



QUANTIFICAÇÃO DE CIANOTOXINAS POR HPLC/MS²
EM AMOSTRAS DE ÁGUA NATURAL E URINA HUMANA

TESE SUBMETIDA À FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS FORENSES

Nuno Filipe Santos Magalhães, nº 201302136
(Licenciado em Ciências Biomédicas)

Orientadora: Professora Doutora Maria da Conceição Mateus,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve

Coorientador: Professor Doutor Ricardo Dinis-Oliveira, Faculdade
de Medicina da Universidade do Porto

Porto, setembro de 2015

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Nuno Filipe Santos Magalhães)

Copyright

A Universidade do Porto e a Universidade do Algarve têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“O local do crime é a última oportunidade da vítima falar”.

Eliana Sarres Pessoa

“Um perito é uma pessoa que cometeu todos os erros que podem ser cometidos num campo muito estreito”.

Niels Bohr

Agradecimentos

Quero expressar os meus sinceros agradecimentos a várias pessoas e entidades que deram o seu contributo para que a concretização da presente dissertação fosse possível.

À Dr.^a Delminda Simões pela atenção e disponibilidade na escolha de um orientador para a tese.

Aos meus orientadores Professora Doutora Maria da Conceição Mateus e Professor Doutor Ricardo Dinis-Oliveira pelo incentivo, orientação científica, disponibilidade, confiança, simpatia, paciência, apoio, sugestões, correções e conhecimentos transmitidos durante a realização do projeto.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve pela disponibilidade das instalações e equipamentos necessários para a execução do trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos pela simpatia e oportunidade de realização de análises por HPLC/MS² no CIIMAR.

Aos Professores Doutores Margarida Reis, José Paulo da Silva, Manuel Aureliano Alves e Pedro Reis pelos ensinamentos transmitidos e pelo apoio e disponibilidade demonstrados.

À Joana Azevedo pela simpatia, colaboração, incentivo e sugestões concedidas durante a fase preliminar do trabalho.

À Ana Flor, Sandra Mesquita, Sandra Caetano e Cristina Costa pela disponibilidade, amabilidade, apoio e ensinamentos transmitidos.

À Eng.^a Catarina Pires e Dr.^a Rosário Lopes pela disponibilidade dos materiais e reagentes sempre que solicitada.

Aos meus colegas de laboratório Débora Mendes, Maria Rodrigues, Inês Morgado, Muhammad Ramzan e Catarina Diniz pela amizade, apoio e sugestões concedidas.

A vários amigos pela amizade, apoio e motivação demonstrados durante todo este período. Apenas quero deixar uma palavra de apreço para o Cristiano Sousa, um irmão de outra mãe a quem tudo devo e me orgulho imenso.

E claro, à minha família, sobretudo aos meus pais e irmão que são o alicerce da minha vida, pela amabilidade, carinho, dedicação, confiança, apoio e incentivo prestados desde sempre e para sempre.

Foi uma longa e árdua caminhada com muitos desafios pela frente, mas graças a vocês consegui superá-los e, assim, virar mais uma página da história da minha vida.

A todos vós, o meu profundo e eterno obrigado.

Resumo

A saxitoxina (STX) e a cilindrospermopsina (CYN) constituem duas cianotoxinas responsáveis pelo elevado número de casos registados de intoxicações humanas a nível mundial, devido ao seu potencial de toxicidade e bioterrorismo. Neste trabalho otimizou-se um método analítico de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) associada à espectrometria de massa (MS^2), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) nas polaridades positiva e negativa, para separar e detetar estas cianotoxinas em amostras de água natural e urina humana. Para a preparação das amostras implementou-se um método de extração em fase sólida (SPE) revelado como eficiente e preciso para extrair apenas a CYN, com eficiências de recuperação de $89,4 \pm 7,3\%$ e de $70,2 \pm 2,8\%$ para as concentrações mais altas e mais baixas, respetivamente, em água natural. Os limites de quantificação (LQ) instrumentais obtidos em água natural a partir da curva de calibração e através da razão sinal-ruído foram de 5,9 e 1,5 $\mu\text{g/L}$ para a STX, enquanto para a CYN foram de 12,9 e 2,4 $\mu\text{g/L}$ em modo positivo e de 8,5 e 2,8 $\mu\text{g/L}$ em modo negativo, respetivamente, todos acima do valor recomendado de 1 $\mu\text{g/L}$ pela OMS. No entanto, o LQ do método de 0,036 $\mu\text{g/L}$ é inferior ao valor recomendado. As cianotoxinas foram separadas numa coluna C18 com um gradiente de água/metanol com 0,1% de ácido fórmico. Este procedimento analítico foi aplicado para a análise de amostras reais de água natural colhidas em maio de 2013 em vários locais da barragem do Alqueva, não tendo sido detetada a CYN. Nas amostras de urina ocorreu supressão total do sinal das cianotoxinas. Apenas se verificou sinal em ensaios de extração de urina diluída com eficiências de recuperação da CYN de $30,2 \pm 9,0\%$. Efetuou-se ainda um estudo complementar para outras cianotoxinas designadas microcistinas (MCT), particularmente as variantes MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR.

Palavras-chave: Saxitoxina; cilindrospermopsina; HPLC/ MS^2 ; SPE; água natural; urina

Abstract

Saxitoxin (STX) and cylindrospermopsin (CYN) are two cyanotoxins responsible for numerous reported cases of human poisoning worldwide, because of their toxicity and bioterrorism potential. In this work it was optimized an analytical method of high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS²), with an electrospray ionization (ESI) source in positive and negative polarities, to separate and identify these cyanotoxins in natural water and human urine samples. For sample preparation it was implemented a solid phase extraction (SPE) method revealed as efficient and accurate to extract only CYN, with recovery efficiencies of $89.4 \pm 7.3\%$ and $70.2 \pm 2.8\%$ for the higher and lower concentrations, respectively, in natural water. The instrumental limits of quantification (LOQ) obtained in natural water from the calibration curve and through the signal-to-noise ratio were 5.9 and 1.5 $\mu\text{g/L}$ for STX, while for CYN were 12.9 and 2.4 $\mu\text{g/L}$ in positive mode and 8.5 and 2.8 $\mu\text{g/L}$ in negative mode, respectively, all above the recommended value of 1 $\mu\text{g/L}$ by WHO. However, the method LOQ of 0.036 $\mu\text{g/L}$ is below the recommended value. The cyanotoxins were separated on a C18 column with a gradient of water/methanol with 0.1% formic acid. This analytical procedure was applied for the analysis of real samples of natural water collected in May 2013 at several locations in Alqueva reservoir, in which CYN was not detected. In urine samples there was a full signal suppression of cyanotoxins. There was only signal in extraction assays of diluted urine with recovery efficiencies of CYN of $30.2 \pm 9.0\%$. It was also made an additional study to other cyanotoxins called microcystins (MCT), particularly the MCT-LR, MCT-RR and MCT-YR variants.

Keywords: Saxitoxin; cylindrospermopsin; HPLC/MS²; SPE; natural water; urine

Lista de abreviaturas e siglas

ACN – Acetonitrilo

APCI – Ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

API – Ionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*)

ARfD – Dose aguda de referência (*Acute Reference Dose*)

b – Ordenada na origem

C – Átomo de carbono

C8 – Grupo octacilo

C18 – Grupo octadecilo

Ca²⁺ – Ião cálcio

CID – Dissociação induzida por colisão (*Collision-Induced Dissociation*)

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Cl – Átomo de cloro

Cl⁻ – Ião cloreto

CN – Grupo cianopropilo

CV – Coeficiente de variação

CWC – Convenção de Armas Químicas (*Chemical Weapons Convention*)

CYN – Cilindrospermopsina

CYP450 – Citocromo P450

DAD – Detetor de arranjo de fotodíodos (*Diode Array Detector*)

DC – Corrente direta (*Direct Current*)

DCM – Diclorometano

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

Do-CYN – 7-Desoxicilindrospermopsina

DP (ou s) – Desvio-padrão absoluto

e⁻ – Eletrão

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

EIC – Cromatograma de iões extraídos (*Extracted Ion Chromatogram*)

Epi-CYN – 7-Epicilindrospermopsina

ESI – Ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization*)

eV – *Electrovolt*

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

g – Grama

GC – Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)

GC-MS – Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (*Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*)

GLC – Cromatografia líquida gravitacional (*Gravitational Liquid Chromatography*)

GTX – Goniautoxinas

h – Hora

H – Átomo de hidrogénio

HCl – Ácido clorídrico

HCT – Armadilhas de iões de alta capacidade (*High Capacity Ion Traps*)

He – Átomo de hélio

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography*)

ICH – Conferência Internacional sobre a Harmonização (*International Conference on Harmonization*)

i.e. – Isto é

IPQ – Instituto Português da Qualidade

ISO – Organização Internacional de Normalização (*International Standard Organization*)

IT – Armadilha de iões (*Ion Trap*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

K⁺ – Ião potássio

kg – Quilograma

L – Litro

LC – Cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*)

LD – Limite de deteção

LD50 – Dose letal 50 (*Lethal Dose 50*)

Li⁺ – Ião lítio

LQ – Limite de quantificação

m – Declive ou coeficiente angular da reta

M – Molar

MCT – Microcistina

Me⁺ – Catião metálico

MeOH – Metanol

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mol – Mole

MRM – Monitorização de uma reação múltipla (*Multiple Reaction Monitoring*)

- mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*)
- MS** – Espetrometria de massa (*Mass Spectrometry*)
- MSⁿ** – Espetrometria de massa (*Mass Spectrometry*) em tandem
- m/z** – Razão massa/carga
- n** – Número total de amostras/análises
- N** – Átomo de azoto
- N₂** – Molécula de azoto
- Na⁺** – Ião sódio
- NaCl** – Cloreto de sódio
- NaOH** – Hidróxido de sódio
- neoSTX** – Neosaxitoxina
- NH₄⁺** – Ião amónio
- nm** – Nanómetro
- NP** – Fase normal (*Normal Phase*)
- O** – Átomo de oxigénio
- OH** – Grupo hidroxilo
- OMS** – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)
- ppb** – Partes por bilião
- PS-DVB** – Poliestireno-divinilbenzeno (*Polystyrene Divinylbenzene*)
- PSP** – Envenenamento paralisante através do marisco (*Paralytic Shellfish Poisoning*)
- PST** – Toxinas paralisantes através do marisco (*Paralytic Shellfish Toxins*)
- PVDF** – Fluoreto de polivinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)
- Q1** – Primeiro quadrupolo
- Q2** – Câmara de colisão
- Q3** – Segundo quadrupolo
- r²** – Coeficiente de determinação
- RC** – Celulose regenerada (*Regenerated cellulose*)
- RELACRE** – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
- rf** – Radiofrequência
- RP** – Fase reversa (*Reverse Phase*)
- rpm** – Rotações por minuto
- RSD** – Desvio-padrão relativo (*Relative Standard Deviation*)
- s** – Segundo
- S** – Átomo de enxofre
- SFC** – Cromatografia de fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Chromatography*)
- Si** – Átomo de silício
- SIM (ou SIR)** – Monitorização de um ião selecionado (*Selected Ion Monitoring*)

SPE – Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPFP – Envenenamento com a saxitoxina através do peixe-balão (*Saxitoxin Puffer-Fish Poisoning*)

SQr – Soma do quadrado dos níveis residuais

SRM – Monitorização de uma reação selecionada (*Selected Reaction Monitoring*)

STX – Saxitoxina

STXeq – Equivalentes da saxitoxina (*Saxitoxin equivalents*)

S_y – Desvio-padrão absoluto dos níveis residuais

TIC – Corrente total de iões (*Total Ion Current*)

TQ – Triplo quadrupolo (*Triple Quadrupole*)

