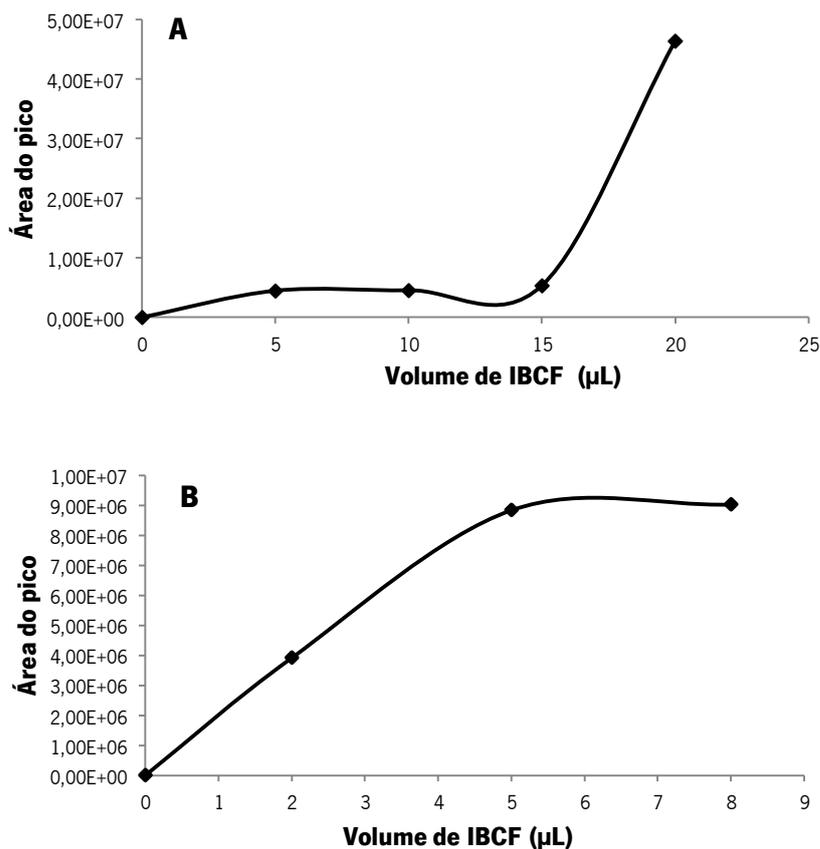


Figura 3.9. Estudo do efeito da variação do volume de IBCF na eficiência da extração da anatoxina-a (0,100 µg/mL) usando uma fibra PDMS de 100 µm, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), volume total de solução de 2 mL, para um volume de IBCF adicionado: A) Estudo na gama entre 0 e 20 µL; B) Estudo na gama entre 0 e 8 µL.

No geral para volumes mais elevados (superior a 15 µL) ocorre uma forte interação do agente com a fase estacionária de PDMS. A resposta acaba por se tornar instável (maior variabilidade dos valores obtidos para as áreas de pico) para concentrações de IBCF elevadas em solução, devido ao excesso de cloreto dissolvido na matriz. Tal comportamento promove o ataque do suporte epóxico que mantém aderido o polímero de polidimetilsiloxano ao suporte interior de sílica, fazendo com que o seu tempo de vida diminua drasticamente. Nos cromatogramas obtidos, figura 3.8, verifica-se o fenómeno do ataque do IBCF, pelo aparecimento de uma elevada densidade de picos à medida que se aumenta o volume adicionado. Analisando a figura 3.9B conclui-se que a utilização de 5 µL de IBCF (2653 µg/ml) garante a existência de reagente suficiente para a derivatização da anatoxina-a (0,100 µg/mL), sem que o ligeiro excesso, afete a fibra. É importante evidenciar que para volumes de IBCF

superiores a 5 μL existe uma maior variação para a quantidade extraída entre diferentes análises, o que induz o aumento do desvio associado.

Tabela 3.3. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação de IBCF na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a, para uma concentração final na solução de $0,100 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$.

V IBCF ($\mu\text{L} \pm 0,06 \mu\text{L}$)	A $\pm \sigma A$
0	0
2,00	$(39 \pm 25) \times 10^5$
5,00	$(88 \pm 76) \times 10^5$
8,00	$(90 \pm 82) \times 10^5$
10,00	$(45 \pm 33) \times 10^5$
15,00	$(53 \pm 14) \times 10^5$
20,00	$(46 \pm 55) \times 10^6$

De seguida pretendeu-se determinação da gama de concentração de anatoxina-a que podia ser derivatizada com 5 μL de IBCF. Como demonstra a figura 3.10, a área de pico máxima foi obtida para uma concentração próxima de 5,00 $\mu\text{g/mL}$. É importante evidenciar que para a derivatização de concentrações muito baixas de anatoxina-a o volume deve ser reduzido.

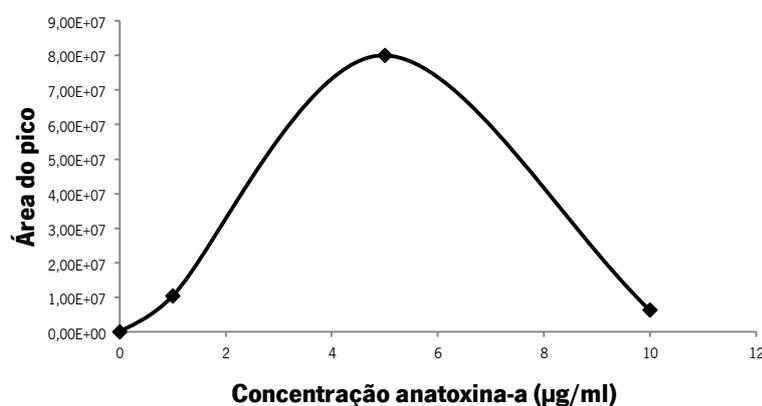


Figura 3.10. Representação do estudo da variação de concentração de anatoxina-a derivatizada com 5 μL de IBCF, 200 mg de NaHCO_3 , tempo de reação entre 16 - 24h, 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL.

3.3.3.3. Otimização do tempo de reação

O tempo de reação é um dos parâmetros que, apesar de não influenciar diretamente a extração, é um complemento para a melhoria da eficiência. Como já foi mencionado anteriormente uma das características do agente derivatizante é a insolubilidade em água, sendo essencial determinar se o agente derivatizante atua de forma imediata ou se necessita de um determinado tempo de estabilização antes de proceder à análise. Assim, é fundamental determinar o intervalo de tempo em que as soluções preparadas se mantêm estáveis até ser analisadas.

Para o estudo da influência do tempo de desenvolvimento da reação de derivatização prepararam-se simultaneamente várias soluções com concentração de 1,0 µg/mL, efetuando apenas uma análise para diferentes tempos de reação: 2, 4, 6, 8, 16 e 24 horas. As soluções foram armazenadas à temperatura ambiente e na ausência de luz até serem analisadas por SPME-GC/MS. Os valores das áreas do pico obtidos na análise por SPME-GC/MS estão apresentados na tabela 3.4. Cada um dos volumes foi analisado apenas uma vez. Os resultados do estudo encontram-se apresentados na figura 3.11.

Tabela 3.4 Resultados obtidos no estudo do efeito da variação do tempo de reação na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, para uma concentração final na solução de $1,00 \pm 0,01$ µg/mL.

Tempo (horas)	A
2	54×10^6
4	48×10^6
6	26×10^6
8	75×10^6
16	68×10^6
24	81×10^6

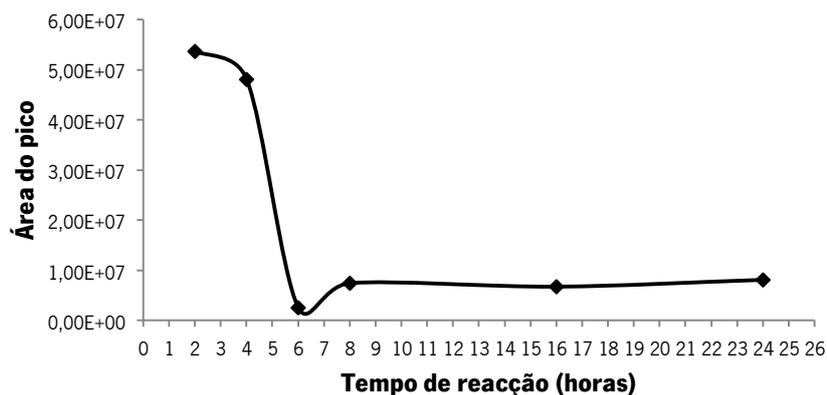


Figura 3.11. Estudo do efeito do tempo de reação na eficiência da extração da anatoxina-a (1,00 µg/mL) usando uma fibra PDMS de 100 µm, 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL.

Como se pode observar na figura 3.11 e com auxílio da tabela 3.4, a quantidade de derivado formado é máxima nas primeiras horas de reação, no entanto o cromatograma apresenta uma dispersão elevada de picos indicando o ataque por parte do IBCF à fibra PDMS. A partir de 8 h de reação começa a existir uma concordância entre os valores de área de pico obtida para a anatoxina-a derivatizada, indicativo da estabilidade e equilíbrio da reação. O equilíbrio da reação de derivatização da anatoxina-a é apenas atingido após várias horas de reação, principalmente devido à baixa solubilidade do IBCF em água. Como tal é necessário um maior período de tempo de contacto entre derivatizante e o meio aquoso alcalino e a anatoxina-a.

É importante frisar que apesar de ser ter obtido uma área de pico elevada após 2 h de reação, a pureza da anatoxina-a derivatizada ainda é baixa (ou seja o analito não é apenas extraído na forma derivatizada). Este facto foi avaliado pelo aparecimento de picos relativos à extração do IBCF no cromatograma apresentado na figura 3.12. Foi concluído que o período de tempo de estabilização a considerar fosse superior a 8 horas, a fim de minimizar o ataque do IBCF, como se pode constatar pelas figuras 3.12 e 3.13. Outro aspeto importante está no aumento substancial da eficiência da extração se forem feitas análises em amostras quando estas não excedam as 16 a 24 horas de reação.

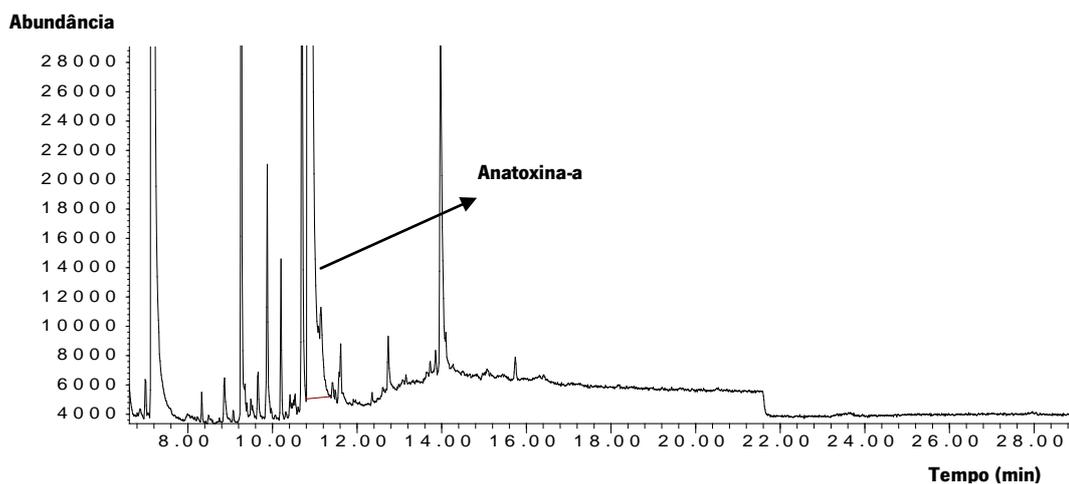


Figura 3.12. Cromatograma relativo a extração da anatoxina-a (1,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por SPME-GC/MS, após 2 horas de reação, 5 μL de IBCF, 200 mg de NaHCO_3 , 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL.