TR – Tempo de retenção

V – Volt

Vpp – Tensão de pico-a-pico (*peak-to-peak voltage*)

\bar{x} – Média aritmética

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrómetro

µM – Micromolar

Lista de figuras

Capítulo 2

Figura 2.1. Exemplos de <i>blooms</i> com espumas de tonalidade azul-esverdeada (a) e vermelha (b) resultantes da proliferação de cianobactérias.....	8
Figura 2.2. Estrutura química da STX	11
Figura 2.3. Mecanismo de ação da STX	14
Figura 2.4. Relação entre a quantidade das PST (em μg de STXeq) que um determinado alimento pode conter (ARfD) e a quantidade de marisco (em g) que pode ser consumível tendo em conta o nível de quarentena, ambas em função do peso corporal do ser humano (em kg)	16
Figura 2.5. Estrutura química da CYN.....	17
Figura 2.6. Mecanismo de ação da CYN.....	19

Capítulo 3

Figura 3.1. Principais etapas envolvidas na técnica de SPE	26
Figura 3.2. Esquema de um equipamento de HPLC modular.....	30
Figura 3.3. Estrutura química da sílica	33
Figura 3.4. Espectrómetro de massa típico composto por três módulos	34
Figura 3.5. Esquema de todo o processo de ionização em modo positivo por <i>electrospray</i>	35
Figura 3.6. Esquema estrutural da <i>Ion Trap</i> e o seu princípio de ação.....	37
Figura 3.7. Princípio de fragmentação na <i>Ion Trap</i>	38
Figura 3.8. Esquema estrutural do triplo quadrupolo	39
Figura 3.9. Esquema de um detetor multiplicador de eletrões.....	40

Capítulo 4

Figura 4.1. Cartuchos utilizados para os métodos de SPE. (a) <i>Chromabond Easy</i> (3 mL/200 mg); (b) <i>Chromabond C18</i> (3 mL/200 mg); (c) <i>GracePure C18-Aq</i> (3 mL/500 mg); (d) <i>Bond Elut Env</i> (3 mL/200 mg); (e) <i>Bond Elut Carbon</i> (6 mL/500 mg)	49
Figura 4.2. Coluna <i>GraceSmart RP-18</i> (150 x 2,1 mm; 3 μm) utilizada em HPLC/MS para efeitos de separação cromatográfica.....	50
Figura 4.3. Equipamentos de HPLC/MS. (a) HPLC da <i>Waters Alliance 2695</i> associada a um detetor da <i>Quattro micro API</i> ; (b) HPLC da <i>Agilent Technologies 1200 Series</i> associada a um detetor da <i>Bruker Daltonics HCT Ultra</i>	51

Capítulo 5

Figura 5.1. Cromatogramas em modo SIM com polaridade positiva de ambas as cianotoxinas em estudo.....	60
Figura 5.2. Cromatograma em modo <i>Daughters</i> com polaridade positiva das cianotoxinas. O primeiro pico cromatográfico corresponde à STX, enquanto o segundo é referente à CYN.....	60

Figura 5.3. Espectros MS ² com polaridade positiva das cianotoxinas	61
Figura 5.4. Cromatograma em modo MRM com polaridade positiva das cianotoxinas, correspondendo o primeiro pico cromatográfico à STX com a transição 300 > 204, enquanto o segundo é referente à CYN com a transição 416 > 336.....	61
Figura 5.5. Espectros em modo <i>full scan</i> (a) e MS ² (b) da STX com polaridade positiva após infusão direta de uma solução padrão de 500 µg/L em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético	63
Figura 5.6. Espectros em modo <i>full scan</i> (a) e MS ² (b) da CYN com polaridade positiva após infusão direta de uma solução padrão de 500 µg/L em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético	63
Figura 5.7. Espectros em modo <i>full scan</i> (a) e MS ² (b) da CYN com polaridade negativa após infusão direta de uma solução padrão de 500 µg/L em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético	64
Figura 5.8. Cromatograma em modo TIC (a) e espectro MS ² característico (b) da STX com polaridade positiva.....	65
Figura 5.9. Cromatograma em modo TIC (a) e espectro MS ² característico (b) da CYN com polaridade positiva.....	66
Figura 5.10. Cromatograma em modo TIC (a) e espectro MS ² característico (b) da CYN com polaridade negativa	66
Figura 5.11. Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 25 µg/L para a STX e de 1,5 a 200 µg/L para a CYN, incluindo a amostra branco	68
Figura 5.12. Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 3 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.....	68
Figura 5.13. Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 3 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.....	70
Figura 5.14. Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 3 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco	70
Figura 5.15. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH”	75
Figura 5.16. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração dos métodos de SPE “DCM-MeOH” e “DCM-MeOH B” aplicados no cartucho <i>Chromabond Easy</i>	76
Figura 5.17. Locais de amostragem de água natural nas barragens do Beliche e do Alqueva em maio de 2013.....	78
Figura 5.18. Cromatogramas em modo EIC e espectros MS ² com polaridade positiva relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração	81
Figura 5.19a. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva de extratos de urina acidificada, fortificados com 0,5 µg da CYN. Os espectros dos picos cromatográficos numerados encontram-se na figura 5.19b	83
Figura 5.19b. Espectros MS ² com polaridade positiva dos picos numerados.....	83

- Figura 5.20a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva (**a** e **b**) e negativa (**c** e **d**) de amostras de urina acidificadas, uma delas fortificada com 1 µg da CYN. Os espectros dos picos cromatográficos numerados encontram-se na figura 5.20b..... **84**
- Figura 5.20b.** Espectros MS² com polaridade positiva (1) e negativa (2) dos picos numerados..... **84**
- Figura 5.21.** Espectros *full scan* com polaridade positiva de soluções diluídas de urina tanto precipitada como natural, filtradas e fortificadas com ambas as cianotoxinas com a concentração de 500 µg/L. Os espectros **a** e **b** dizem respeito à STX, enquanto os espectros **c** e **d** são referentes à CYN..... **86**
- Figura 5.22.** Espectros *full scan* com polaridade negativa de soluções diluídas de urina tanto precipitada como natural, filtradas e fortificadas com ambas as cianotoxinas com a concentração de 500 µg/L. Os dois espectros são relativos apenas à CYN .. **86**
- Figura 5.23.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa de um ensaio de diluições de urina não precipitada, acidificada, filtrada e fortificada com 50 µg da CYN **87**
- Figura 5.24.** Cromatograma em modo TIC da CYN e das três variantes das MCT com polaridade negativa (**a**) com a determinação das áreas e dos tempos de retenção respectivos (**b**) **89**
- Figura 5.25.** Espectros MS² característicos da CYN (**a**) e das três variantes das MCT (**b**, **c** e **d**) com polaridade negativa..... **90**
- Figura 5.26.** Cromatogramas em modo MS² com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR **91**
- Figura 5.27.** Cromatogramas em modo MS² com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR..... **91**

Capítulo 8

- Figura 8.1.** Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco..... **109**
- Figura 8.2.** Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco..... **109**
- Figura 8.3.** Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco **110**
- Figura 8.4.** Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco **111**
- Figura 8.5.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas..... **113**
- Figura 8.6.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas. O sinal da STX encontra-se a azul, enquanto o sinal da CYN está representado a vermelho..... **113**

- Figura 8.7.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas..... 114
- Figura 8.8.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas. O sinal da CYN está representado a vermelho..... 114
- Figura 8.9a.** Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 115
- Figura 8.9b.** Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 115
- Figura 8.10a.** Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 116
- Figura 8.10b.** Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 116
- Figura 8.11a.** Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 117
- Figura 8.11b.** Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 117
- Figura 8.12a.** Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 118
- Figura 8.12b.** Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados 118
- Figura 8.13.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva dos extratos fortificados de água natural filtrada..... 119
- Figura 8.14.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa dos extratos fortificados de água natural filtrada..... 119
- Figura 8.15.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH” 120
- Figura 8.16a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “ACN” 120
- Figura 8.16b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “ACN” 121
- Figura 8.17.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração dos métodos de SPE “DCM-MeOH” e “DCM-MeOH B” aplicados no cartucho *Chromabond Easy* 121
- Figura 8.18a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH B” aplicado no cartucho *Bond Elut Carbon*..... 122
- Figura 8.18b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH B” aplicado no cartucho *Bond Elut Carbon*..... 122

- Figura 8.19a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN..... **123**
- Figura 8.19b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN..... **123**
- Figura 8.20a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,0125 µg da CYN..... **124**
- Figura 8.20b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,0125 µg da CYN..... **124**
- Figura 8.21a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à repetição do ensaio de precisão do método de SPE adotado para concentrações mais baixas da CYN (0,025 µg em amostras de água Milli-Q acidificadas) **125**
- Figura 8.21b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à repetição do ensaio de precisão do método de SPE adotado para concentrações mais baixas da CYN (0,025 µg em amostras de água Milli-Q acidificadas) **125**
- Figura 8.22.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR..... **126**
- Figura 8.23a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à avaliação do sinal para volumes iniciais distintos de amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN. As amostras 1 a 4 foram preparadas com um volume inicial de 200 mL, enquanto a amostra 5 foi preparada a partir de 100 mL **126**
- Figura 8.23b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à avaliação do sinal para volumes iniciais distintos de amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN. As amostras 1 a 4 foram preparadas com um volume inicial de 200 mL, enquanto a amostra 5 foi preparada a partir de 100 mL **127**
- Figura 8.24a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN **127**
- Figura 8.24b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN **128**
- Figura 8.25a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN **128**
- Figura 8.25b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN **129**
- Figura 8.26a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN **129**
- Figura 8.26b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN **130**

- Figura 8.27a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN **130**
- Figura 8.27b.** Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN **131**
- Figura 8.28.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR..... **131**
- Figura 8.29.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração **132**
- Figura 8.30a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração **133**
- Figura 8.30b.** Cromatogramas em modo EIC e espetros MS² com polaridade negativa relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração **134**
- Figura 8.31.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva de quatro extratos de urina acidificada, três dos quais fortificados com 0,5 µg da CYN..... **135**
- Figura 8.32a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva de duas amostras de urina não precipitada, acidificadas a valores de pH distintos e fortificadas com 1 µg da CYN..... **135**
- Figura 8.32b.** Cromatogramas em modo EIC e espetros MS² com polaridade positiva de duas amostras de urina não precipitada, acidificadas a valores de pH distintos e fortificadas com 1 µg da CYN..... **136**
- Figura 8.33.** Espetros *full scan* com polaridade positiva de soluções diluídas de urina não precipitada, filtradas e fortificadas com a STX com a concentração de 500 µg/L, testando o sinal obtido do ião-parental variando o agente ionizante e a sua concentração..... **136**
- Figura 8.34.** Espetros *full scan* com polaridade positiva de soluções diluídas de urina não precipitada, filtradas e fortificadas com a CYN com a concentração de 500 µg/L, testando o sinal obtido do ião-parental variando o agente ionizante e a sua concentração..... **137**
- Figura 8.35.** Espetros *full scan* com polaridade negativa de soluções diluídas de urina não precipitada, filtradas e fortificadas com a CYN com a concentração de 500 µg/L, testando o sinal obtido do ião-parental variando o agente ionizante e a sua concentração..... **137**
- Figura 8.36a.** Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva de amostras de urina não precipitada, diluídas de 1:10 e fortificadas com 5 µg da CYN **138**
- Figura 8.36b.** Cromatogramas em modo EIC e espetros MS² com polaridade positiva de amostras de urina não precipitada, diluídas de 1:10 e fortificadas com 5 µg da CYN **138**

Lista de tabelas

Capítulo 4

- Tabela 4.1.** Parâmetros cromatográficos e espectrométricos utilizados para a análise das cianotoxinas em estudo no equipamento de HPLC da *Waters Alliance 2695* associada ao detetor da *Quattro micro API* 52
- Tabela 4.2.** Parâmetros cromatográficos e espectrométricos otimizados para a STX em modo positivo e para a CYN em ambos os modos no equipamento de HPLC da *Agilent Technologies 1200 Series* acoplada ao detetor da *Bruker Daltonics HCT Ultra* 52
- Tabela 4.3.** Parâmetros cromatográficos e espectrométricos utilizados para a análise de três variantes das microcistinas (MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR) em modo negativo no equipamento de HPLC da *Agilent Technologies 1200 Series* acoplada ao detetor da *Bruker Daltonics HCT Ultra* 53
- Tabela 4.4.** Metodologias de SPE aplicadas em vários cartuchos para a avaliação da eficiência de extração..... 54
- Tabela 4.5.** Metodologia de SPE implementada para a extração de amostras 54

Capítulo 5

- Tabela 5.1.** Limites instrumentais e coeficientes de determinação corrigidos obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água pura 69
- Tabela 5.2.** Limites instrumentais e coeficientes de determinação corrigidos obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água natural..... 71
- Tabela 5.3.** Teste de homogeneidade de variâncias..... 71
- Tabela 5.4.** Ensaio de precisão instrumental para diferentes polaridades nas matrizes de água pura e água natural 73
- Tabela 5.5.** Ensaio de exatidão em água natural para duas concentrações distintas . 73
- Tabela 5.6.** Ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas e fortificadas com concentrações mais altas (0,25 µg/L) e mais baixas (0,0125 µg/L) da CYN 77
- Tabela 5.7.** Ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas, acidificadas e fortificadas com concentrações mais altas (0,25 µg/L) e mais baixas (0,025 µg/L) da CYN..... 79
- Tabela 5.8.** Ensaio de eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de urina não precipitada, diluídas dez vezes e fortificadas com 5 µg da CYN 88
- Tabela 5.9.** Eficiências de recuperação das cianotoxinas em água natural 92

Capítulo 8

- Tabela 8.1.** Espécies de cianobactérias produtoras das PST 107
- Tabela 8.2.** Espécies de cianobactérias produtoras da CYN 107
- Tabela 8.3.** Vantagens e desvantagens dos métodos analíticos atualmente aplicados para a detecção das cianotoxinas 108

Tabela 8.4. Limites instrumentais e coeficientes de determinação obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água pura	110
Tabela 8.5. Limites instrumentais e coeficientes de determinação obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água natural.....	111
Tabela 8.6. Valores percentuais a 99% de confiança (nível de significância 0,01) para a distribuição F	112
Tabela 8.7. Cálculo das concentrações efetivas nos extratos.....	119

Índice

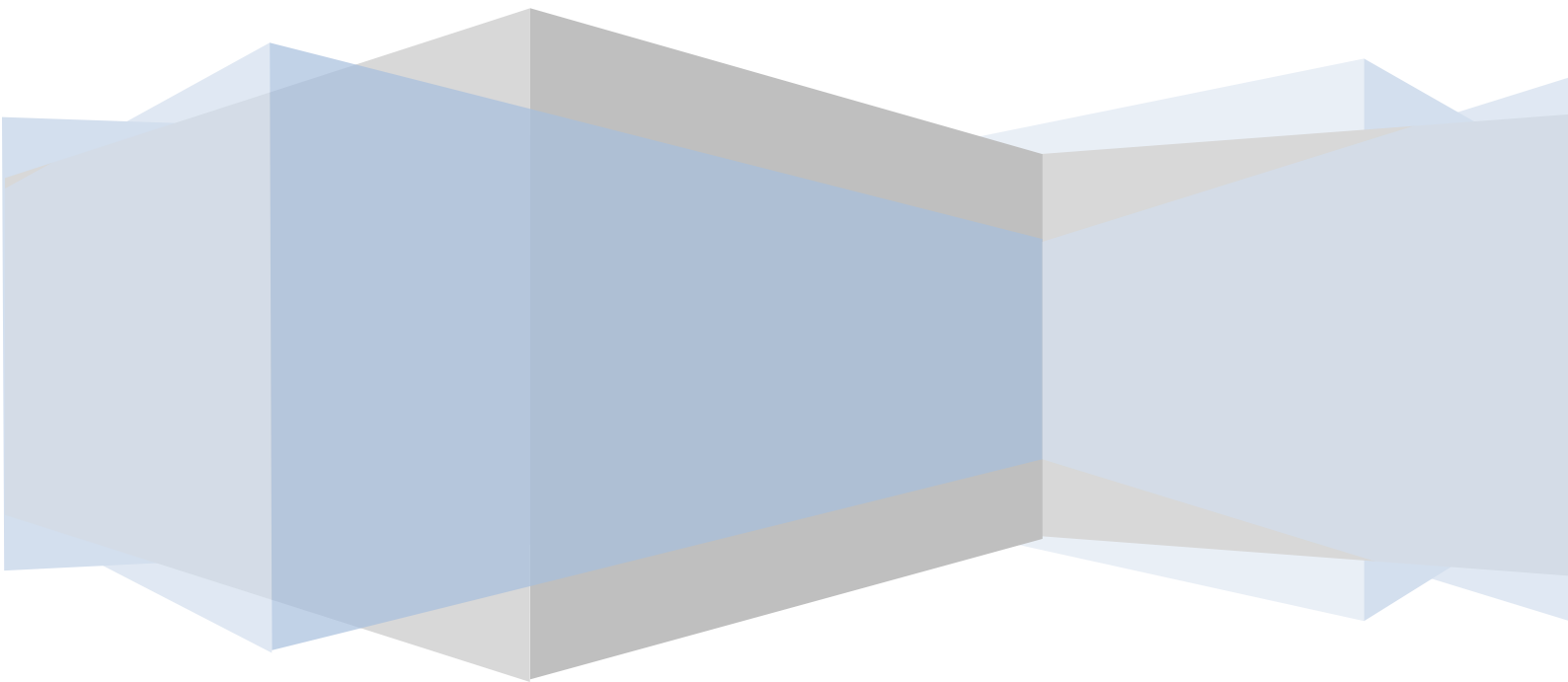
<i>Agradecimentos</i>	VII
<i>Resumo</i>	IX
<i>Abstract</i>	X
<i>Lista de abreviaturas e siglas</i>	XI
<i>Lista de figuras</i>	XV
<i>Lista de tabelas</i>	XXI
Capítulo 1. Enquadramento geral e objetivos	1
1.1. BREVE DESCRIÇÃO DO TEMA EM ESTUDO	3
1.2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
Capítulo 2. Cianobactérias e a produção de toxinas – Risco e detecção	5
2.1. CIANOBACTÉRIAS	7
2.1.1. BLOOMS E TOXICIDADE	7
2.1.2. MÉTODOS DE ANÁLISE	9
2.2. CIANOTOXINAS	9
2.2.1. SAXITOXINA	11
2.2.1.1. Estrutura química e propriedades.....	11
2.2.1.2. Distribuição e ocorrência.....	12
2.2.1.3. Impacto na saúde humana.....	13
2.2.1.3.1. Mecanismo de toxicidade.....	13
2.2.1.3.2. Principais vias de exposição.....	14
2.2.1.3.3. Casos clínicos de intoxicação.....	15
2.2.1.4. Regulamentos.....	15
2.2.2. CILINDROSPERMOPSINA	16
2.2.2.1. Estrutura química e propriedades.....	16
2.2.2.2. Distribuição e ocorrência.....	17
2.2.2.3. Impacto na saúde humana.....	18
2.2.2.3.1. Mecanismo de toxicidade.....	18
2.2.2.3.2. Principais vias de exposição.....	19
2.2.2.3.3. Casos clínicos de intoxicação.....	20
2.2.2.4. Regulamentos.....	20
2.2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE	21
2.2.3.1. Procedimentos de extração/concentração.....	21
2.2.3.2. Procedimentos de detecção/determinação.....	21
Capítulo 3. Extração por SPE e detecção por HPLC/MS – Estado da arte ..	23
3.1. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	25

3.1.1. ETAPAS DO MÉTODO DE SPE.....	25
3.1.2. TIPOS DE ADSORVENTE E SUAS INTERAÇÕES	27
3.2. SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	28
3.2.1. PRINCÍPIO E EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	28
3.2.2. SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO.....	29
3.2.3. PROPRIEDADES DAS FASES E DAS COLUNAS	31
3.2.3.1. Fase móvel.....	31
3.2.3.2. Coluna cromatográfica e fase estacionária.....	32
3.3. DETEÇÃO POR ESPETROMETRIA DE MASSA.....	33
3.3.1. FONTES DE IONIZAÇÃO: <i>ELECTROSPRAY</i>	34
3.3.2. ANALISADORES DE MASSAS.....	36
3.3.2.1. Armadilha de iões.....	36
3.3.2.2. Triplo Quadrupolo.....	39
3.3.3. DETETORES	40
3.4. HPLC HIFENADA A MS: UM CASAMENTO (QUASE) PERFEITO	40
3.5. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO	42
3.5.1. LINEARIDADE	42
3.5.2. ESPECIFICIDADE	44
3.5.3. PRECISÃO	44
3.5.4. EXATIDÃO	45
3.5.5. LIMITES DE DETEÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	45
3.5.6. RECUPERAÇÃO (EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO).....	46
Capítulo 4. <i>Materiais e métodos utilizados</i>	47
4.1. MATERIAIS.....	49
4.1.1. CARTUCHOS	49
4.1.2. COLUNA CROMATOGRÁFICA	49
4.1.3. SOLVENTES	50
4.1.4. PADRÕES CERTIFICADOS.....	50
4.2. EQUIPAMENTOS DE HPLC/MS.....	50
4.3. MÉTODOS.....	51
4.3.1. ANÁLISE POR HPLC/MS ²	51
4.3.2. EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS PELO MÉTODO DE SPE.....	54
4.3.3. PREPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	55
4.3.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS REAIS	55
Capítulo 5. <i>Resultados obtidos e sua discussão</i>	57
5.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	59
5.1.1. HPLC/MS COM TRIPLO QUADRUPOLO.....	59

5.1.2. HPLC/MS COM ION TRAP	62
5.1.3. CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO ANALÍTICO	67
5.1.3.1. Curvas de calibração e sua linearidade	67
5.1.3.1.1. Teste de homogeneidade de variâncias	71
5.1.3.2. Especificidade	72
5.1.3.3. Precisão	72
5.1.3.4. Exatidão	73
5.2. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE SPE	74
5.2.1. ESCOLHA DO MÉTODO E DO CARTUCHO MAIS EFICIENTES	74
5.2.2. AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE SPE IMPLEMENTADO	77
5.2.2.1. Água pura.....	77
5.2.2.2. Água natural.....	78
5.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	80
5.3.1. ÁGUA NATURAL	80
5.3.2. URINA.....	82
5.4. ESTUDO COMPLEMENTAR COM OUTRAS CIANOTOXINAS.....	88
5.4.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	88
5.4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO.....	90
Capítulo 6. Conclusões e perspectivas futuras.....	93
6.1. CONCLUSÕES	95
6.2. PERSPETIVAS FUTURAS.....	96
Capítulo 7. Referências Bibliográficas	97
Capítulo 8. Anexos	105
8.1. ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DAS CIANOTOXINAS EM ESTUDO ...	107
8.2. RELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANALÍTICOS	108
8.3. CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO ANALÍTICO	109
8.3.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO	109
8.3.2. ESPECIFICIDADE	113
8.3.3. PRECISÃO.....	115
8.3.4. EXATIDÃO	119
8.4. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO	120
8.5. ENSAIOS DE PRECISÃO DO MÉTODO DE SPE IMPLEMENTADO	123
8.5.1. ÁGUA PURA	123
8.5.2. ÁGUA NATURAL	126
8.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	132
8.6.1. ÁGUA NATURAL	132
8.6.2. URINA.....	135

Capítulo 1

Enquadramento geral e objetivos



1.1. BREVE DESCRIÇÃO DO TEMA EM ESTUDO

As cianobactérias caracterizam-se como seres procariotas fotossintéticos com uma distribuição quase cosmopolita em sistemas aquáticos, sobretudo os de água doce e salobra. Estes microrganismos, sob condições eutróficas, proliferam de forma exponencial à superfície destes sistemas, contribuindo para a formação de espumas secas azuis-esverdeadas ou vermelhas designadas por *blooms*, cuja intensidade e duração dependem das condições climáticas verificadas na região (Falconer *and* Humpage, 2005; Martins *et al.*, 2005). Em certos *blooms*, contudo, as cianobactérias podem produzir metabolitos secundários com potencial tóxico, referidos como cianotoxinas, que são responsáveis pela ocorrência de um elevado número de casos de intoxicações humanas em todo o mundo, seja por exposição direta através da ingestão de água contaminada, seja por consumo de organismos contaminados (Guzmán-Guillén *et al.*, 2012; Merel *et al.*, 2013). De momento são conhecidas inúmeras cianotoxinas com diferentes graus e mecanismos de toxicidade, das quais constituem objeto para o presente estudo a neurotoxina saxitoxina (STX) e a citotoxina cilindrospermopsina (CYN), uma vez que já foram identificadas em Portugal e apresentam potencialidade para o bioterrorismo, para além de poderem ser usadas como munições de armas (Anderson, 2012; Valério *et al.*, 2010).