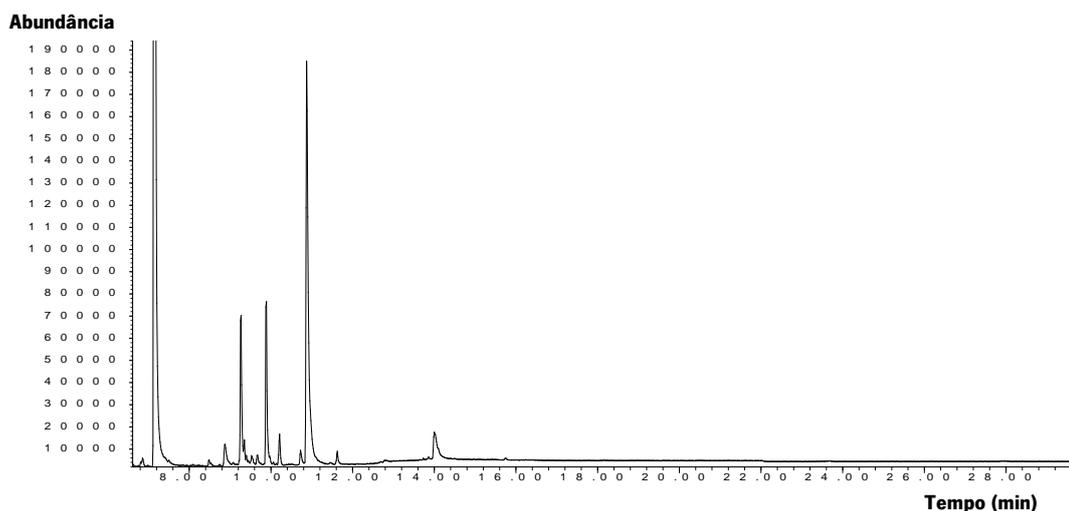


Figura 3.13. Cromatograma relativo a extração da anatoxina-a (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por SPME-GC/MS, após 8 horas de reação, 5 μL de IBCF, 200 mg de NaHCO_3 , 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL.

3.3.3.4. Otimização do tempo de extração

A dependência da quantidade extraída de analito com o tempo de extração promove uma informação valiosa no desenvolvimento do método de SPME-GC/MS e permite a determinação experimental do tempo de equilíbrio. Uma vez avaliados alguns dos parâmetros relacionados com a extração, desorção e derivatização, do modo a garantir a máxima eficiência, avalia-se agora o tempo de extração com o fim de alcançar a máxima sensibilidade mediante SPME-GC/MS.

O efeito do tempo de extração sobre a eficiência foi avaliado com a fibra PDMS (100 μm), aplicando as condições otimizadas para a extração, reação de derivatização e desorção, em soluções padrão de concentração 1,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para diferentes tempos de extração na gama entre os 10 e os 25 minutos. Os valores das áreas do pico obtidos na análise por SPME-GC/MS estão apresentados na tabela 3.5. Cada um dos volumes foi analisado em duplicado. Os resultados do estudo encontram-se na figura 3.14 que apresentam o efeito da variação do tempo da extração.

Tabela 3.5. Resultados obtidos no estudo do efeito da variação do tempo de extração na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, para uma concentração final na solução de $1,00 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Tempo (min)	A $\pm \sigma$A
0	0
10	$(9,4 \pm 11) \times 10^5$
15	$(45 \pm 42) \times 10^5$
20	$(43 \pm 36) \times 10^5$
25	$(46 \pm 40) \times 10^5$

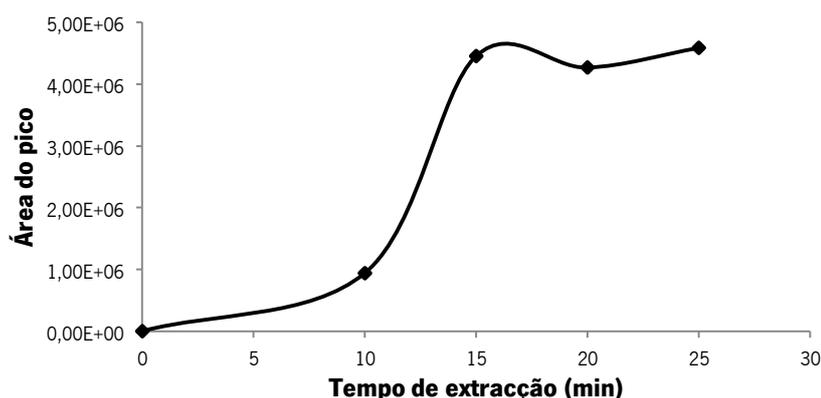


Figura 3.14. Estudo do tempo de extração ótimo a aplicar na análise da anatoxina-a (1,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) derivatizada com IBCF (5 μL), 200 mg de NaHCO_3 , tempo de reação entre 16 - 24h, nível de agitação constante (1,5), para um volume total de solução de 2 mL, usando uma fibra PDMS de 100 μm .

Um tempo de extração de 20 minutos é suficiente para que a anatoxina-a atinja o equilíbrio entre a matriz de água ultrapura e a fase estacionária da fibra. O tempo necessário para atingir o equilíbrio, está limitado pela velocidade do processo de transferência de massa da anatoxina-a através da interface estabelecida entre a solução e a fibra. Os analitos com valores baixos de constante de distribuição (K), geralmente apresentam tempos de equilíbrio mais curtos e portanto são também necessários tempos de extração mais reduzidos. Tendo em conta os resultados obtidos, pode constatar-se que a anatoxina-a apresenta uma afinidade razoável para a fase estacionária da fibra, que a leva a ser extraída num período de equilíbrio relativamente pequeno de 20 minutos. Este facto deve-se provavelmente as características como o seu tamanho reduzido, a elevada afinidade pela fase aquosa associada ao seu valor de solubilidade em água (15 mg/mL) [100].

3.3.3.5. Otimização da velocidade de agitação

A agitação mecânica é aplicada na maior parte dos casos como forma de facilitar o processo de transferência de massa da matriz aquosa para a fibra. A agitação magnética é o processo geralmente aplicado nos casos em que se utiliza a SPME manual. No entanto, devem-se considerar um conjunto de cuidados, como por exemplo, assegurar que a velocidade rotacional seja constante assim como a temperatura da placa magnética. Para evitar que tal aconteça deve-se utilizar placas de agitação digitais.

Geralmente, a agitação com barras magnéticas é eficiente quando são aplicadas velocidades elevadas. No entanto, para este tipo de estudos a agitação constante tem como vantagem a diminuição do tempo de equilíbrio na extração e consequentemente a obtenção de resultados mais precisos. De acordo com o modo de funcionamento da placa magnética, apresenta-se o efeito do aumento da velocidade de agitação com os diferentes níveis de agitação descritos como 1, 2 e 3. A partir da análise da tabela 3.6 e da figura 3.15, pode-se concluir deste estudo que o equilíbrio da extração decresce progressivamente com a aplicação de um nível de agitação mais elevado (superior 3). A utilização de um nível de agitação superior a 3 promove o descontrolo do processo, nomeadamente, mudanças no tempo de equilíbrio, na quantidade de anatoxina-a extraída e na aquisição de medições com baixa precisão.

O nível de agitação 2 juntamente com o conjunto de todos os outros parâmetros otimizados é aquele que permite obter uma maior quantidade de anatoxina-a extraída da matriz

de água ultrapura. A análise para cada uma das velocidades de agitação foi levada a cabo em triplicado.

Tabela 3.6. Resultados obtidos no estudo do efeito da agitação na área (A) do pico correspondente à anatoxina-a derivatizada com IBCF, de concentração $1,00 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

Nível de agitação	$A \pm \sigma A$
0	0
1	$(9,4 \pm 11) \times 10^5$
2	$(45 \pm 42) \times 10^5$
3	$(43 \pm 36) \times 10^5$

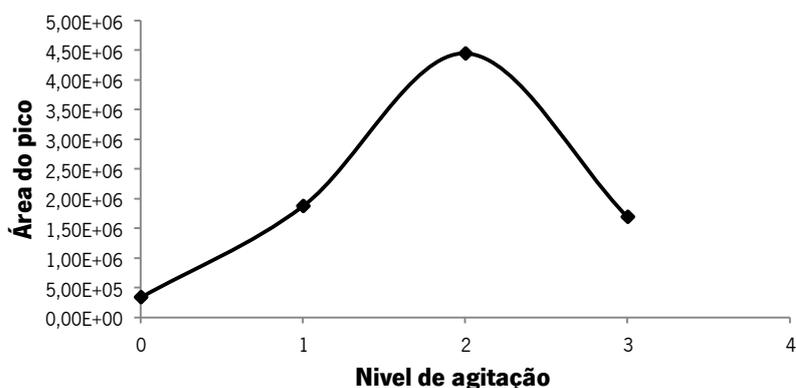


Figura 3.15. Estudo do efeito da variação da velocidade de agitação, pela aplicação de diferentes níveis de agitação, na eficiência da extração da anatoxina-a ($1,00 \mu\text{g/mL}$) derivatizada com IBCF ($5 \mu\text{L}$), 200 mg de NaHCO_3 , tempo de reação entre $16 - 24\text{h}$, 20 min de tempo de extração, para um volume total de solução de 2 mL , utilizando uma fibra PDMS de $100 \mu\text{m}$.

Uma vez estabelecidas as condições otimizadas para efetuar a análise por SPME-GC/MS da anatoxina-a, apresentadas na tabela 3.7, foram iniciados os estudos para a validação do método.

Tabela 3.7. Condições otimizadas para o método de análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS.

Extração	Derivatização	Desorção no sistema GC/MS
Fibra PDMS, 100 µm	Tempo de reação: 8 a 24h	Tempo: 20 min
Modo: Imersão direta;	Temperatura ambiente	Temperatura na entrada
Temperatura ambiente		do injetor: 250 °C
Nível de Agitação 2	5 µL de IBCF (1,00 µg/mL de anatoxina-a) *	
200 mg de NaHCO₃		
Tempo: 20 min		

*Para a derivatização de concentrações baixas em anatoxina-a reduz-se a quantidade de IBCF para 2 µL.

3.4. Validação do método SPME-GC/MS

A validação de um método analítico é um aspeto crucial da garantia da qualidade analítica pelo que tem recebido uma atenção considerável por parte da comunidade científica, comités industriais e entidades reguladoras. Isso decorre da necessidade de uniformizar os critérios utilizados com o fim de demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado apresenta as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade requerida.

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), o que, em algumas situações, pode alterar de forma significativa o resultado final.

A validação de um método deve ser efetuada quando é desenvolvido um novo método, como foi o caso deste trabalho. Inclui o cálculo dos limiares analíticos (LD e LQ), realização de ensaios de recuperação, o estudo da precisão e posterior calibração de modo a efetuar análises da anatoxina-a em matrizes de água de cromatografia. Numa última etapa são estudadas diferentes tipos de matrizes, como água de diferentes rios, lago e de uma matriz contaminada, como forma de estudar a influência da matriz na deteção da anatoxina-a em matrizes de água.