Assim sendo, o papel do toxicologista forense consiste em identificar as cianotoxinas e/ou espécies produtoras responsáveis pela intoxicação fatal de determinados indivíduos, e determinar se tal consequência trágica se deveu a condições de exposição naturais ou induzidas por ações terroristas. Como em qualquer área forense, é fundamental que o método de análise escolhido pelo cientista assegure um alto nível de confiabilidade e cumpra com os critérios de garantia e de controlo de qualidade estabelecidos pelos programas de validação de modo a atribuir qualidade e credibilidade a um resultado analítico (Wood *et al.*, 2006). Dos métodos analíticos aplicados atualmente para a deteção das cianotoxinas destacam-se os métodos químicos, nomeadamente a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) associada à espetrometria de massa (MS), devido à sua elevada especificidade, sensibilidade e viabilidade para a análise de uma gama muito diversificada de compostos (Wu *and* French, 2013).

Tendo em consideração o impacto ambiental, social e económico causado pelas cianotoxinas, urge assim a necessidade de se implementar programas de monitorização e até mesmo desenvolver métodos para a descontaminação de águas contaminadas, de forma a diminuir os riscos para a saúde e, por conseguinte, prevenir as intoxicações (Merel *et al.*, 2013).

1.2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

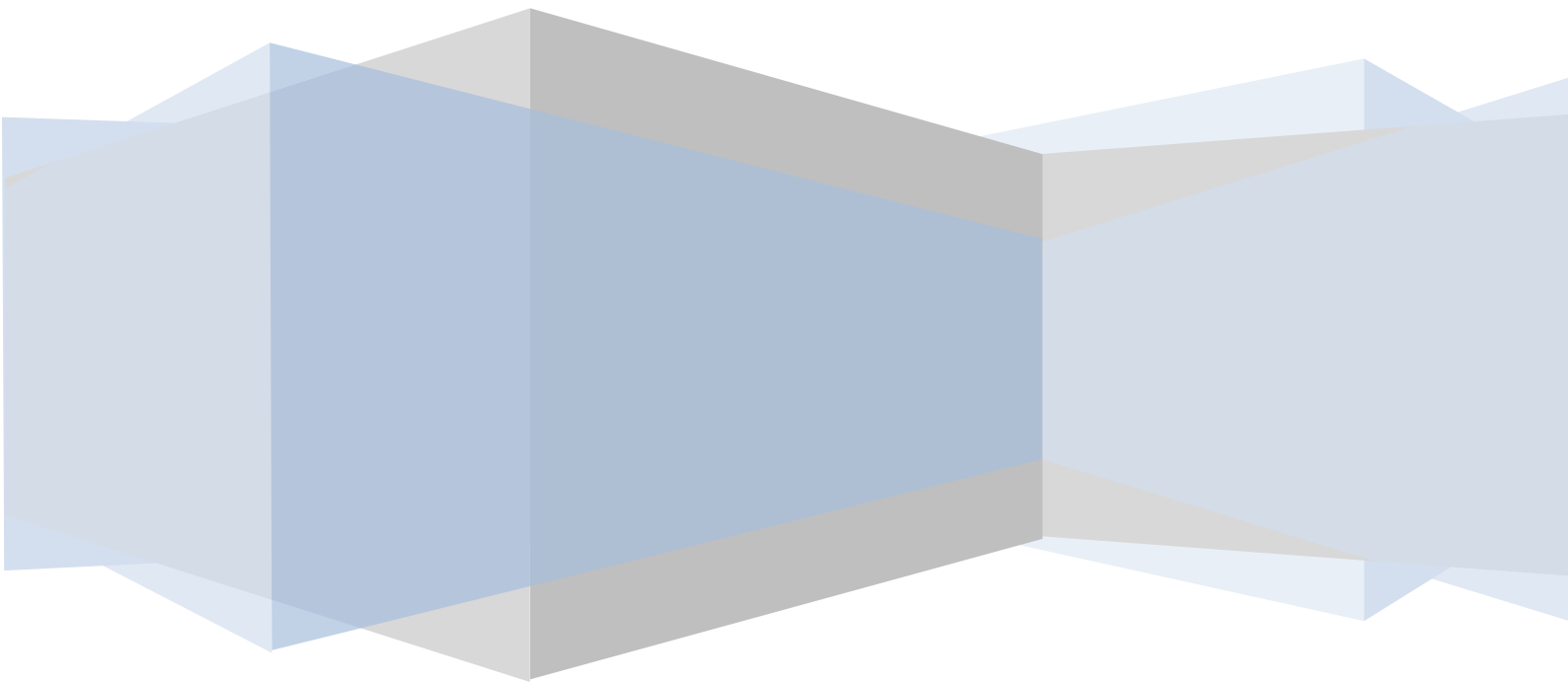
Neste trabalho o objetivo principal passa então por identificar e quantificar as cianotoxinas referidas (STX e CYN) em amostras reais (amostras de água natural e urina humana) com recurso a um sistema de HPLC/MSⁿ associado a uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Esta técnica hifenada constitui uma ferramenta analítica bastante poderosa, pois associa a capacidade separativa da HPLC com as propriedades de identificação e quantificação da MS quando usada como módulo de deteção, daí apresentar uma vasta gama de aplicações em diversas áreas, incluindo a toxicologia forense (Cusick *and* Saylor, 2013).

É apresentada uma divisão do projeto em três etapas fundamentais com o intuito de concretizar o objetivo proposto, cada qual com objetivos específicos definidos:

- **Primeira etapa:** Ensaio de um método de análise das cianotoxinas em estudo por HPLC associada à MS (HPLC/MS²).
 - Otimizar as condições cromatográficas e espetrométricas que melhor se ajustam para a separação e deteção, respetivamente, da STX e da CYN através de análises de soluções com concentrações conhecidas obtidas a partir dos padrões certificados correspondentes.
- **Segunda etapa:** Implementação do método de extração em fase sólida (SPE) mais eficiente para a extração das cianotoxinas a partir de soluções aquosas fortificadas.
 - Preparar a amostra aquosa fortificada com uma concentração conhecida das soluções padrão das cianotoxinas pelo método de SPE para posterior análise cromatográfica;
 - Determinar as percentagens de recuperação e respetivos ensaios de precisão para as diferentes cianotoxinas e amostras.
- **Terceira etapa:** Análise de alguns parâmetros de validação e aplicação do método desenvolvido a amostras reais.
 - Analisar a linearidade, a especificidade, a precisão, a exatidão e os limites de deteção e de quantificação tanto a nível instrumental como do método;
 - Aplicar o método analítico otimizado nas duas etapas anteriores à análise de amostras reais (amostras de água natural e urina humana).

Capítulo 2

*Cianobactérias e a produção de toxinas –
Risco e detecção*



2.1. CIANOACTÉRIAS

As cianobactérias são dos microrganismos mais antigos que vivem à face da Terra, cujos registos fósseis datam de há 3,5 bilhões de anos atrás (Moreira *et al.*, 2013). Elas caracterizam-se como seres procariotas gram-negativos com capacidade fotossintética dada a presença dos pigmentos de clorofila e ficocianina, característica que os torna únicos em relação a outros procariotas. Daí se considerar que tenham sido responsáveis pela transição da atmosfera da Terra desde o seu estado anaeróbico inicial até ao estado aeróbico atual. Além disso, também são capazes de fixar azoto da atmosfera para formar amónia, uma das suas fontes nutricionais, e de controlar a flutuabilidade na água através de vesículas gasosas, as quais lhes conferem uma densidade menor do que a da água, de modo a explorar a melhor exposição à luz solar para a realização da fotossíntese. Todas estas propriedades proporcionam-lhes vantagem competitiva em relação a outros microrganismos no ambiente aquático durante períodos de luz pouco intensa e de baixa concentração de nutrientes, resultando num maior predomínio da espécie nesse ambiente (Bownik, 2010; Msagati *et al.*, 2006).

Consoante as condições ambientais, estes microrganismos são responsáveis pela formação de florescências (também designadas como *blooms*), as quais têm vindo a aumentar tanto em frequência como em intensidade e duração nas últimas décadas (Martins *et al.*, 2005).

2.1.1. **BLOOMS E TOXICIDADE**

Esta proliferação exponencial das cianobactérias, contribuindo para a formação de *blooms*, ocorre à superfície de vários recursos hídricos, como os abastecimentos de água potável, as áreas recreativas e as zonas de aquacultura (Martins *et al.*, 2005), originando espumas secas. Estas apresentam um odor e sabor desagradáveis e exibem uma tonalidade azul-esverdeada ou vermelha (figura 2.1.), resultante da libertação do pigmento fotossintético ficocianina. Daí que as cianobactérias também sejam vulgarmente conhecidas como algas azuis-esverdeadas (Falconer *and* Humpage, 2005).

A intensidade e duração dos *blooms* são influenciadas por diversos fatores ambientais e físico-químicos, entre os quais pH, temperatura, exposição à luz, corrente e teor de nutrientes no ambiente aquático. As cianobactérias crescem favoravelmente em condições neutras ou básicas, onde o valor de pH é igual ou superior a 7. Temperaturas mais elevadas entre 20 a 25°C também propiciam um melhor desenvolvimento destes microrganismos em relação a outros existentes no

fitoplâncton, como algas verdes e diatomáceas, que preferem temperaturas inferiores, conferindo-lhes uma outra vantagem competitiva. Assim, verifica-se uma maior presença de *blooms* durante o final do verão e o início do outono, contudo, este período poderá alargar tendo em conta o aumento da temperatura global resultante das alterações climáticas. Já em relação à exposição à luz, tem-se constatado que a sua qualidade, intensidade e duração são específicas de cada espécie e que, no geral, o aumento destes parâmetros desencadeia a migração das cianobactérias para a superfície da água, por forma a realizar a fotossíntese. Quanto à corrente de água, estes seres preferem águas estagnadas ou com pouca corrente. Por fim, o uso de fertilizantes agrícolas, o escoamento urbano e as descargas de esgoto em conjunto contribuem para o aumento progressivo dos níveis nutricionais no ambiente aquático, num processo designado por eutrofização, o qual também facilita o crescimento das cianobactérias (Falconer *and* Humpage, 2005; Merel *et al.*, 2013; Msagati *et al.*, 2006).

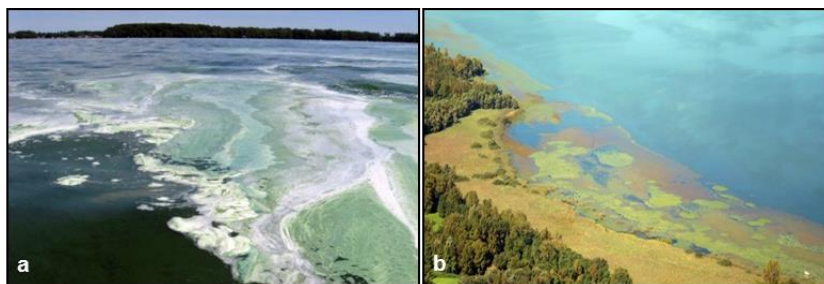


Figura 2.1. Exemplos de *blooms* com espumas de tonalidade azul-esverdeada (a) e vermelha (b) resultantes da proliferação de cianobactérias (imagem **a** da autoria de *Lake Improvement Association*, 2014, e imagem **b** de Pucci, 2014).

A situação agrava-se quando em determinados *blooms* as cianobactérias produzem alguns metabolitos secundários de carácter tóxico, os quais têm vindo a afligir a comunidade nos últimos tempos dado o seu impacto a nível ambiental, económico e social. Das mais de 2.000 espécies até hoje identificadas de cianobactérias, apenas 40 são tóxicas, pertencendo a 20 géneros de 3 ordens na taxonomia filogenética (Guzmán-Guillén *et al.*, 2012). No entanto, a toxicidade não se encontra omnipresente entre estes microrganismos, significando que dentro de uma espécie considerada tóxica a expressão poderá ser variável e existirem estirpes que carecem dessa característica (Hiller *et al.*, 2007). Tudo depende se as cianobactérias possuem ou não os genes apropriados para a produção das cianotoxinas e do momento da sua expressão, a qual é influenciada pelas condições ambientais. Assim, a toxicidade pode variar tanto entre *blooms*, como no próprio *bloom*, não bastando apenas uma identificação morfológica através de microscopia para determinar essa toxicidade e distinguir espécies tóxicas de não-tóxicas (Merel *et al.*, 2013).

2.1.2. MÉTODOS DE ANÁLISE

A ocorrência de *blooms* com a eventual produção de cianotoxinas constitui um sério risco para a saúde pública, dado o número crescente de casos de intoxicações. Além disso, fenómenos como as alterações climáticas e o bioterrorismo agravam consideravelmente este cenário. Assim sendo, urge a necessidade de implementar métodos de análise que permitam detetar as cianobactérias, as suas toxinas, ou então ambas, de modo a prevenir a população da sua presença em determinado recurso hídrico. Por outro lado, e numa perspetiva forense, a identificação do composto e/ou espécie produtora responsáveis pela intoxicação fatal de um certo número de indivíduos é fundamental na resolução do(s) caso(s) em questão.

Hoje em dia um método de análise comum para detetar as cianobactérias baseia-se na medição da clorofila, um dos pigmentos necessários para a realização da fotossíntese. No entanto, este pigmento também se encontra presente noutras espécies de algas, o que limita a interpretação dos resultados, não sendo de todo uma técnica discriminatória. Não obstante, este problema poderá ser ultrapassado com a medição de outro pigmento fotossintético já mais específico das cianobactérias, a ficocianina, de tal modo que a análise conjunta de ambos os pigmentos permite relacionar a proporção das cianobactérias com a de outras espécies do fitoplâncton (Merel *et al.*, 2013).

A microscopia de fluorescência tem-se revelado uma metodologia eficaz na contagem e na identificação das cianobactérias, mesmo até ao nível da espécie. Para que tal identificação seja fiável, contudo, é necessário um observador experiente com um elevado nível de especialização taxonómica, para além de que a técnica *per se* não permite inferir conclusões acerca da toxicidade das cianobactérias, não se podendo distinguir espécies tóxicas de não-tóxicas (Moreira *et al.*, 2011).

Mais métodos têm sido propostos, sendo os de cariz molecular os mais fidedignos uma vez que, ao contrário da microscopia de fluorescência, permitem revelar quais das espécies de cianobactérias em estudo são tóxicas através da presença de certos genes com a informação para a produção dos metabolitos tóxicos.

2.2. CIANOTOXINAS

Como já referido na secção 2.1.1., alguns *blooms* de cianobactérias poderão revelar toxicidade com a produção de certos metabolitos secundários que são tóxicos para diversos seres vivos, incluindo os humanos, podendo causar impactos a nível ambiental, social e económico.

A nível ambiental, a produção de cianotoxinas pode ser considerada como uma vantagem evolutiva, pois permite controlar a diversidade de fitoplâncton e zooplâncton existente nos sistemas aquáticos com o conseqüente domínio de determinadas espécies de cianobactérias, resultando em desequilíbrios ecológicos e na contaminação do meio ambiente (Campos *et al.*, 2013; Valério *et al.*, 2010). A nível social, a contaminação dos vários recursos hídricos, que inviabiliza o uso de água potável no caso dos abastecimentos municipais e os conseqüentes casos de intoxicações, seja por consumo impróprio de organismos contaminados seja por exposição direta às cianotoxinas, colocam em risco a saúde pública. Já a vertente económica é influenciada pela interdição das áreas recreativas contaminadas, que prejudica consideravelmente o turismo, e pelos custos associados à manutenção e funcionamento de programas de monitorização desses recursos hídricos, às conseqüências para a saúde e aos programas de investigação (Merel *et al.*, 2013). Por outro lado, estes compostos também poderão suscitar interesse noutros domínios, nomeadamente a nível farmacêutico (Martins *et al.*, 2005).

Há que salientar, contudo, que a grande maioria das cianotoxinas não é constantemente excretada para o meio ambiente. Elas são essencialmente endotoxinas, libertando-se apenas nas fases de senescência ou morte e conseqüente lise das cianobactérias quando os *blooms* já se encontram envelhecidos ou em declínio. Certos métodos de tratamento de água praticados para a erradicação das cianobactérias, como o uso de algicidas, também poderão contribuir para este processo (Corbel *et al.*, 2014).

Do ponto de vista farmacológico e toxicológico, muitas cianotoxinas são usadas como agentes de guerra química e em pequenas munições de armas de modo a causar o bioterrorismo. De facto, conhecendo o potencial de toxicidade destes compostos, e tendo em conta que não são voláteis, os terroristas podem utilizá-los potencialmente como agentes de aerossóis, dispersando-os numa área com elevada densidade populacional, ou então em fontes de água potável e de alimentos, contaminando-as. Estas são das práticas mais perigosas e, por isso, mais recorrentes (Anderson, 2012; Fang *et al.*, 2004).

Hoje em dia são conhecidas várias cianotoxinas, algumas delas possuindo variantes com diferentes graus de toxicidade. Podem ser classificadas quanto à sua origem química em péptidos, alcalóides, organofosfatos, entre outros, ou quanto ao sistema fisiológico onde exercem os seus efeitos, donde se inclui hepatotoxinas, neurotoxinas, dermatotoxinas e citotoxinas. Contudo, vários outros sistemas de classificação foram propostos, não sendo de todo um assunto consensual entre a comunidade científica (Hiller *et al.*, 2007; Valério *et al.*, 2010).

Até ao momento ainda não se encontram disponíveis nem testes de diagnóstico nem antídotos nos estabelecimentos de saúde para quaisquer cianotoxinas. Apesar deste facto, qualquer caso suspeito de intoxicação deve ser imediatamente comunicado por forma a identificar qual o organismo contaminado (se a causa da intoxicação for por ingestão) e tentar salvar a vida da vítima. Foram já relatados vários casos em que uma rápida intervenção aumenta significativamente a probabilidade de sobrevivência da vítima. O diagnóstico é então baseado na apresentação clínica e no histórico de consumo de determinado ser vivo aquático contaminado nas últimas 24h, enquanto o tratamento é essencialmente de suporte, podendo incluir ventilação artificial (Sobel *and* Painter, 2005).

2.2.1. SAXITOXINA

2.2.1.1. Estrutura química e propriedades

A saxitoxina (STX) consiste numa toxina alcalóide com a fórmula química $C_{10}H_{17}N_7O_4$ e um peso molecular de 299 g/mol (Zhuo *et al.*, 2013). Através da figura 2.2. verifica-se que estruturalmente é composta por um sistema tricíclico de 3,4-propinoperidropurina com dois grupos guanidino (CH_5N_3) que lhe conferem uma elevada polaridade (Wiese *et al.*, 2010). A pH fisiológico o grupo 1,2,3-guanidino é carregado positivamente, ao passo que o grupo 7,8,9-guanidino está parcialmente desprotonado, daí ser uma molécula catiónica (Kellmann *et al.*, 2008).

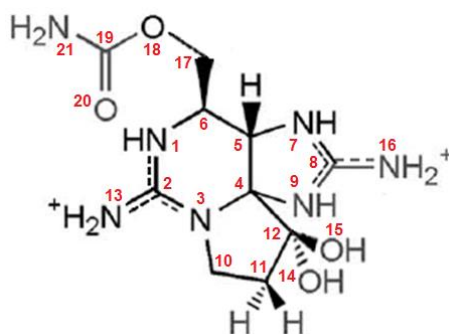


Figura 2.2. Estrutura química da STX.

O nome STX terá sido atribuído em 1957 quando a toxina foi isolada na forma pura pela primeira vez a partir da amêijoia *Saxidomus giganteus* no Alasca. Desde então já cerca de 57 variantes são conhecidas, fazendo parte de um conjunto denominado de toxinas paralisantes através do marisco (PST). A exposição a altas concentrações destas toxinas poderá resultar em intoxicações graves, e até mesmo fatais, denominadas por envenenamento paralisante através do marisco (PSP) ou envenenamento com STX através do peixe-balão (SPFP) (Wiese *et al.*, 2010).

Estas toxinas encontram-se agrupadas em várias classes consoante o grupo funcional ligado ao carbono 17, tais como carbamatos (onde se inclui a STX), decarbamoílos, N-sulfocarbamoílos e desoxicarbamoílos, cada qual com um grau de toxicidade diferente (Halme *et al.*, 2012). Destes grupos, os carbamatos são os que apresentam maior potencial de toxicidade, sendo a STX o composto mais tóxico. Contudo, com um número tão elevado de análogos e com estruturas químicas tão semelhantes, torna-se muitas vezes difícil determinar qual ou quais os compostos responsáveis por causar determinada intoxicação. Importa então relacionar o potencial tóxico de cada análogo com o da STX de forma a determinar a toxicidade cumulativa numa mistura de PST, numa medida que será expressa como equivalentes da STX (STXeq) (Bakke *and* Horsberg, 2010).

As PST são estáveis ao calor, não apresentando indícios de degradação seja por cozedura de alimentos ou por aquecimento. Porém, dada a sua natureza hidrófila, as toxinas podem coar para a água de cozimento que, a ser descartada, diminui o risco de exposição (Campbell *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2009). De entre todas as variantes, a STX é a mais estável em soluções ácidas com valores de pH entre 3 a 4, podendo ser armazenada nessas condições a uma temperatura de 5°C durante anos sem perder o seu potencial tóxico. Além disso, também foi comprovada a sua estabilidade a -35°C (Indrasena *and* Gill, 2000). Já em condições básicas as PST são muito instáveis, oxidando-se facilmente (Alexander *et al.*, 2009).

Como referido anteriormente para as toxinas em geral, a STX constitui, de facto, uma das toxinas utilizadas para a prática do bioterrorismo, de tal modo que se encontra referenciada na Convenção de Armas Químicas (CWC). Este acordo estabelece a proibição do desenvolvimento, da produção, do armazenamento e do uso de armas químicas (Fang *et al.*, 2004; Halme *et al.*, 2012).