3.4.1. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade

i. Repetibilidade

Para efetuar o estudo de repetibilidade do sistema realizaram-se uma serie de análises em soluções com matriz de água ultrapura com diferentes níveis de concentração: baixo, médio e alto (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL), no mesmo dia. Para cada nível de concentração foram realizadas 5 réplicas. Os valores de coeficiente de variação (RDSs) obtidos no estudo de repetibilidade ou precisão em termos de área e de tempo de retenção, para cada nível de concentração encontram-se apresentados na tabela 3.8.

Tabela 3.8. Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do sistema SPME-GC/MS na determinação da anatoxina-a utilizando água ultrapura como matriz.

Nível de concentração (µg/mL)	Parâmetro	Área	t _r (min)
0,0300 ± 0,0005	Média	32 × 10 ³	11,19
	Desvio padrão	± 59 × 10 ²	± 0,083
	% RDS	18	0,75
	Média ± σ (n=3, P = 95%)	(32 ± 19) × 10 ³	11,19 ± 0,27
0,0500 ± 0,0007	Média	74 × 10 ³	11,14
	Desvio padrão	± 76 × 10 ²	± 0,010
	% RDS	10	0,090
	Média ± σ (n=3, P = 95%)	(74 ± 24) × 10 ³	11,14 ± 0,032
0,100 ± 0,001	Média	13,4 × 10 ⁴	11,14
	Desvio padrão	± 17 × 10 ³	± 0,020
	% RDS	13	0,18
	Média ± σ (n=3, P = 95%)	(13,4 ± 5,4) × 10 ⁴	11,14 ± 0,062

Estes valores foram considerados satisfatórios tal como a variabilidade completa associada ao método, incluindo a eficiência da etapa de derivatização, da SPME e análises cromatográficas. A principal forma de manter a repetibilidade dos resultados centra-se em reproduzir todas as condições experimentais de forma constante, para todas as etapas do processo: a preparação da amostra, tratamento e análise da anatoxina-a.

ii. Reprodutibilidade

De forma semelhante, teve-se em conta o estudo da reprodutibilidade do sistema. Foram realizadas uma serie de 5 injeções para cada nível de concentração (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL) em 3 dias diferentes não consecutivos. Calculados os valores médios para cada dia, os resultados estatísticos de reprodutibilidade ou fidelidade do sistema para a anatoxina-a em termos de tempo de retenção e áreas de pico estão apresentados na tabela 3.9.

Tabela 3.9. Resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do sistema SPME-GC/MS na determinação da anatoxina-a utilizando água ultrapura como matriz.

Nível de concentração (µg/mL)	Parâmetro	Áreas	t _r (min)
0,0300 ± 0,0005	Média	17,6 × 10 ⁴	11,09
	Desvio padrão	± 27×10 ³	± 0,024
	% RDS	16	0,22
	Média ± σt (n=3, P = 95%)	(17,6 ± 8,6)×10 ⁴	11,09 ± 0,08
0,050 ± 0,0007	Média	40,1 × 10 ⁴	11,04
	Desvio padrão	± 28×10 ³	± 0,024
	% RDS	6,9	0,21
	Média ± σt (n=3, P = 95%)	(40,1 ± 8,9)×10 ⁴	11,04 ± 0,08
0,100 ± 0,001	Média	10,9 × 10 ⁵	10,99
	Desvio padrão	± 14×10 ⁴	± 0,0078
	% RDS	13	0,071
	Média ± σt (n=3, P = 95%)	(10,9 ± 6,1)×10 ⁵	10,99 ± 0,02

Os valores obtidos de desvio padrão e coeficientes de variação relativos ao tempo de retenção são satisfatórios ao longo deste estudo. No que diz respeito aos valores obtidos para as áreas de pico da anatoxina-a, revelaram ser superiores. No entanto, estes valores de % de RDS para todos os níveis de concentração, encontram-se numa gama aceitável no caso da aplicação da SPME (<15%) [101].

3.4.2. Estudos de linearidade e calibração

Calibração do método com água ultrapura

Os estudos de linearidade e calibração do sistema SPME-GC/MS realizaram-se preparando soluções de 2 mL de água ultrapura às quais foram adicionadas diferentes quantidades de solução padrão de anatoxina-a, retiradas a partir da solução mãe de fumarato de anatoxina-a, numa gama de concentração entre 0,030 – 0,150 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram extraídas e analisadas em triplicado.

Na tabela 3.10 encontram-se apresentadas as áreas obtidas para cada nível de concentração estudado e respetivas incertezas associadas. O gráfico apresentado na figura 3.16 corresponde à representação da resposta do detetor para o ião quantificador (m/z 265) em função da concentração da anatoxina-a. O ajuste da relação linear foi realizado recorrendo ao método dos mínimos quadrados.

Tabela 3.10. Concentração das soluções padrão (c) e áreas de pico (A) e respetivas incertezas associadas obtidas na análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS.

$c \pm \sigma c$ ($\mu\text{g/mL}$)	$A \pm \sigma A$
$0,0300 \pm 0,0005$	$(34 \pm 17) \times 10^3$
$0,0500 \pm 0,0007$	$(84 \pm 16) \times 10^3$
$0,0800 \pm 0,0012$	$(13,2 \pm 4,4) \times 10^4$
$0,100 \pm 0,001$	$(18,0 \pm 2,6) \times 10^4$
$0,150 \pm 0,003$	$(28,1 \pm 2,1) \times 10^4$

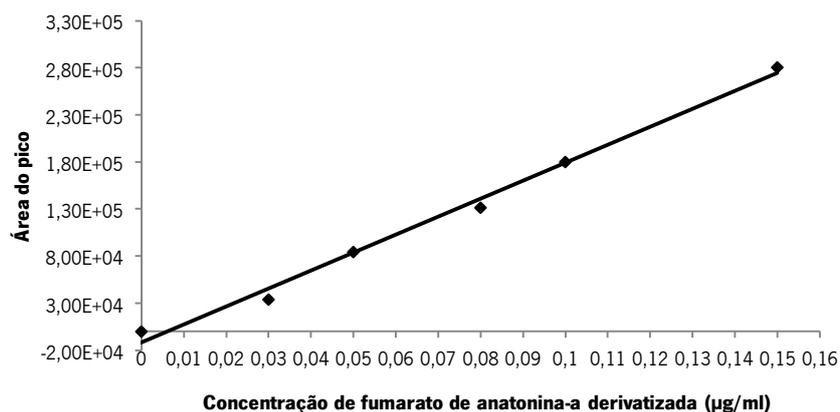


Figura 3.16. Curva de calibração obtida por SPME-GC/MS da área de pico de soluções padrão de anatoxina-a derivatizada, na gama de concentração entre 0,030 – 0,150 µg/mL, com 5 µL de IBCF, 200 mg de NaHCO₃, tempo de reação entre 16 - 24h, 20 min de tempo de extração, nível de agitação constante (2), para um volume total de solução de 2 mL.

Os parâmetros estatísticos correspondentes a regressão linear encontram-se descritos na tabela 3.11.

Tabela 3.11. Apresentação dos parâmetros estatísticos obtidos na calibração do sistema SPME-GC/MS na análise de soluções padrão na gama de concentração entre 0,030 – 0,150 µg/mL. A equação de reta é apresentada na forma de $A = (b \pm tSb) c + (a \pm tSa)$.

Parâmetro	b	a	r	Sy/x	tSa	tSb	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Valores	$18,5 \times 10^5$	$7,8 \times 10^3$	0,994	$3,3 \times 10^6$	$24,2 \times 10^3$	$2,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^2$	$4,9 \times 10^2$
Equação da reta: $A = (18,5 \pm 2,9) \times 10^5 c (\mu\text{g/mL}) - (7,8 \pm 24,2) \times 10^3$								

A partir dos resultados obtidos verifica-se que existe uma relação linear no intervalo considerado para a calibração, podendo portanto quantificar anatoxina-a nas amostras de água contaminadas com esta toxina. A incerteza associada ao declive é um pouco elevada dado que o seu erro relativo associado é de cerca de 15%. Por outro lado a incerteza associada à ordenada na origem reflete a inclusão do ponto 0,0.

Calibração do método usando como matriz água de rio

Para efetuar a calibração com matriz de água de rio, prepararam-se soluções às quais se adicionaram quantidades distintas de anatoxina-a, numa gama entre 0,030 – 0,150 µg/mL. Neste caso foi realizada uma calibração com apenas três pontos (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL), uma vez que já foi determinada a respetiva linearidade do método. Simultaneamente foram também preparadas soluções com matriz de água ultrapura e os respetivos brancos. As soluções resultantes foram extraídas e cada nível de concentração foi analisado em triplicado.

Tabela 3.12. Concentração das soluções padrão (c) e áreas de pico (A) e respetivas incertezas associadas obtidas na análise da anatoxina-a por SPME-GC/MS.

$c \pm \sigma c$ (µg/mL)	$A \pm \sigma A$
$0,030 \pm 0,0005$	$(34 \pm 17) \times 10^3$
$0,050 \pm 0,0007$	$(84 \pm 16) \times 10^3$
$0,100 \pm 0,001$	$(18,0 \pm 2,6) \times 10^4$

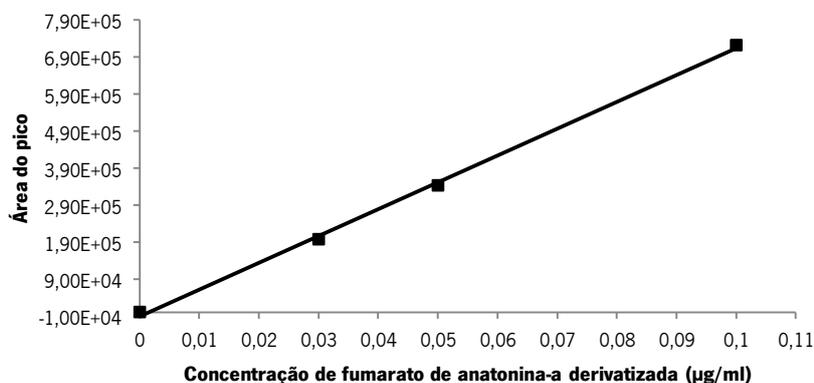


Figura 3.17. Curva de calibração obtida em matriz de água de rio (rio Minho) da área do pico em função da concentração da anatoxina-a derivatizada recorrendo ao método SPME-GC/MS

Na tabela 3.12 encontram-se apresentadas as áreas obtidas para cada nível de concentração estudado e respetivas incertezas associadas e na figura 3.17 apresenta-se a reta

de calibração obtida. Na tabela 3.13 apresentam-se os parâmetros estatísticos associados aos cálculos da regressão linear obtida recorrendo ao método de mínimos quadrados.

Tabela 3.13. Apresentação dos parâmetros estatísticos obtidos na calibração do sistema SPME-GC/MS com água do rio Minho de soluções padrão de anatoxina-a derivatizada, na gama de concentração entre 0,030 – 0,150 ng/mL. A equação de reta é apresentada na forma de $A = (b \pm tSb) c + (a \pm tSa)$.

Parâmetro	b	a	r	Sy/x	tSa	tSb	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Valores	71,9×10 ⁵	8,1×10 ³	0,999	15,0×10 ³	43,5×10 ³	7,5×10 ⁵	6,9×10 ³	2,1×10 ²
Equação da reta: $A = (71,9 \pm 7,5) \times 10^5 c (\mu\text{g/mL}) - (8,1 \pm 43,5) \times 10^3$								

Os resultados apresentados na tabela 3.13 demonstram que se obteve um elevado coeficiente de correlação e um declive muito elevado indicativo da elevada sensibilidade do método. Para o declive verifica-se um erro relativo aceitável de 10% atendendo a que só se utilizaram três soluções padrão. Os limites de deteção e quantificação são relativamente mais baixos utilizando a matriz de água de rio, com apenas três níveis de concentração. Na figura 3.18 comparam-se alguns cromatogramas obtidos no estudo da linearidade do método, em que as soluções foram preparadas em matrizes diferentes: (A) água ultrapura e (B) água do rio Minho.

Os critérios para avaliar a linearidade seguem normas estabelecidas por guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais. De acordo com as normas atualmente em vigor, aceita-se um coeficiente de variação menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e menor ou igual a 15% para as demais concentrações [102, 103] Além disso, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98, tal como acontece neste caso.

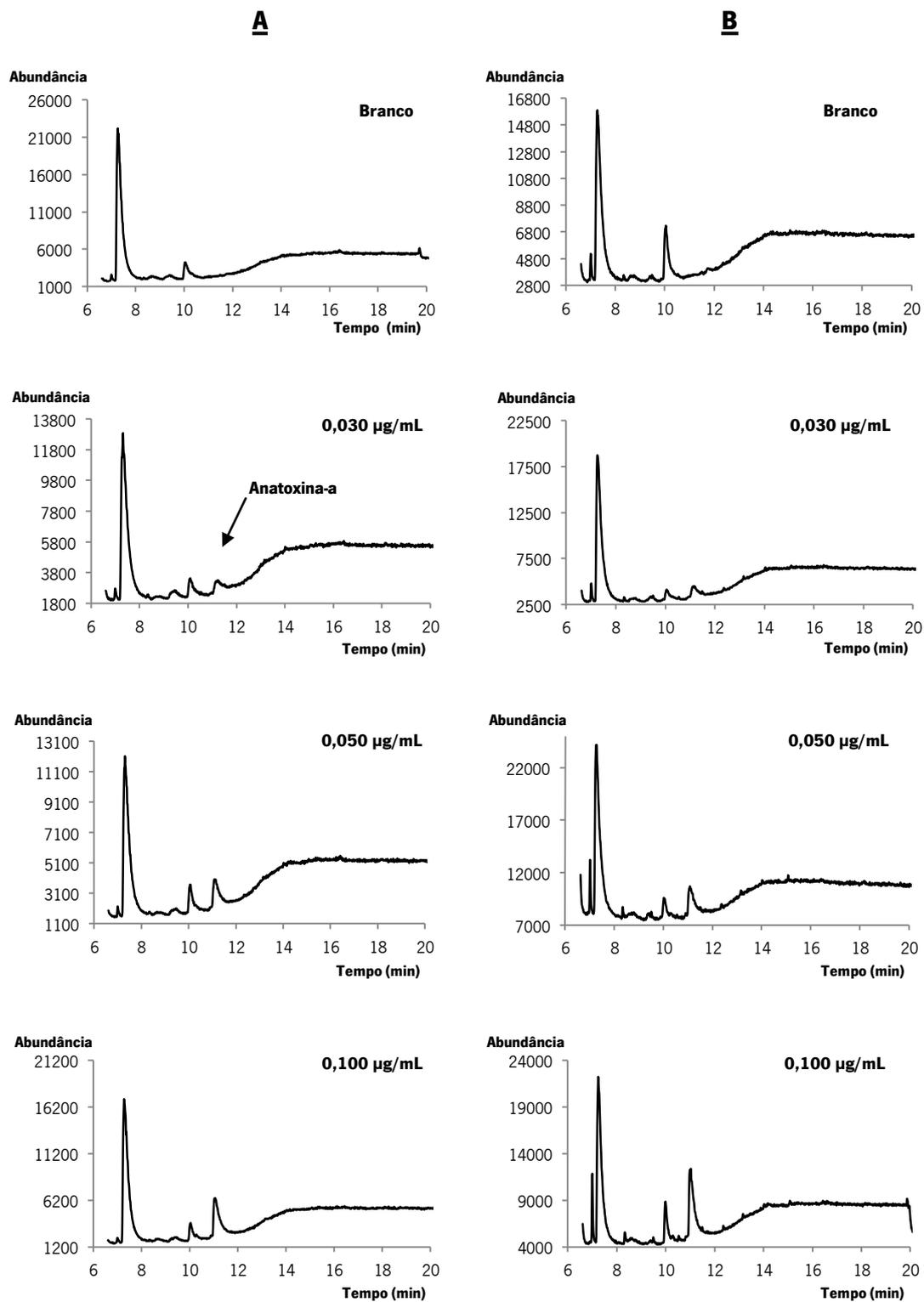


Figura 3.18. Cromatogramas da anatoxina-a derivatizada obtidos com diferentes concentrações em matrizes de água ultrapura (A) e de água de rio Minho (B) obtidos pelo método SPME-GC/MS. Condições experimentais idênticas às da figura 3.16.

De forma geral pode dizer-se que se obtiveram bons coeficientes de correlação para ambas as curvas de calibração, apresentando um comportamento linear dentro da gama de concentrações estudadas. No entanto, quando se comparam as curvas obtidas, encontram-se diferenças significativas nos declives, demonstrando à partida que a microextração em fase sólida com a fibra PDMS (100 μm) aplicada na análise da anatoxina-a pelo método SPME-GC/MS é dependente da matriz e conseqüentemente, para a análise da anatoxina-a será então indicado considerar esse efeito. O possível efeito de matriz encontra-se justificado na figura 3.19, onde se analisa uma solução de anatoxina-a de 0,050 $\mu\text{g/mL}$, com matriz de água ultrapura e com matriz de água do rio Minho.

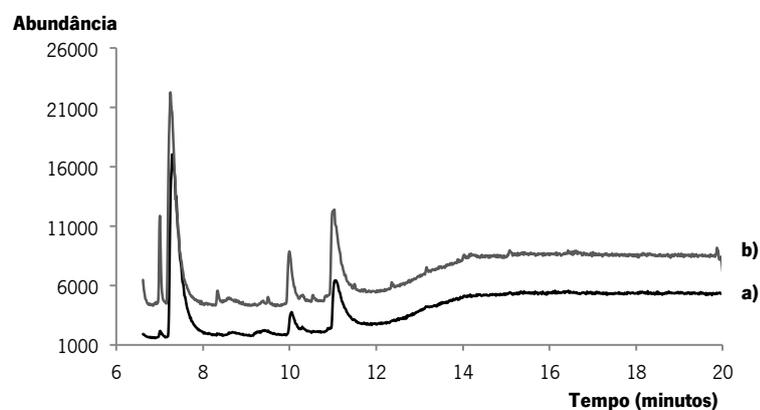


Figura 3.19. Cromatogramas representativos da análise de anatoxina-a (0,050 $\mu\text{g/mL}$) numa solução com matriz de: a) água ultrapura e b) água do rio Minho pelo método SPME-GC/MS. Condições experimentais idênticas às da figura 3.16.

3.4.3. Determinação dos limites de deteção e quantificação

Geralmente, a aplicação de métodos que incluem a SPME na análise de água conduz a obtenção de bons limites de deteção, quando utilizados detetores como o detetor de massa. Os valores para os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) do sistema de SPME-GC/MS, baseados na relação sinal/ruído de 3 e 10 respetivamente, foram estimados injetando 3 réplicas de uma solução de concentração 1,00 $\mu\text{g/mL}$. A partir do sinal obtido para a análise desta solução, obteve-se a respetiva relação sinal/ruído. Em função desta foi então obtida a estimativa do valor do limite de deteção e quantificação (tabela 3.14) Estes limites foram posteriormente confirmados analisando soluções padrão de concentrações decrescentes de 0,100, 0,050, 0,025 e 0,010 $\mu\text{g/mL}$. Os limites de deteção e quantificação determinados a partir de uma

solução de 1,00 µg/mL, em termos de concentração e massa de anatoxina-a injetada em coluna estão apresentados na tabela 3.14, de acordo com o critério utilizado.

Tabela 3.14. Apresentação dos valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema de SPME-GC/MS, baseados na relação sinal/ ruído de 3 e 10 respetivamente, estimados injetando 3 réplicas de uma solução de concentração $1,00 \pm 1,00$ µg/mL.

$A \pm \sigma A$	S_c	R	LD		LQ	
			Concentração (µg/mL)	Massa (µg)	Concentração (µg/mL)	Massa (µg)
$(4,5 \pm 3,9) \times 10^6$	$52,7 \times 10^3$	112,9	$6,4 \times 10^{-3}$	6,4	$21,4 \times 10^3$	21,4

* As equações utilizadas na determinação dos limiares analíticos encontram-se no anexo V.

Comparando os valores de limite de detecção obtidos por Rodrigues et al na análise da anatoxina pelo mesmo método de 0,002 µg/mL e os aqui apresentados, pode dizer-se não foi atingida uma melhoria dos limites de detecção [93].

Na figura 3.20 encontra-se apresentado o cromatograma relativo à análise da solução de menor concentração possível a ser analisado por SPME-GC/MS. A baixo deste nível de concentração não se obtém qualquer pico cromatográfico para a anatoxina-a derivatizada com IBCF.

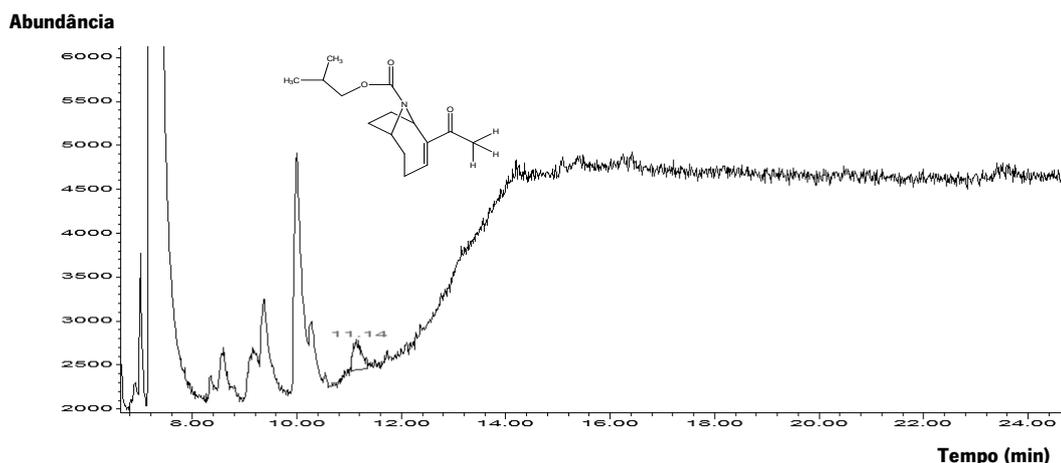


Figura 3.20. Cromatograma da anatoxina-a derivatizada ($0,010 \pm 0,003$ µg/mL) correspondente ao LD do método SPME-GC/MS obtido em matriz de água ultrapura.

Como para as análises da anatoxina-a o valor medido para o branco foi nulo, uma forma alternativa para determinar os limiares analíticos de um método centra-se na análise de 10 réplicas independentes fortificadas com um nível de concentração baixo. O LD é obtido a partir do valor de três vezes o desvio padrão das áreas de pico enquanto o LQ é determinado a partir de dez vezes o valor do desvio padrão.