2.2.1.2. Distribuição e ocorrência

As PST apresentam uma ampla distribuição em praticamente todos os sistemas aquáticos, uma vez que são produzidas tanto por algumas espécies de cianobactérias em ambientes de água doce como por certos dinoflagelados em ambientes de água marinha (Halme *et al.*, 2012). Apesar destes microrganismos integrarem domínios distintos (*Prokaryota* no caso das cianobactérias e *Eukaryota* relativo aos dinoflagelados), a via de biossíntese das PST é semelhante entre ambos (Cusick *and* Sayler, 2013). Na tabela 8.1. que se encontra em anexo constam as diversas espécies de cianobactérias produtoras das PST até hoje descritas, incluindo a(s) localidade(s) onde foram identificadas (quando relatadas).

2.2.1.3. Impacto na saúde humana

2.2.1.3.1. MECANISMO DE TOXICIDADE

Os primeiros sintomas de intoxicação com a STX surgem logo após alguns minutos quando ingerida por via oral, o que indica uma absorção rápida pela mucosa oral e transporte pela corrente sanguínea para outros órgãos (Alexander *et al.*, 2009). Este mecanismo de ação é mais provável de ocorrer uma vez que, devido à sua alta solubilidade em água, esta toxina apresenta um baixo coeficiente de partição lípido-água, pelo que terá um baixo grau de absorção pelo trato gastrointestinal (Bakke *et al.*, 2010).

A STX é considerada uma neurotoxina, pois exerce os seus efeitos por meio da ligação de alta afinidade com alguns canais iônicos com portão de voltagem das células nervosas e musculares, bloqueando completamente os de sódio (Na^+) e parcialmente os de cálcio (Ca^{2+}), e prolongando o fluxo de íons nos de potássio (K^+), como se pode verificar pela figura 2.3. As relações estequiométricas não são iguais em todos os canais, pois enquanto para cada canal de Na^+ e de Ca^{2+} apenas se liga uma molécula da STX, para cada canal de K^+ são necessárias quatro ou mais moléculas (Cusick *and* Saylor, 2013). A ligação é efetuada entre o grupo 7,8,9-guanidino de carga positiva da STX e o grupo carboxilo carregado negativamente do poro do canal (Pomati *et al.*, 2004).

Esta ação impossibilita a transmissão dos impulsos nervosos, o que conduz a quadros clínicos diferentes consoante a dose de toxina ingerida. Poucos minutos após a exposição, sintomas como parestesia (ou sensação de formigueiro) nos lábios, língua e garganta, chegando a dormência total da face, além de transpiração, vômitos e diarreia são característicos. Nos casos de intoxicação aguda ocorre dormência no pescoço e nas extremidades, assim como ataxia (perda de coordenação motora), podendo o quadro agravar-se para paralisia respiratória e insuficiência cardiovascular com conseqüente morte em situações mais graves (Carneiro *et al.*, 2013; Kellmann *et al.*, 2008; Pearson *et al.*, 2010; van Apeldoorn *et al.*, 2007).

As PST são metabolizadas nos humanos conforme demonstraram vários estudos com base em amostras *post-mortem* de vítimas por intoxicação (García *et al.*, 2010; García *et al.*, 2004; Gessner *et al.*, 1997; Llewellyn *et al.*, 2002). Consoante o análogo considerado, o seu metabolismo poderá resultar em compostos com maior ou menor potencial tóxico. Por exemplo, García *et al.*, 2010, a partir de amostras de tecidos e fluídos corporais de dois pescadores vítimas de PSP nos fiordes da Patagônia, no Chile, constataram que a STX oxidava-se num composto menos tóxico, a neosaxitoxina (neoSTX), ao passo que as variantes goniatoxinas (GTX) 2 e 3

oxidavam-se nas GTX 1 e 4, respetivamente, que são relativamente mais tóxicas. Llewellyn *et al.*, 2002, também verificaram que certas variantes presentes na urina de uma vítima de PSP não se encontravam originalmente no caranguejo contaminado responsável pela intoxicação. Daí que, tendo em conta estas conversões das PST, seja muitas vezes difícil determinar a toxicidade real da amostra, apresentando-se o resultado em STXeq (Humpage *et al.*, 2010). Após metabolizadas, as PST são excretadas essencialmente na urina (Johnson *et al.*, 2009).

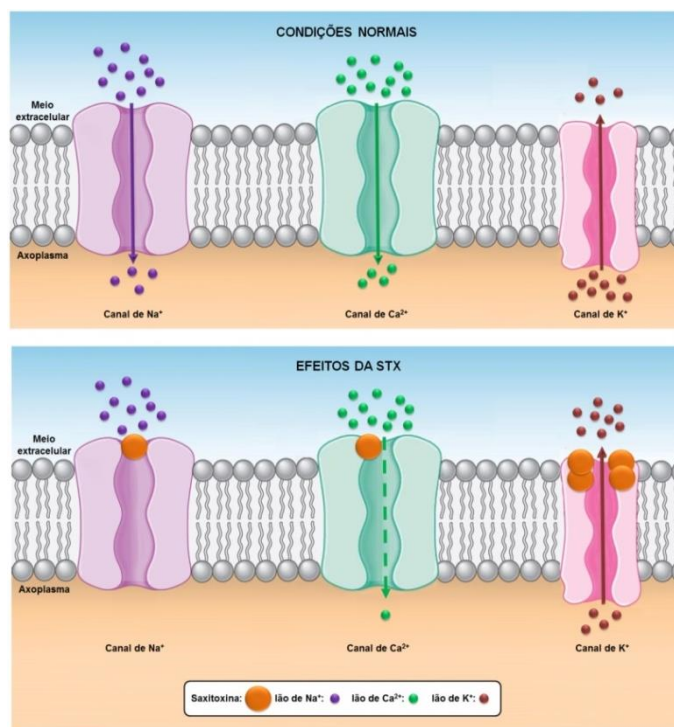


Figura 2.3. Mecanismo de ação da STX (adaptado de Pearson Education, 2014).

2.2.1.3.2. PRINCIPAIS VIAS DE EXPOSIÇÃO

Das vias de exposição possíveis destacam-se a ingestão de organismos ou de água contaminados e o contato direto com a água através da prática de atividades recreativas, como natação, esqui aquático, canoagem, entre outras, na presença de um *bloom* de cianobactérias. Além disso, a STX pode entrar no corpo a partir de feridas abertas (Poniedzialek *et al.*, 2012; Rapala *et al.*, 2005).

Os valores de dose letal 50 (LD₅₀) para a STX variam muito consoante a espécie e a via de administração. Por exemplo, nos ratinhos verificam-se valores de LD₅₀ de 10 µg/kg por injeção intraperitoneal, de 3,4 µg/kg por injeção intravenosa e de 263 µg/kg por via oral (Halme *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2009). Quanto aos peixes, o valor de LD₅₀ varia entre 400 a 1.000 µg de STXeq/kg por via oral, aumentando significativamente quando a injeção da toxina é por via intraperitoneal (Bakke *and*

Horsberg, 2010). Considerando estes valores obtidos pode-se inferir que o potencial de toxicidade da STX difere consoante a via de exposição.

2.2.1.3.3. CASOS CLÍNICOS DE INTOXICAÇÃO

Numerosos casos de intoxicações humanas causadas pelas PST foram relatados um pouco por todo o mundo. Até nos dias de hoje continuam a ser notícia, surgindo cerca de 2.000 casos por ano com uma taxa de mortalidade de 15% (Kellmann *et al.*, 2008), sendo as mulheres grávidas e as crianças os grupos mais vulneráveis (Tian *et al.*, 2014). No entanto, importa referir que todos os relatos de intoxicações humanas ocorreram em ambientes marinhos, não sendo até ao momento conhecidos casos com origem em água doce (Dittmann *et al.*, 2013).

O primeiro caso registado remonta ainda ao século XVIII quando o capitão George Vancouver, navegando no seu veleiro “*Discovery*” numa área que hoje é conhecida por British Columbia, apresentou sintomas característicos de PSP após ter ingerido marisco, acabando por não resistir à doença (Munday *and* Reeve, 2013).

Mais recentemente, em 1977, na Baía de Fundy, Canadá, dois irmãos de 50 e 54 anos, após terem comido mexilhões, tiveram de ser imediatamente transportados para um hospital local devido a queixas de parestesia gradual e rápida, seguido de fraqueza muscular e vómitos. A situação era de tal modo crítica que se teve de recorrer a entubação, ventilação artificial, terapia intravenosa com 0,9% de cloreto de sódio (NaCl) e hemodiálise. Felizmente, a assistência imediata permitiu que os dois homens recuperassem totalmente passados alguns dias. Isto porque análises posteriores das amostras dos mexilhões ingeridos revelaram uma concentração de 43 mg de STX_{eq} por cada 100 g de amostra, um valor bastante elevado considerando que a dose letal por via oral nos humanos varia entre 1 a 4 mg de STX_{eq}. Além disso, o consumo de álcool antes da refeição por parte dos pacientes parece ter contribuído para o agravamento da intoxicação (Acre *and* Gray, 1978).

Em Portugal, os primeiros casos de intoxicação associados às PST surgiram em 1946, na Lagoa de Óbidos, quando seis pessoas morreram após o consumo de bivalves contaminados (Bownik, 2010; Vale *and* Taleb, 2005).

2.2.1.4. Regulamentos

Foi demonstrado que, conforme o género e condição fisiológica de cada indivíduo, uma dose entre 1 a 4 mg de STX_{eq} seria fatal quando administrada oralmente (Kwong *et al.*, 2006). Tendo em conta este potencial de toxicidade da STX e seus análogos, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA)

estabeleceu que a quantidade máxima deste grupo de toxinas num alimento consumido no decurso de um dia ou numa única refeição sem risco apreciável para a saúde humana, definida como dose aguda de referência (ARfD), é de 0,5 µg de STXeq/kg de peso corporal no humano. Além disso, também foi definido que a quantidade máxima das PST em marisco a partir do qual é considerado impróprio para consumo humano (i.e. o nível de quarentena) é de 800 µg de STXeq/kg de marisco (Paredes *et al.*, 2011). Quanto ao consumo aceitável de água potável, estipulou-se uma concentração máxima de 3 µg/L (Fitzgerald *et al.*, 1999).

A partir do gráfico da figura 2.4. pode-se visualizar a correlação entre os limites delineados pela EFSA em função do peso corporal de cada pessoa. Considere-se então um exemplo de um indivíduo adulto com um peso corporal de 60 kg, estabelecido como o valor médio da população. Partindo da ARfD de 0,5 µg de STXeq/kg de peso corporal, significa que qualquer alimento que este indivíduo ingira não deve conter uma quantidade superior de 30 µg de STXeq, sob pena de expor a sua saúde a um sério risco. Ao extrapolar este último valor para o marisco em particular, conclui-se que o indivíduo em questão não pode ingerir mais do que 37,5 g de marisco tendo em conta o nível de quarentena de 800 µg de STXeq/kg de marisco.

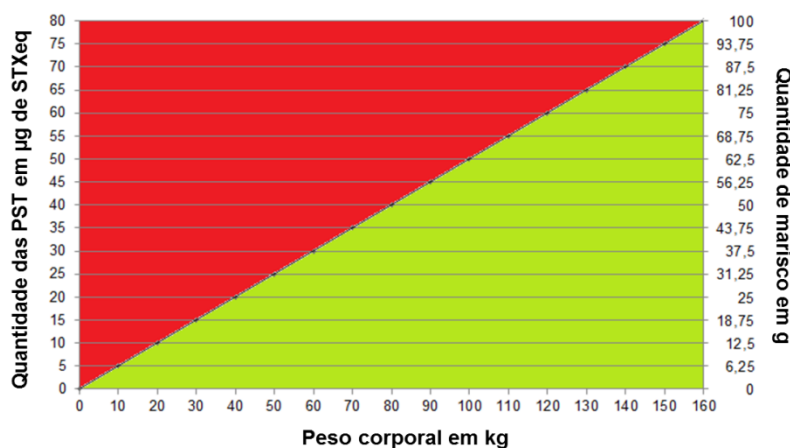


Figura 2.4. Relação entre a quantidade das PST (em µg de STXeq) que um determinado alimento pode conter (ARfD) e a quantidade de marisco (em g) que pode ser consumível tendo em conta o nível de quarentena, ambas em função do peso corporal do ser humano (em kg).