Na tabela 3.15, encontram-se os resultados obtidos para a área de pico na análise de 10 réplicas de soluções individuais de concentração $0,050 \pm 0,016 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 3.15. Resultados obtidos para a área de pico da anatoxina-a na análise de 10 réplicas de soluções individuais de concentração $0,050 \pm 0,016 \mu\text{g/mL}$ e limiares analíticos.

$c \pm \sigma c$ ($\mu\text{g/mL}$)	$A \pm \sigma A$	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
$0,050 \pm 0,0007$	$(30,0 \pm 8,0) \times 10^4$	$1,5 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^{-1}$

Verifica-se por comparação dos dados da tabela 3.14 e 3.15 que quando se avaliam as 10 réplicas de uma solução de $0,050 \mu\text{g/mL}$ de anatoxina-a estas conduzem a valores de limite de deteção e quantificação muito mais altos do que o esperado. A possível causa relaciona-se com a elevada variabilidade das áreas de pico obtidas entre análises o que levou ao aumento do desvio padrão e conseqüentemente ao aumento do valor obtido para LD e LQ. Por outro lado quando se utilizam as equações do anexo A 5.16 e 5.17 obtém-se valores de limite de deteção mais adequados para este método, pois se analisa um intervalo de concentração restrito e para valores de concentração menores.

Considerando que usualmente as concentrações encontradas de anatoxina-a em água estão acima de $0,002 \mu\text{g/mL}$ e tendo em conta, que até aos dias de hoje não existe legislação oficial aplicada às anatoxinas, conclui-se que os limites obtidos indicam que o método proposto poderia ser aplicado na monitorização da anatoxina-a em água. Contudo é importante referir que existe uma proposta provisória de $1 \mu\text{g/L}$ de anatoxina-a em água [38], como um limite de segurança, obtido a partir de um estudo da toxicologia da anatoxina-a em ratos.

3.4.4. Estudo do efeito de matriz

A investigação do efeito de matriz durante a quantificação da anatoxina-a é um parâmetro importante a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método analítico. Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz aquosa são arrastadas pelo gás de arraste juntamente com o composto de interesse. Este fenómeno, em virtude da elevada seletividade e especificidade quando na presença de matrizes aquosas, apresenta-se propício a erros, uma vez que a presença de substâncias não monitorizadas na matriz podem afetar a deteção da anatoxina-a comprometendo a eficiência de ionização da mesma, caracterizando assim o efeito de matriz. Neste caso específico o mecanismo exato do efeito de matriz é desconhecido, mas é provavelmente originado pela competição entre um analito e de um componente interferente presente na matriz que não está a ser monitorizado.

Partindo do pressuposto que o efeito de matriz pode ter interferência na intensidade do sinal obtido para a anatoxina-a, resolveu-se testar esse efeito de matriz. Para o estudo foram preparadas várias soluções com matrizes de água de diferentes proveniências e com soluções de concentrações de anatoxina-a adicionadas preparadas a partir da solução stock de fumarato de anatoxina-a. Foram assim testadas soluções para diferentes níveis de concentração (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL) e com matrizes distintas: água ultrapura, água do rio Lima, água do rio Minho, água do lago Zamanes e água do rio Tâmega contaminada com microcistinas. As soluções foram derivatizadas e injetadas em duplicado para cada nível de concentração estudado. O efeito de matriz é analisado verificando se existe alteração da sensibilidade, medida pelo declive de cada reta, obtida para os diferentes tipos de matrizes.

Na figura 3.21 apresentam-se os cromatogramas da anatoxina-a onde se pode visualizar o respetivo efeito de matriz, obtidos por SPME-GC/MS.

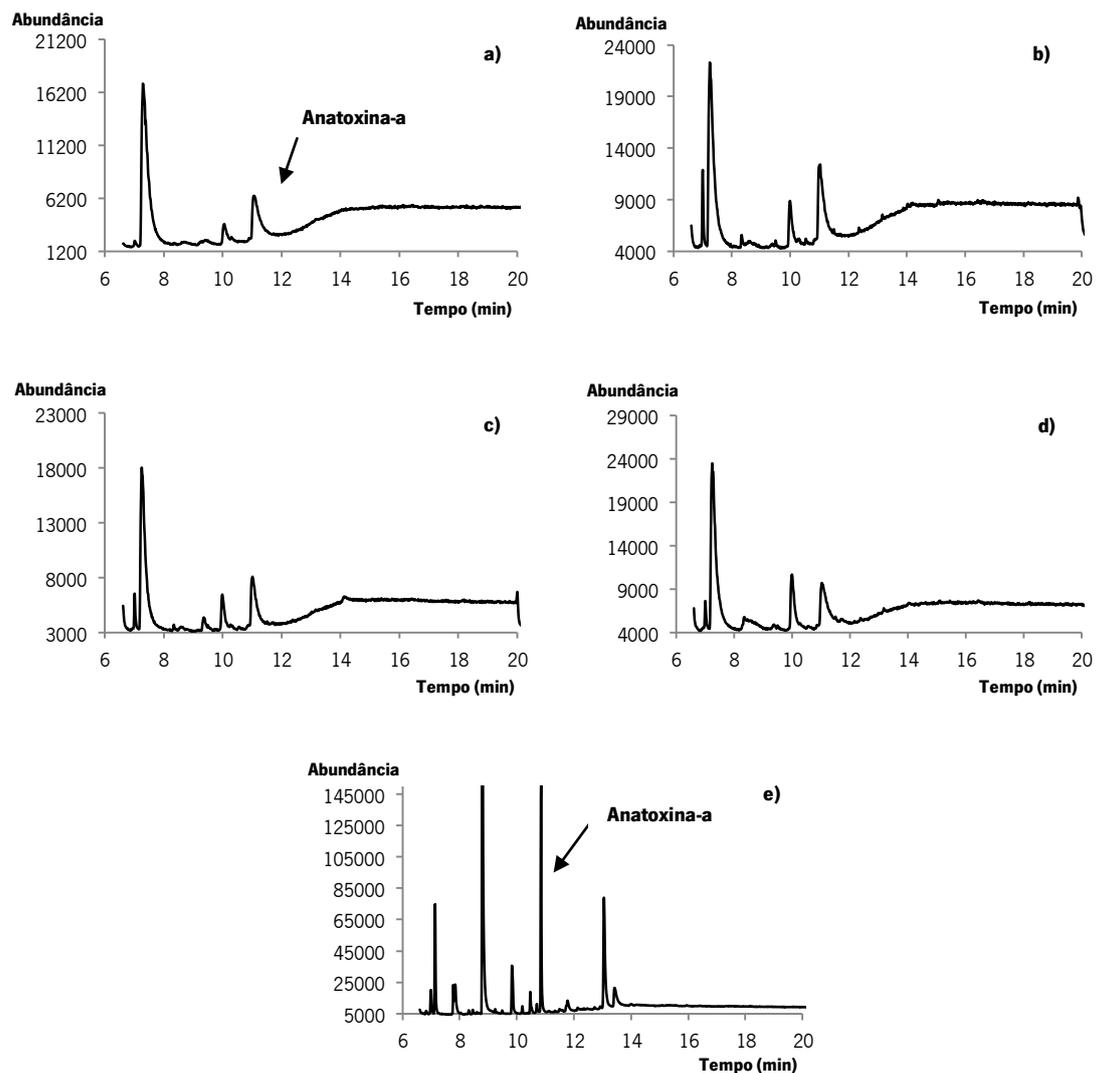


Figura 3.21. Cromatogramas relativos ao estudo do efeito de matrizes na análise da anatoxina-a ($0,100 \mu\text{g/mL}$) por SPME-GC/MS: a) água ultrapura; b) água do rio Minho; c) água do rio Lima; d) água do lago Zamanes; e) água do rio Tâmega contaminada com microcistinas.

Na figura 3.22 encontram-se apresentadas as diferentes curvas de calibração obtidas no estudo do efeito de matriz na determinação da anatoxina-a. Posteriormente é discutida a diferença entre os declives e respetivos coeficientes de correlação obtidos para os diferentes tipos de matriz de água.

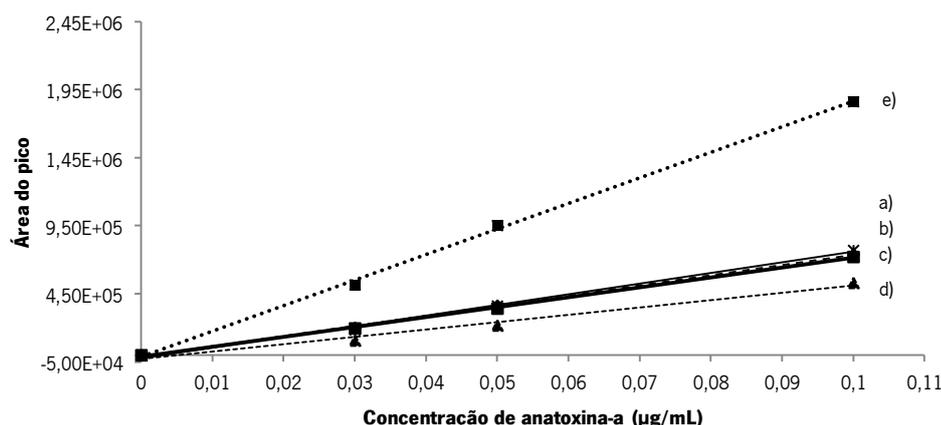


Figura 3.22. Estudo do efeito de matriz das soluções de anatoxina-a de diferentes concentrações (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL): a) água ultrapura, b) água do rio Lima, c) água do rio Minho, d) água do lago Zamanes e e) água do rio Tâmega contaminada com microcistinas.

Na tabela 3.16 apresentam-se os parâmetros correspondentes a cada reta na análise dos diferentes tipos de matrizes. Posteriormente são discutidos os valores de área obtido para as diferentes matrizes, a diferença entre os declives das retas, bem como os coeficientes de correlação obtidos para as diferentes matrizes de água.

Tabela 3.16. Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos no estudo do efeito de matriz na análise da anatoxina-a adicionada (0,030, 0,050 e 0,100 µg/mL) a diferentes tipos de matrizes.

Água	Equação da reta	r	$C_{\text{determinada}}$ (µg/mL)
	$A = (b \pm \text{tsb}) c(\mu\text{g/mL}) + (a \pm \text{tsa})$		
Ultrapura	$A = (71,1 \pm 18,4) \times 10^5 c - (1,8 \pm 10,6) \times 10^3$	0,996	$2,5 \times 10^3$
Rio Minho	$A = (71,9 \pm 7,5) \times 10^5 c - (8,1 \pm 43,5) \times 10^3$	0,999	$1,1 \times 10^3$
Rio Lima	$A = (74,0 \pm 6,4) \times 10^5 c - (6,5 \pm 37,2) \times 10^3$	0,999	$8,8 \times 10^4$
Lago Zamanes	$A = (52,4 \pm 19,5) \times 10^5 c - (2,1 \pm 11,3) \times 10^3$	0,992	$4,0 \times 10^3$
Rio Tâmega	$A = (18,7 \pm 1,6) \times 10^6 c - (0,8 \pm 9,4) \times 10^4$	0,999	$4,4 \times 10^4$

Os resultados obtidos para o sinal da anatoxina-a a diferentes níveis de concentração (figura 3.22), nas matrizes de água dos rios Lima e Minho apresentam bons coeficientes de correlação e não diferem significativamente dos obtidos na matriz de água purificada, portanto considera-se que não existe um efeito de matriz importante. Por outro lado, o sinal da anatoxina-a em matriz de água do rio Tâmega contaminada com microcistinas é significativamente diferente do obtido na matriz de água purificada, verificando-se um aumento do mesmo. Estabelecendo um termo comparativo entre a figura 3.21a e 3.21e juntamente com os dados da tabela 3.16, com a análise das respetivas retas (figura 3.22), confirma-se a presença de um efeito de matriz, que de alguma forma contribui de positivamente para o enriquecimento do sinal da anatoxina-a. No estudo da matriz do lago Zamanes decorre o processo inverso, já que a quantidade extraída diminui, embora não se considere que exista um efeito de matriz significativo. No geral todas as retas obtidas apresentam uma baixa incerteza associada ao declive, relativamente à ordenada na origem, observa-se que a equação da reta engloba o ponto (0,0).

Tabela 3.17. Estudo do efeito de matriz: comparação do sinal obtido para uma concentração de 0,100 µg/mL de anatoxina-a utilizando como matriz: água ultrapura, água do rio Minho, água do rio Lima, água do lago Zamanes e água do rio Tâmega.

Água	Ultrapura	Rio Minho	Rio Lima	Lago Zamanes	Rio Tâmega
Área média (n=2)	$(71 \pm 23) \times 10^4$	$(72 \pm 62) \times 10^4$	$(74 \pm 30) \times 10^4$	$(53 \pm 15) \times 10^4$	$(19 \pm 12) \times 10^4$

Fazendo a leitura da tabela 3.16 comprova-se a variação para as áreas do pico da anatoxina-a analisada nas diferentes matrizes de água. Para o caso da área obtida para o sinal da anatoxina-a na matriz de água do rio Minho é importante referir que o valor do erro associado à área é elevado, pois para as duas réplicas efetuadas se obtiveram dois valores de área que diferiam bastante entre si.

Capitulo IV

Conclusão

IV. Conclusão

Um método simples e eficiente é aqui proposto para a determinação da anatoxina-a em água por SPME-GC/MS. Este projeto centra-se no desenvolvimento, otimização e aplicação de um protocolo analítico, incluindo a etapa da preparação de amostra (SPME) na análise deste contaminante natural neurotóxico.

Algumas investigações recentes efetuadas por vários grupos de investigação sobre a SPME, aplicada na análise de águas diretamente no local, demonstram que esta é uma ferramenta eficaz e prática na determinação qualitativa e quantitativa da anatoxina-a. Para além disto, a SPME possui um conjunto de outras vantagens quando comparada com outras técnicas como LLE e SPE e que se constataram ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Trata-se de um método robusto, fácil de manipular, económico e não requer o uso de solventes tóxicos. Torna-se útil mesmo para análise de pequenas quantidades de amostra. A resposta é linear para várias ordens de grandeza e os valores obtidos para a precisão e limites de deteção são usualmente satisfatórios. No que toca à seletividade e sensibilidade, pode dizer-se que são parâmetros analíticos que se encontram em constante melhoria á medida que surgem mais tipos de revestimentos. Todas as características reunidas contribuem para a sustentação da ideia de implementar um procedimento padrão para a análise da anatoxina-a em água por SPME-GC/MS.

As conclusões gerais que se podem tirar do presente trabalho são as seguintes:

1. Numa primeira fase foram testadas as condições para a GC/MS, nomeadamente no diz respeito aos parâmetros cromatográficos, bem como os relacionados com a espectrometria de massa. As condições estudadas foram baseadas no estudo efetuado por Rellán et al. [35] e revelaram ser aplicáveis a este trabalho. Nomeadamente os parâmetros relacionados com a injeção da amostra, com grande importância com a finalidade de conseguir uma sensibilidade e eficiência máximas. Na otimização do caudal da fase móvel, verificou-se que efetivamente 0,9 mL/min é o mais indicado. No que se refere à espectrometria de massa, selecionou-se o modo SIM para a análise por SPME-GC/MS, por apresentar uma maior sensibilidade que o modo SCAN.

2. O método SPME-GC/MS resultou ser uma técnica simples e de fácil aplicação na análise da anatoxina-a derivatizada com IBCF em diferentes tipos de matrizes. A derivatização, apesar de bastante simples é bastante demorada até ser atingido o equilíbrio da reação (8 a 16 h). O excesso de tempo despendido entre análises tem como consequência uma limitação no número de réplicas a poderem ser aplicadas num determinado estudo. Ao longo da realização do trabalho constou-se que o máximo de injeções a serem realizadas num dia útil, seriam apenas 15 no total.

3. A técnica de microextração em fase sólida (SPME) é apresentada neste trabalho como uma alternativa para a preparação da amostra antes da sua análise por GC/MS, de forma a minimizar interferências e aumentar a deteção da anatoxina-a. Para tal testaram-se e otimizaram-se todos os parâmetros que promovem a melhoria da eficiência da extração, como a seleção da fibra, o tipo de derivatização e a respetiva quantidade de IBCF, a concentração de sal em solução, o tempo de reação, o tempo de extração, a velocidade de agitação e as condições de desorção. Após a otimização das condições de extração foi então possível realizar a validação do método SPME-GC/MS na análise da anatoxina-a derivatizada com IBCF em água.

4. Como parâmetros de validação do método analisou-se a linearidade na gama de concentração estudada (0,030 – 0,150 µg/mL) e verificou-se que a correlação apresentava um coeficiente elevado ($r = 0,994$). O processo de validação confirmou que se trata de um método viável na análise da anatoxina-a e apropriado no controlo e qualidade da água detetando a anatoxina-a a baixos níveis de concentração (0,010 µg/mL). A sensibilidade do método SPME-GC/MS não é muito elevada, mas é suficiente para realizar a determinação da anatoxina-a em águas para consumo humano, tendo em conta também os limites provisórios propostos na literatura (1 µg/L de anatoxina-a em água) [38]. A complexidade da matriz comprovou ser um fator responsável pela perda de sensibilidade e apesar de serem controlados todos os parâmetros de forma constante, a alteração do tipo de matriz promove interferência na análise desta toxina. É desconhecido o tipo de interferência, mas no caso da utilização da matriz do rio Tâmega é de prever que a concentração de microcistinas presente na amostra interfira de forma positiva para o sinal e no tempo de retenção obtido para a anatoxina-a.

5. É importante destacar as desvantagens relacionadas com a manutenção do sistema, como o aparecimento de sujidade prematura no sistema de injeção, assim como na fonte de ionização, possivelmente proveniente da complexidade da natureza dos derivados. É importante dar uma especial atenção a frequência com que se efetua a manutenção para que não ocorra a diminuição da eficiência do método em certas ocasiões.

Capitulo V

Bibliografia

V. Bibliografia

- [1] Júnior, J.S., Legislação relativa à conservação da água e do solo. Consultoria Legislativa, 2003.
- [2] Kutser, T., et al., Monitoring cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2006, **67**, 303-312.
- [3] Cheng, H., An expert system for decision support of municipal water pollution control. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 2003, **16**, 159–166.
- [4] Bartram, J., et al., *Water Quality Monitoring. A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. United Nations Environment Programme, 1996.
- [5] Babica, P., *Environmental and ecotoxicological aspects of cyanobacterial toxins – microcystins*. Bruno, 2006.
- [6] Whitton, B.A., et al., *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [7] Brock, T.D., et al., *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International, Inc, 2003.
- [8] Westrick, J.A., et al., A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/ inactivation in drinking water treatment. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2010, **397**, 1705–1714.
- [9] Rasmussen, B., et al., Reassessing the first appearance of eukaryotes and Cyanobacteria. *Nature*, 2008, **455**, 1101-1104.
- [10] Talaro, K.P., *Foundations in Microbiology*. The McGraw–Hill Companies, 2002.
- [11] Fernandes, V.O, et al., Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. *Oecol. Bras.*, 2009, **13**, 247-258.
- [12] Msagati, T.A.M., et al., Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 2006, **78**, 382–397.
- [13] Ibelings, B.W., et al., Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 2007, **150**, 177-192.
- [14] Codd, G.A., Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 2000, **16**, 51–60.
- [15] Carmichael, W.W., et al., Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 2001, **7**, 663-668.

- [16] Codd, G.A., et al., Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203**, 264–272.
- [17] Gugger, M., et al., First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*, 2005, 1–10.
- [18] Vasconcelos, V.M., et al., Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1999, **32**, 249-254.
- [19] Codd, G.A., et al., Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health, *Eur. J. Phycol*, 1999, **34**, 405-415.
- [20] Williams, P.L., et al., *Principles of Toxicology*. John Wiley & Sons, 2000.
- [21] Mankiewicz, J., et al., Natural toxins from cyanobacteria. *Series Botanica*, 2003, **45**, 9–20.
- [22] Svrcek, C., et al., Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal Environmental Engineering Science*, 2004, **3**, 155–185.
- [23] Hawkins, B., et al., *Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Anatoxin-A*. National Center for Environmental Assessment, 2006.
- [24] Osswald, J., et al., Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International*, 2007, **33**, 1070–1089.
- [25] Smith, R.A., et al., A rapid analysis of water for anatoxin-a, the unstable toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae*, the stable non-toxic alkaloids left after bioreduction and a related amine which may be nature's precursor to anatoxin-a. *Vet Human Toxicon*, 1987, **29**, 4-153.
- [26] Carmichael, W.W., et al., Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science*, 1975, **187**, 542-544.
- [27] Carmichael, W.W., et al., Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon*, 1979, **3**, 229-236.
- [28] Thompsom, P.E., et al., Conformational studies on (+)-anatoxin-a and derivatives. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1992, **6**, 287-298.
- [29] Koskinen, A.M.P., et al., Synthetic and conformational studies on anatoxin-a: a potent acetylcholine agonist. *Journal of Medical Chemistry*, 1985, **28**, 9-1301.

- [30] Swanson, K.L., et al., Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Molecular Pharmacology*, 1986, **29**, 7-250.
- [31] Aas, P., et al., Enhancement of acetylcholine release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria formosa*. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 1996, **2**, 223–32.
- [32] Codd, G.A., Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*, 1995, **4**, 149–156.
- [33] Osswald, J., et al., Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish—*Cyprinus carpio* L. *Toxicon*, 2007, **49**, 693–698.
- [34] Botana, L.M., *Phycotoxins Chemistry and Biochemistry*. Blackwell Publishing, 2007.
- [35] Rellán, S., et al., First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, **47**, 2189–2195.
- [36] Dittmann, E., et al., Review: Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, **50**, 7 – 17.
- [37] Rogers, E.H., et al., Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *J. Appl. Toxicol.* 2005; **25**: 527–534.
- [38] Fawell, J.K., et al., The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: Anatoxin-a. *J. Appl. Toxicol.* 2005; **25**: 527–534.
- [39] Patockaa, J., et al., Brief review of natural nionprotein. *Applied science and Analysis*, 2002, 88 , 02-1.
- [40] Campbell, H.F., et al., Synthesis of nor-anatoxin- a and anatoxin-a. *Can. J. Chem.*, 1977, **55**, 1372-1379.
- [41] Carmichael, W.W., Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, **72**, 445-459.
- [42] Carmichael, W.W., et al., Muscle sensitivity differences in two avian species to anatoxin-a produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Can. J. Zool.*, 1978, **56**, 2-510.
- [43] Carmichael, W.W., et al., Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. *Mitt. Internat. Verein. Limnol*, 1978, **21**, 285–295.
- [44] Spivak, C.E., et al., Anatoxin-a: a novel, potent agonist ate the nicotinic receptor. *Molecular Pharmacology*, 1980, **18**, 384-394.
- [45] Astrachan, N.B., et al., Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon*, 1980, **18**, 8-684.