2.2.2. CILINDROSPERMOPSINA

2.2.2.1. Estrutura química e propriedades

A cilindropermopsina (CYN) consiste numa cianotoxina alcalóide com a fórmula química $C_{15}H_{21}N_5O_7S$ e um peso molecular de 415 g/mol. Estruturalmente é composta por um grupo guanidino tricíclico (anéis A, B e C) ligado a um anel de uracilo (anel D) através de uma ponte hidroxilo na posição C-7 (Moreira *et al.*, 2013; Žegura *et*

al., 2011), como se pode constatar pela figura 2.5. Vários estudos sugerem que o grupo de uracilo define a expressão de toxicidade da CYN.

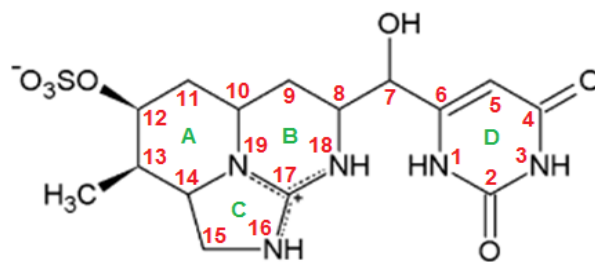


Figura 2.5. Estrutura química da CYN.

O grupo sulfato carregado negativamente ligado ao carbono 12 e o grupo guanidino carregado positivamente atribuem à molécula uma natureza zwitteriônica, o que a torna bastante solúvel em água. Além desta, a CYN possui ainda outras características que lhe conferem um elevado potencial de toxicidade, entre as quais a sua estabilidade (sem indícios de degradação ou inativação) a valores extremos de temperatura e pH quando se encontra em solução, como foi comprovado por Moreira *et al.*, 2013, e Poniedzialek *et al.*, 2012, através de ensaios de ebulição repetida da água e de exposição a variações de pH entre 4 a 10 durante 2 meses. Contudo, em meio de cultura e exposta à radiação solar, ela degrada-se rapidamente (Klitzke and Fastner, 2012; Moreira *et al.*, 2013).

Até ao momento foram apenas caracterizados dois análogos da CYN, a 7-epicilindrospermopsina (epi-CYN), um epímero na ponte hidroxilo ligada ao carbono 7, e a 7-desoxicilindrospermopsina (do-CYN), que carece do átomo de oxigénio ligado ao mesmo carbono (Poniedzialek *et al.*, 2012). Ainda assim, todos estes compostos apresentam graus de toxicidade distintos, sendo a CYN o mais tóxico.

2.2.2.2. Distribuição e ocorrência

A distribuição da CYN em sistemas aquáticos é quase cosmopolita, principalmente em regiões temperadas (Štraser *et al.*, 2013). Um facto que é consistente com a distribuição das espécies de cianobactérias que a produzem (tabela 8.2. em anexo).

Ao contrário de outras cianotoxinas, a CYN existe predominantemente sob a forma extracelular (podendo atingir até 90% do total da CYN). Tal predomínio poderá dever-se a uma maior libertação da cianotoxina por parte das cianobactérias durante o período normal de crescimento e a uma longa persistência aquando dissolvida em água, devido à já referida degradação limitada (Corbel *et al.*, 2014; Wormer *et al.*, 2009).

2.2.2.3. Impacto na saúde humana

2.2.2.3.1. MECANISMO DE TOXICIDADE

Após ser ingerida, a CYN é absorvida no intestino com alguma dificuldade uma vez que, em conformidade com o anteriormente referido para a STX, é hidrossolúvel e, portanto, apresenta um baixo coeficiente de partição lípido-água. De seguida, entra na circulação sistémica e dirige-se aos órgãos-alvo para exercer os seus efeitos tóxicos (Young *et al.*, 2008). Inicialmente considerava-se esta cianotoxina como uma hepatotoxina, afetando as células do fígado, contudo, estudos recentes demonstraram a sua afinidade com outros órgãos, entre os quais baço, coração, estômago, glândulas adrenais, intestinos, pulmões, rins e timo, além dos sistemas vascular e linfático (Falconer *and* Humpage, 2006; Kokociński *et al.*, 2013). Na verdade, um melhor termo para classificar a sua ação no organismo seria a de citotoxina, pois exerce os seus efeitos a nível celular, independentemente do órgão afetado.

Embora o grupo sulfato na posição C-12 não seja necessário para a entrada na célula, como veio a ser comprovado por Runnegar *et al.*, 2002, o caráter hidrófilo da CYN torna-a pouco provável em atravessar a membrana celular. Tendo em consideração a figura 2.6., a difusão, seja ela passiva ou facilitada, através de um poro ou transportador, parece ser o mecanismo de transição mais plausível, dado o pequeno peso molecular da molécula (Kinnear, 2010; Smith *et al.*, 2008).

Uma vez no interior da célula, a toxicidade da CYN ocorre por meio de dois mecanismos, um mais rápido do que o outro, conforme se verifique ou não metabolismo. Na via mais rápida a CYN é bioativada pelo complexo enzimático do citocromo P450 (CYP450), sobretudo através das isoformas CYP1A1 e CYP1A2 (Gutiérrez-Praena *et al.*, 2013; Poniedzialek *et al.*, 2012). Já o método mais lento não envolve metabolismo.

A CYN atua em várias frentes (figura 2.6.). Por um lado ocorre a inibição irreversível da síntese proteica ao nível do ribossoma, durante a etapa de alongamento da cadeia peptídica, e a fragmentação do DNA ao nível do núcleo, podendo induzir mutações e até mesmo cancro. Em ambos os casos o grupo uracilo da CYN liga-se ao grupo adenina tanto do mRNA como do DNA, bloqueando as suas ações. Por outro lado, a síntese da glutathione também é inibida, deixando de haver defesa contra as espécies reativas de oxigénio. Como resultado, o stresse oxidativo aumenta e, por conseguinte, a genotoxicidade (Kokociński *et al.*, 2013; Žegura *et al.*, 2011). Por fim, seja qual for o mecanismo, a CYN é excretada pela urina (Guzmán-Guillén *et al.*, 2013).

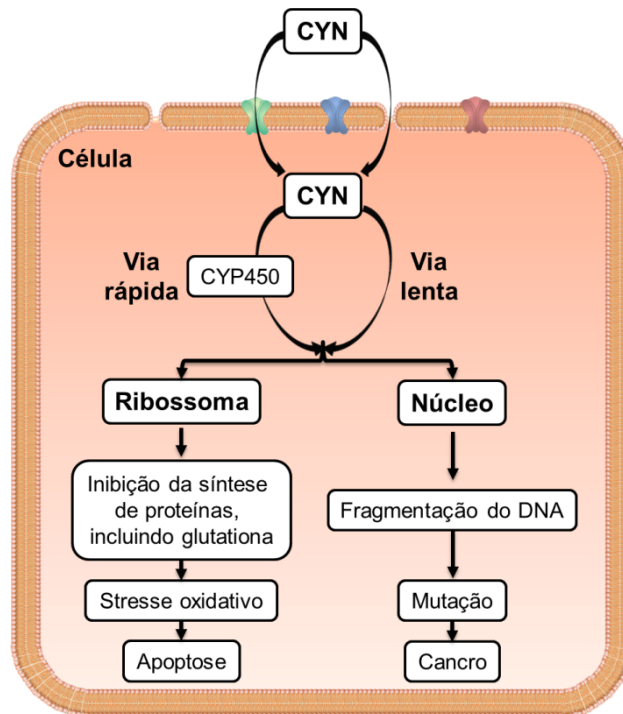


Figura 2.6. Mecanismo de ação da CYN.

Também se sabe que a CYN afeta a distribuição de lípidos, aumenta a concentração plasmática de colesterol e causa desregulação endócrina *in vivo* (Young *et al.*, 2008). Além disso, vários estudos ainda terão de ser realizados para demonstrar a sua eventual capacidade neurotóxica e dermatotóxica (Poniedzialek *et al.*, 2012).

2.2.2.3.2. PRINCIPAIS VIAS DE EXPOSIÇÃO

No que respeita aos seres humanos, tendo em conta que a CYN predomina no meio extracelular, a via oral constitui a principal via de exposição através da ingestão de água contaminada (Guzmán-Guillén *et al.*, 2013). Além desta via, e como acontece com a STX e outras cianotoxinas, o consumo de organismos contaminados e a prática de atividades recreativas também integram a lista de potenciais vias de exposição (Poniedzialek *et al.*, 2012).

A CYN é a variante mais tóxica das três até hoje identificadas, apresentando um valor de LD₅₀ de 2,1 mg/kg (em 24h) e de 0,2 mg/kg (em 72h) por injeção intraperitoneal, e de 6 mg/kg (em 5 dias) por via oral em ratinhos (Gutiérrez-Praena *et al.*, 2013; McGregor *et al.*, 2011). Tal como se verifica com a STX, estes valores distintos de LD₅₀ levam a concluir que o potencial de toxicidade da CYN difere consoante a via de exposição. Relativamente aos peixes, apesar da sua elevada exposição a esta cianotoxina, ainda não existe informação suficiente dos poucos estudos toxicológicos efetuados para o cálculo dos valores de LD₅₀ (Guzmán-Guillén *et al.*, 2013).

2.2.2.3.3. CASOS CLÍNICOS DE INTOXICAÇÃO

Em 1979, em Palm Island, no norte de Queensland, Austrália, um surto de gastroenterite, hepatomegalia e insuficiência renal afetou 138 crianças e 10 adultos. Tal tragédia deveu-se à aplicação de sulfato de cobre, um tipo de algicida popular, nos abastecimentos de água potável dessa região na tentativa de erradicar um *bloom* denso contendo cianobactérias da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Poniedzialek *et al.*, 2012). Como consequência do tratamento ocorreu lise dessas cianobactérias e uma grande quantidade de cianotoxinas foi libertada, expondo as pessoas que estavam na água que acabaram por ser internadas no hospital local com sintomas de mal-estar, vômitos, anorexia, cefaleia e dor abdominal (Bownik, 2010). Felizmente, todos os pacientes recuperaram totalmente num período de 26 dias com tratamento de suporte de desidratação e choque hipovolémico (Kokociński *et al.*, 2013; Merel *et al.*, 2010; Poniedzialek *et al.*, 2012). Só mais tarde, em 1992, é que se veio a confirmar que tal cianotoxina era, de facto, a CYN, atribuindo-se então o nome da espécie original de cianobactéria que a produziu (Štraser *et al.*, 2011).

Outro caso de intoxicação humana causada pela CYN surgiu no centro de diálise em Caruaru, Brasil, em 1996. Neste caso, a interdição de osmose inversa no sistema de filtração conduziu à presença da CYN e de outro grupo de cianotoxinas do género microcistina (MCT) no abastecimento de água potável. Cerca de 76 pacientes ficaram expostos, apresentando de seguida um quadro clínico de insuficiência hepática aguda com sintomas de hepatomegalia, icterícia e diátese hemorrágica que, infelizmente, acabou por ser fatal (Poniedzialek *et al.*, 2012; Žegura *et al.*, 2011).