- [46] Aronstam, R.S., et al., Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. Proc. Natl. Acad. Sci., 1981, **78**, 43-4639.
- [47] Bláha, L., et al., Methods for detection and quantification of cyanobacterial toxins – a review. Algological Studies, 2000, **99**, 1-22.
- [48] Chorus, I., et al., Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, 1999.
- [49] Gault, P.M., Handboock on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications. Bacteriology Research Developments Series, 2009.
- [50] Marsalek, B., et al., Methods for detection and quantification of cyanobacterial toxins – a review. Algological Studies, 2000, **99**, 1-22.
- [51] Aráoz, R., et al., Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. Microbiology, 2005, **151**, 1263–1273.
- [52] Aráoz, R., et al., MALDI-TOF-MS detection of the low molecular weight neurotoxins anatoxin-a and homoanatoxin-a on lyophilized and fresh filaments of axenic Oscillatoria strains. Toxicon, 2008, **51**, 1308–1315.
- [53] James, K.J., et al., "Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method." Toxicon, 1997, **35**, 963-971.
- [54] Apeldoorn, M.E., et al., Toxins of cyanobacteria. Mol. Nutr. Food Res., 2007, **51**, 7 – 60.
- [55] Ojanpera, I., et al., Facile Detection of Anatoxin-a in Algal Material by Thin-layer Chromatography With Fast Black K Salt. ANALYST, MARCH, 1991, **116**, 265-267.
- [56] Codd, G.A., et al., Analysis of Cyanobacterial Toxins by Physicochemical and Biochemical Methods. Journal of AOAC International, 2001, **5**, 1626-1635.
- [57] James, K.J., et al., Determination of the cyanobacterial neurotoxin, anatoxin-a, by derivatisation using 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) and HPLC analysis with fluorimetric detection. Biomedical Chromatography, 1996, **1**, 46–47.
- [58] James, K.J., et al., Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. Journal of Chromatography A, 1998, **798**, 147–157.

[59] Rawn, D.F.K., et al., Improved Method for the Determination of Anatoxin-a and Two of Its Metabolites in Blue-Green Algae Using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, 2005, **6**, 2245-2252.

[60] Vogt, C.B., et al., A highly sensitive analytical method for the neurotoxin anatoxin-a, using GC-ECD, and first application to laboratory cultures. *Toxicon*, 1986, **12**, 1289-1296.

[61] Edwards, C., et al., Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*, 1992, **10**, 1165-1175.

[62] Zwiener, C., et al., LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment – a critical review. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2004, **378**, 862–874.

[63] Takino, M., Analysis of Anatoxin-a in Drinking Water by Automated On-line Derivatization Electrospray LC/MS. Agilent Technologies, 2000, 1-4.

[64] Pietsch, J., et al., Simultaneous determination of cyanobacterial hepato-and neurotoxins in water samples by ion-pair supported enrichment and HPLC-ESI-MS-MS. 2001, **54**, 339-344.

[65] Dell'Aversano, C., et al., Analysis of Cyanobacterial Toxins by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, **1028**, 155–164.

[66] Dell'Aversano, C., et al., Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1081**, 190–201.

[67] Furey, A., et al., Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1082**, 91–97.

[68] Dimitrakopoulos, I.K., et al., Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and phenylalanine-d5 as internal standard. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **397**, 2245–2252.

[69] James, K.J., et al., Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2005, **19**, 1167–1175.

[70] Dagnino, D., H NMR quantification in very dilute toxin solutions: application to anatoxin-a analysis. *Toxicon*, 2005, **46**, 236–240.

[71] Stevens, D.K., et al., Analysis of anatoxin-a by GC/ECD. *Journal Analytical Toxicol.* 1988, **12**, 126–31.

[72] Bruno, M., et al., Anatoxin-a and a previously unknown toxin in *Anabaena planktonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon*, 1994, **32**, 369–73.

[73] Himberg, K., Determination of anatoxin-a, the neurotoxin of *Anabaena flosaquae* cyanobacterium, in algae and water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography*, 1989, **481**, 358–62.

[74] Namikoshi, et al., Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*, 2003, **42**, 533 - 8.

[75] Harada, K. et al., A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxina from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 1989, **7**, 1289 – 96.

[76] Rapala, J., et al., Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains – a laboratory study. *Journal Appl. Phycol.*, 1993, **5**, 581–91.

[77] Sieroslawska, A., et al., Toxicity of cyanobacterial bloom in the eutrophic dam reservoir (Southcast Poland), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, **3**, 556-560.

[78] Rodrigues, A., et al., Pressurized Liquid Extraction of Toxins from Cyanobacterial Cells. *Wiley Periodicals*, 2005, 390-396.

[79] Hormazábal, V., et al., Simultaneous Determination of the cyanotoxins anatoxin-a, microcystin Desmethy-3-RR, LR, RR and YR in water using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2000, **23**, 3155–3164.

[80] Draisci, R., et al., Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 2001, **18**, 525–31.

[81] Bumke-Vogt, C., et al., A highly sensitive analytical method for the neurotoxin anatoxin-a, using GC-ECD, and first application to laboratory cultures. *Phycologia*, 1996, **35**, 51–6.

[82] Harada K., et al., Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria. *Tetrahedron*, 1993, **49**, 9251–60.

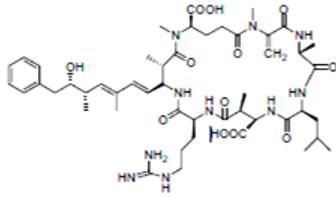
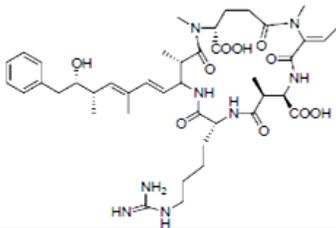
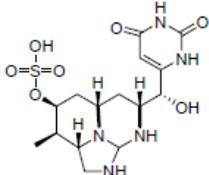
- [83] Lord, H., et al., Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 2000, **885**, 153–193.
- [84] Dietz, C., et al., Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1103**, 183–192.
- [85] Pawliszyn, J., et al., Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2145-2148.
- [86] Valente, A., et al., Microextração por fase sólida. *Química Nova*, 2000, **23**, 523-530.
- [87] Nerin, C., et al., Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2009, **393**, 809–833.
- [88] Namera, A., et al., Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber derivatization. *Journal of Chromatography A*, 2002, **963**, 295–302.
- [89] Rellán, S., et al., Analysis of anatoxin-a in biological samples using liquid chromatography with fluorescence detection after solid phase extraction and solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 2007, **1156**, 134–140.
- [90] Ghassempour, A., et al., Analysis of anatoxin-a using polyaniline as a sorbent in solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1078**, 120–127.
- [91] Rosenfeld, J.M., et al., Derivatization in the current practice of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, **11**, 785-798.
- [92] Kataoka, H., et al., Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, **880**, 35–62.
- [93] Rodríguez, V., et al., Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 2085 – 2090.
- [94] Stashenko, E.E., et al., Derivatization and solid – phase microextraction,. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, **8**, 553-561.
- [95] Husek, P., et al., Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *Journal of Chromatography B*, 1998, **717**, 57-91.
- [96] Kim, K.R, et al, Rapid gas chromatography profiling and screening of biologically active amines, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, **15**, 1309-1318.

- [97] Bicking, M.K.L., Extraction/Analytical extractions, Encyclopedia of Separation Science, 1371-1382.
- [98] Muller, L., et al., Determination of aromatic amines by solid phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry in water samples, Journal of Chromatography A, 1997, **791**, 221-230.
- [99] Dewulf, J., et al, Solid phase Microextraction of volatile organic compounds, Journal of Chromatography A, 1997, 761, 205-217.
- [100] Catálogo sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/a224dat.Par.0001.File.tmp/a224dat.pdf>
- [101] Catálogo da Supelco: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/4547.Par.0001.File.tmp/4547.pdf>
- [102] United States Food and Drug Administration (US-FDA); *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001.
- [103] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.
- [104] Aguete, E.C., et al, HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. Talanta, 2003, **59**, 697–705.
- [105] Beasley, V. R., et al., Diagnostic and clinically important aspects of cyanobacterial (blue-green algae) toxicoses. J Vet Diagn Invest, 1989, **1**, 359-365.
- [106] Stewart, I., et al., Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 2006, **5**, 1-13.
- [107] Takino, M., et al., Analysis of anatoxin-a in freshwaters by automated on-line derivatization–liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1999, **862**, 191–197.
- [108] Bogialli, S., et al., Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography, 2006, **1122**, 180–185.

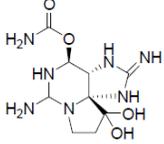
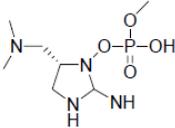
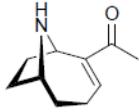
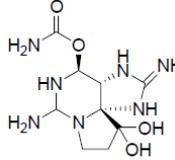
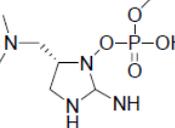
Capitulo VI

Anexos

Anexo 1. Estrutura química das principais cianotoxinas [19, 54, 104 - 106].

	Nome	Estrutura Química	Fontes	Mecanismo de ação
HEPATOXINAS	Microsistina-LR		Microcystis, Nostoc, Anabaena, Oscillatoria	Hepatotóxico, promotor de tumor, inibidor de fosfatases
	Nodularina-R		Nodularia	Hepatotóxico, promotor de tumores, inibidor de fosfatases
	Cilindrospermopsina		Aphanizomenon, Cylindrospermopsis	Hepatotóxico, inibidora de síntese de proteínas

Anexo 1. Estrutura química das principais cianotoxinas [19, 54, 104 - 106] (continuação).

	Nome	Estrutura Química	Fontes	Mecanismo de ação
NEUROTOXINAS	Saxitoxina		Aphanizomenon	Neurotóxico, bloqueador de canais de sódio
	Anatoxina(-s)		Anabaena flos-aquae	Neurotóxico e inibidor de colinesterase
	Anatoxina-a		Anabaena, Aphanizomenon, Planktothrix	Neurotóxico depolarizador e bloqueador de junção neuromuscular
DERMATOXINAS	Debromoaplesiatoxina		Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix	Inflamação na pele, promotor de formação de tumor
	Lingbiatoxina		Lyngbya	Inflamação na pele e gastrointestinal

Anexo II. Métodos desenvolvidos utilizados no pré-tratamento e análise da anatoxina-a e respetivos limites de deteção.

Método	Matriz	Pré-tratamento da amostra	LD	Comentários	Referência
TLC	Cianobactérias	Tratamento por ultrassons da amostra com água acidificada (pH = 2,5) e LLE com CH ₂ Cl ₂	10µg/g	Método barato e semi-quantitativo	[55]
HPLC/UV	Cianobactérias	Extração com 0,05 M em ácido acético, fase reversa ODS e purificação com troca iónica (COOH)	Não especificado	Consumo de tempo excessivo no pré-tratamento. Baixa sensibilidade. Não é útil para amostras complexas e análise dos produtos de degradação.	[75]
HPLC/FID	Água e cianobactérias	Extração com metanol (pH 4), purificação com troca catiónica fraca SPE	10 ng/L	Uso da derivatização. Alta sensibilidade. Determinação da anatoxina-a, homoanatoxina-a e produtos de degradação.	[58]
HPLC/FID	Água	SPME	20 ng/mL	Baixa sensibilidade. Derivatização em fibra. Design experimental complexo.	[88]
HPLC/FID	Cianobactérias	Extração com metanol-0,2 M HCl e SPE-C18	10-50 µg/kg	Elevada sensibilidade.	[59]
HPLC/FL	Água e cianobactérias	Tratamento por ultrassons aplicado à extração intracelular e purificação com SPE de troca catiónica fraca	SPE->24 ng/L SPME-> 290 ng/L	Derivatização com 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzodiazole (NBD-F). E levada eficiência na extração.	[89]
GC/ECD	Água e cianobactérias	Tratamento por ultrassons. Dois passos na limpeza das amostras com SPE-C18	5 ng injetadas	Derivatização com anidrido tricloroacético. Consumo de tempo no pré-tratamento da amostra.	[71]
GC/MS	Água e cianobactérias	Extração das cianobactérias com metanol ácido e limpeza com cartuxos de sílica. LLE para as amostras de água	0,1 ng injetadas	Derivatização a N-acetil anatoxina-a. Tempo de derivação longo (16 h).	[73]

Anexo II. Métodos desenvolvidos utilizados no pré-tratamento e análise da anatoxina-a e respectivos limites de detecção (Continuação).

Método	Matriz	Pré-tratamento da amostra	LD	Comentários	Referência
GC/MS	Água e cianobactérias	Extração com metanol, pré-concentração com SPME usando polianilina como sorvente	11,2 ng/mL	Bons resultados usando os filmes de polianilina em SPME; bons resultados na análise dependem de um maior tempo de extração (30 min).	[90]
GC/MS	Água	SPME com fibras PDMS (polidimetilsiloxano)	2 ng/mL	Uso da norcocaina como padrão interno; derivatização com hezilcloroformato em solução alcalina (pH=9.0)	[93]
LC-ESI-MS	Água	Extração usando discos de SPE apos o ajuste do pH=10	2 ng/L	Pré-coluna de derivatização com fluoril metilcloroformato para aumentar a retenção da anatoxina-a na coluna de LC.	[107]
LC-QTOF/QIT-MS	Água e cianobactérias	Extração com metanol (pH=4), purificação com SPE de troca catiónica fraca	2 µg/L	Fragmentação detalhada da anatoxina-a, homoanatoxina-a e produtos de degradação. Baixa sensibilidade.	[108]
LC-ESI-MS/MS	Água e tecido de peixes	Filtração da água. Extração das amostras de peixe por MSPD usando areia como matriz dispersa em água	8 ng/L; 0,2 ng/g	Elevada sensibilidade. Equipamento caro	[69]

Anexo III. Instruções de funcionamento do GC/MS.**a) Ligar o equipamento**

1. Verificar a pressão de entrada e de saída;
2. Ligar o sistema de cromatografia no botão (*ON* – OK);
3. Ligar o detetor de massa no botão (*ON* – OK);
4. Ligar o computador;
5. Arrancar com o programa *Instrument #1*;
6. Para o software do sistema de gases pressionar a tecla *Oven*, após aparecerem as condições para ligar o forno, pressiona-se a tecla *ON*;
7. Deixar estabilizar o sistema GC/MS entre 2-3 horas;
8. No menu “*HRCHEMISTATION*” selecionar “*view*”, para diagnosticar o vácuo;
9. Dentro do menu anterior selecionar “*Pump Down*” e deixar o sistema a estabilizar durante 2 horas;

b) Obter cromatogramas

1. Em “*Enhanced Data Analysis*” seguido de “*Load Data File*” podem abrir-se os cromatogramas se a análise tiver terminado;
2. Ao selecionar “*Tools*” seguido de “*Overlay Chromatograms*” para sobrepor os cromatogramas;
3. Para se realizar uma nova análise deve se esperar que o equipamento esteja *OK*, esperar que apareça a luz verde no equipamento.

c) Autotune

1. Para efetuar o *autotune* do programa *Instrument #1* que controla o funcionamento do GC/MS, abrir o menu “*Instrument*” e selecionar “*Perform MS Autotune*”

Anexo IV. Características e frases de risco e segurança.**a)** Características inerentes aos reagentes utilizados neste trabalho:

Reagente	Formula química	Massa Molecular (g/mol)	Pureza (%)
Metanol	CH ₃ OH	32,04	99,9
Acetato de etilo	CH ₃ COOC ₂ H ₅	88,11	99,0
Fumarato de anatoxina-a	C ₁₀ H ₁₅ NO.C ₄ H ₄ O ₄	281,31	99,9
Anidrido acético	C ₄ H ₆ O ₃	102,09	99,0
Piridina	C ₅ H ₅ N	79,10	99,9
Hidrogeno carbonato de sódio	NaHCO ₃	84,01	99,7
Isobutilcloroformato	C ₅ H ₉ ClO ₂	136,58	99,8

b) Frases de risco e segurança.**1. Metanol****R 11:** Facilmente inflamável.**R 23/24/25:** Tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.**R 39:** Perigo de efeitos irreversíveis muito graves.**S 7:** Manter o recipiente bem fechado.**S 16:** Conservar longe de fontes de ignição – Não fumar.**S 36/37:** Usar luvas e vestuário de proteção adequados.**S 45:** Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto).

2. Acetato de etilo

R 11: Facilmente inflamável.

R 36: Irritante para os olhos.

R 66: Exposição contínua pode causar a secagem da pele ou formação de fissuras.

R 67: Vapores podem causar sonolência e tonturas.

S 16: Conservar longe de fontes de ignição – Não fumar.

S 26: Em caso de contato com os olhos, lavar imediata e abundantemente em água e chamar um especialista.

S 33: Tomar as devidas precauções contra descargas estáticas.

3. Anidrido Acético

R 10: Inflamável.

R 20/22: Perigoso por inalação e por ingestão.

R 34: Causa queimaduras.

S 26: Em caso de contato com os olhos, lavar imediata e abundantemente em água e chamar um especialista.

S 36/37/39: Usar luvas e vestuário de proteção adequados bem como proteção para os olhos/cara.

S 45: Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto).

4. Piridina

R 11: Facilmente inflamável.

R 20/21/22: Perigoso por inalação em contato com a pele e por ingestão.

S 26: Em caso de contato com os olhos, lavar imediata e abundantemente em água e chamar um especialista.

S 28: Após o contato com a pele lavar abundantemente com água.

5. Isobutilcloroformato

R 10: Inflamável.

R 22: Perigoso se ingerido.

R 23: Perigoso se inalado.

R 34: Causa queimaduras.

S 26: Em caso de contato com os olhos, lavar imediata e abundantemente em água e chamar um especialista.

S 36/37/39: Usar luvas e vestuário de proteção adequados bem como proteção para os olhos/cara.

S 45: Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto).

6. Fumarato de anatoxina-a

R 20/21/22: Perigoso por inalação em contato com a pele e por ingestão.

R 62: Possível risco de diminuição da fertilidade

R 63: Possível risco para grávidas.

S 22: Não respirar o resíduo na forma de pó.

S 24/25: Evitar o contato com a pele e olhos.

S 36/37/39: Usar luvas e vestuário de proteção adequados bem como proteção para os olhos/cara.

S 45: Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto).

Anexo V. Tratamento de resultados

A reta de calibração é apresentada se acordo com a seguinte expressão:

$$\mathbf{y = bx + a} \quad \mathbf{(A 5.1)}$$

onde **b** é o declive e **a** ordenada na origem.

As incertezas associadas ao declive (S_b) e à ordenada na origem (S_a) são determinadas a partir das seguintes expressões:

$$\mathbf{S_a = s_{x/y} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})}}} \quad \mathbf{(A 5.2)}$$

$$\mathbf{S_b = \frac{s_{x/y}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})}}} \quad \mathbf{(A 5.3)}$$

em que $s_{x/y}$ representa o desvio padrão dos pontos experimentais à reta

$$\mathbf{S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}} \quad \mathbf{(A 5.4)}$$

Os intervalos de confiança na ordenada na origem e do declive são apresentados sob a seguinte forma:

$$\mathbf{a \pm tS_a} \quad \mathbf{(A 5.5)}$$

$$\mathbf{b \pm tS_b} \quad \mathbf{(A 5.6)}$$

A partir da reta de calibração pode ser determinado o erro associado à concentração obtida por extrapolação:

$$\mathbf{S_{x_0} = \frac{s_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}} \quad \mathbf{(A 5.7)}$$

onde m é o número de réplicas cujo valor médio das leituras é y_0 , e x_0 o valor da concentração correspondente a y_0 .

O intervalo de confiança correspondente à concentração determinada (x_0) é dado pela expressão seguinte:

$$\mathbf{x_0 \pm t x_0} \quad \mathbf{(A 5.8)}$$

em que o valor de t corresponde ao nível de confiança desejado (P =95%), para n = 2 graus de liberdade.

A qualidade do ajuste linear foi avaliado a partir do coeficiente de correlação dado por:

$$r^2 = \frac{(\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{A 5.9})$$

Os limites de detecção (LD) e de quantificação podem ser avaliados a partir dos parâmetros estatísticos da reta, recorrendo às seguintes expressões:

$$LD = \frac{3,3s_{x/y}}{b} \quad (\text{A 5.10})$$

$$LQ = \frac{10s_{x/y}}{b} \quad (\text{A 5.11})$$

Outra forma de determinar os limiares analíticos do sistema de SPME-GC/MS, baseia-se na relação sinal/ ruído de 3 e 10 respetivamente, as expressões utilizadas são as seguintes:

$$\frac{S}{R} = 3 \quad (\text{A 5.12})$$

$$\frac{S}{R} = 10 \quad (\text{A 5.13})$$

onde R é a altura média do ruído (para as três réplicas efetuadas) e S a altura do pico cromatográfico caracterizado por ser três vezes a altura do ruído no caso da determinação do LD e 10 vezes a altura do ruído no caso do LQ.

Uma outra alternativa para determinar os limiares analíticos do método SPME-GC/MS centra-se na análise de 10 réplicas independentes fortificadas com um nível baixo de concentração e aplicando as seguintes expressões:

$$LD = 0 + 3,3s \quad (\text{A 5.16})$$

$$LQ = 0 + 10s \quad (\text{A 5.17})$$

onde s representa o valor do desvio padrão .

A concentração (c) de uma solução preparada a partir da massa de anatoxina-a é dada por:

$$c = \frac{m}{V} \quad (\text{A 5.18})$$

100

Considerando que a massa da anatoxina-a fornecida é de 1,00 mg, estima-se para a incerteza da concentração da solução mãe o valor de $1,00 \pm 0,01$ mg/mL obtido recorrendo a expressão:

$$\frac{\sigma_{cf}}{cf} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{Vf}}{Vf}\right)^2} \quad \text{(A 5.19)}$$

Quanto às concentrações das soluções padrão preparadas por diluição são calculadas recorrendo à seguinte expressão:

$$C_i \times V_i = cf \times V_f \quad \text{(A 5.20)}$$

onde, c_i é a concentração inicial, V_i o volume inicial, cf a concentração final e V_f o volume final.

A incerteza associada à concentração das soluções padrão é dada por:

$$\frac{\sigma_{cf}}{cf} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{c_i}}{c_i}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{V_i}}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{V_f}}{V_f}\right)^2} \quad \text{(A 5.21)}$$