Apesar de até ao momento ter sido confirmada a toxicidade da CYN em apenas dois casos epidémicos, na verdade, o número de intoxicações humanas pode ser maior. Esta escassez de casos relatados pode dever-se a procedimentos de deteção da CYN complicados ou ao reduzido conhecimento acerca desta cianotoxina (Poniedzialek *et al.*, 2012).

2.2.2.4. Regulamentos

Dado o seu potencial de toxicidade foi definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que até a uma concentração máxima de 1 µg/L da CYN na água potável seria aceitável para o seu consumo (WHO, 1998). Para a estimativa deste valor foi considerado como peso corporal médio de um humano adulto de 60 kg, como valor médio de consumo de água de 2 L por dia e como valor a partir do qual não se observam efeitos adversos de 30 µg da CYN/kg de peso corporal por dia (Moreira *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2008). No entanto, este valor de referência não é consensual

em todos os países, estando estabelecido uma concentração máxima de 0,1 µg/L na Alemanha, 0,3 µg/L na França e 15 µg/L no Brasil (Merel *et al.*, 2013; Poniedzialek *et al.*, 2012).

2.2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE

Um método de análise específico, sensível e robusto revela-se de extrema importância para que o cientista forense possa identificar de forma precisa e inequívoca qual ou quais as cianotoxinas responsáveis pela morte de determinada vítima. Por vezes, consoante a natureza das amostras a analisar, poderá ser necessária uma etapa de extração de modo a limpar a amostra e concentrar a quantidade da cianotoxina disponível.

2.2.3.1. Procedimentos de extração/concentração

As amostras *post-mortem* de tecidos e/ou fluidos corporais que são sujeitas a análise toxicológica podem não apresentar uma quantidade da cianotoxina considerada exata, devido à presença de certos compostos da matriz que interferem nos resultados da análise, conduzindo incorretamente a falsos negativos ou falsos positivos. Daí que uma etapa de extração/concentração seja crucial para limpar e concentrar a amostra, removendo eventuais interferentes (Msagati *et al.*, 2006). Além disso, este passo de purificação também melhora a sensibilidade dos métodos analíticos, permitindo atingir valores mais baixos de limites de deteção (Merel *et al.*, 2013).

Das diversas técnicas de extração implementadas, a extração em fase sólida (SPE) é a mais vulgarmente utilizada. Resumidamente, esta é uma técnica multifásica em que a amostra em solução passa por um dispositivo (cartucho ou disco) contendo um adsorvente próprio, o qual retém as cianotoxinas por adsorção que serão eluídas *a posteriori* com recurso a solventes específicos. A escolha do dispositivo, do adsorvente e dos solventes é fundamental para uma extração eficiente das cianotoxinas (Msagati *et al.*, 2006). O procedimento de SPE será descrito mais detalhadamente no próximo capítulo.

2.2.3.2. Procedimentos de deteção/determinação

Atualmente diversos métodos de deteção são aplicados na análise das cianotoxinas, nomeadamente os métodos químicos, os métodos *in vivo* em animais e os métodos biomoleculares, que incluem os ensaios baseados em recetores, os ensaios imunológicos e os ensaios citotóxicos. Todos diferem nos princípios de

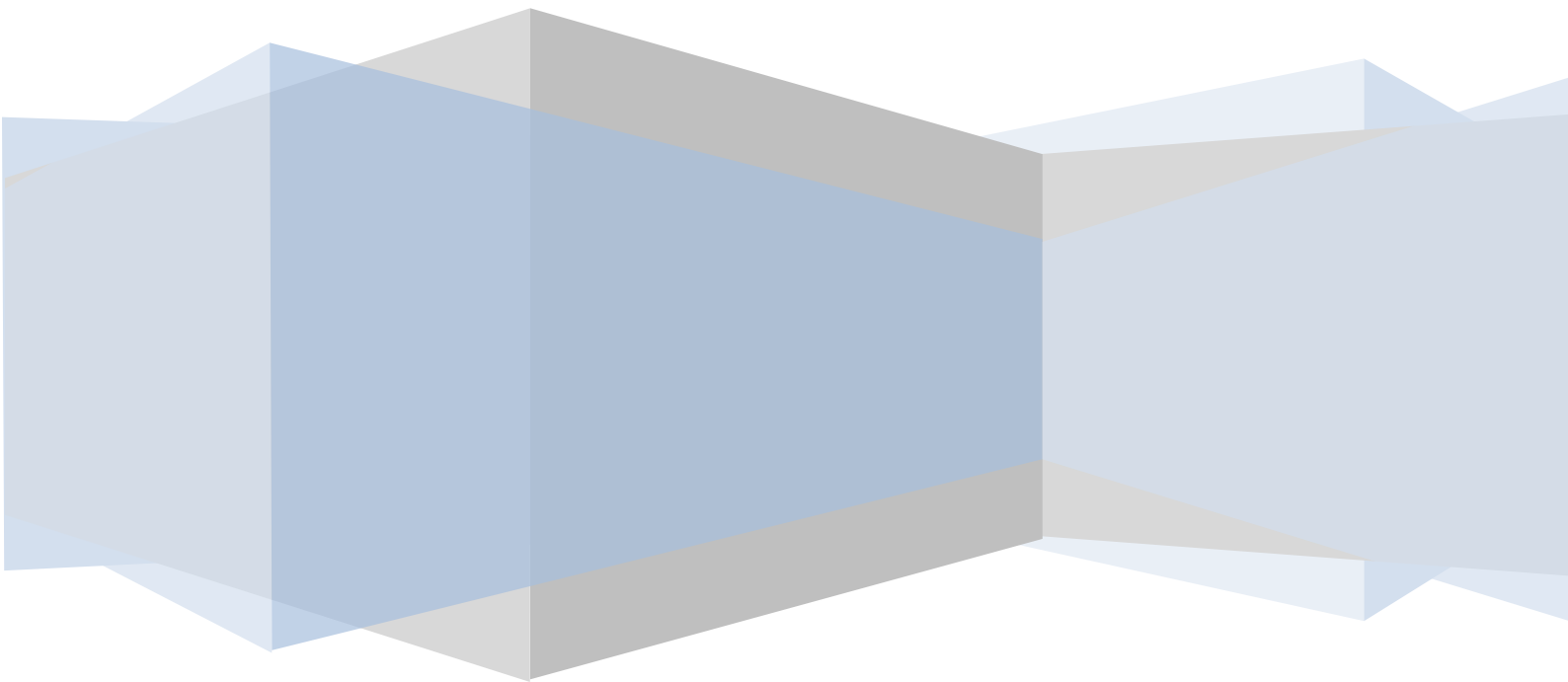
deteção, no tipo de informação fornecida, na seletividade e na sensibilidade, pelo que a seleção da técnica constitui uma etapa crucial em qualquer estudo analítico, consoante o seu objetivo e o tipo de resultados que se pretende obter (Msagati *et al.*, 2006). As vantagens e as desvantagens dos métodos considerados estão descritas na tabela 8.3. presente em anexo.

Considerando os métodos químicos em particular, a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) associada à espectrometria de massa (MS) é dos mais vulgarmente utilizados, pois é bastante específico e sensível, permitindo analisar as cianotoxinas mesmo em níveis residuais (Dell'Aversano *et al.*, 2004), o que acontece muitas vezes nas amostras *post-mortem* que são sujeitas a análise toxicológica. Esta técnica hifenada constitui uma ferramenta poderosa que associa a capacidade separativa da HPLC com as propriedades de identificação, elucidação estrutural e quantificação da MS quando usada como módulo de deteção (Dörr *et al.*, 2008). A HPLC permite a separação dos analitos presentes na amostra consoante a sua afinidade com a fase estacionária contida na coluna cromatográfica relativamente à afinidade com a fase móvel. Quando associada com a MS, os analitos são detetados, resultando em espectros de massa específicos de cada composto, correspondendo como que a uma “impressão digital” do mesmo. No entanto, algumas limitações subjacentes à aplicação dos métodos cromatográficos incluem a necessidade de pessoal qualificado, o custo relativamente mais dispendioso do equipamento e a falta de padrões certificados para algumas variantes das cianotoxinas (Humpage *et al.*, 2010). Não obstante, esta técnica é adequada para compostos polares e não-voláteis, como é o caso da STX e da CYN (Fang *et al.*, 2004). No próximo capítulo este método será descrito em maior pormenor.

Além da MS, outro módulo de deteção associado à HPLC que tem sido amplamente utilizado para a identificação da STX e seus análogos baseia-se na espectroscopia de fluorescência, contudo, requer um passo prévio de derivatização por meio de oxidação. Essa oxidação pode ser pré ou pós-coluna, consoante se as cianotoxinas são oxidadas antes ou após a separação cromatográfica, respetivamente (Alexander *et al.*, 2009). Todavia, existe sempre o risco de que outros compostos fluorescentes possam estar presentes na amostra e interfiram com a identificação da cianotoxina-alvo (Etheridge, 2010). No caso da CYN, o detetor baseado no arranjo de fotodíodos (DAD) é também usado, no qual a molécula apresenta um pico cromatográfico para um comprimento de onda de 262 nm. Embora proporcione uma informação quantitativa do composto, é um método menos específico do que a MS (Guzmán-Guillén *et al.*, 2012).

Capítulo 3

*Extração por SPE e deteção por HPLC/MS –
Estado da arte*



3.1. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A natureza da amostra não permite muitas vezes a sua análise direta nos métodos de detecção devido a eventuais contaminantes presentes na matriz que interferem na identificação do(s) analito(s) de interesse. Além disso, e como acontece na maioria das situações, a concentração destes analitos pode revelar-se tão baixa ao ponto de não serem detetáveis pelo método de análise considerado, conduzindo erradamente a falsos negativos. Uma forma de solucionar estes problemas passa por uma preparação prévia da amostra com a aplicação de técnicas de extração que permitem não só remover os contaminantes contidos na amostra, purificando-a, como também concentrar os analitos de modo a que uma maior quantidade dos mesmos esteja disponível para a análise. Este procedimento permite, assim, diminuir os limites de detecção, melhorando a sensibilidade dos métodos de análise (Almeida *et al.*, 2004).

Das várias técnicas atualmente implementadas na preparação da amostra, a extração em fase sólida (SPE) tem sido a mais vulgarmente utilizada pela sua versatilidade, especificidade e sensibilidade. Este método surgiu pela primeira vez em meados dos anos 70 (Picó *et al.*, 2007) e a sua particularidade advém da utilização de dispositivos com diversas formas que contêm um material de empacotamento sólido designado por adsorvente, o qual permite a retenção dos analitos por meio de adsorção durante a passagem da amostra em solução. Com recurso a um solvente de eluição apropriado, estes analitos podem ser colhidos e analisados pelos métodos de detecção (Almeida *et al.*, 2004; Poole, 2003).

3.1.1. ETAPAS DO MÉTODO DE SPE

Um método típico de SPE envolve quatro etapas fundamentais que se encontram representadas na figura 3.1. Inicialmente o adsorvente contido no dispositivo deve ser condicionado, ou seja, estar recetivo para a interação com a amostra através da aplicação de um ou mais solventes adequados. Esta etapa também permite a remoção de eventuais impurezas contidas no adsorvente e do ar presente no dispositivo (Nováková *and* Vlčková, 2009).

Segue-se a percolação de um volume variável de amostra para que os analitos sejam retidos/concentrados no adsorvente. Nesta fase é importante regular a taxa de fluxo a um nível que proporcione uma retenção eficiente dos analitos e ao mesmo tempo não seja demorosa, podendo variar entre 0,5 a 5 mL/min. O valor de pH da amostra tem enorme influência na eficiência de retenção, dependendo do tipo de adsorvente considerado. Entre estas duas primeiras etapas o adsorvente deve estar

sempre húmido sob o risco de ocorrer uma fraca retenção dos analitos, resultando *a posteriori* em baixas recuperações.

A terceira etapa baseia-se na lavagem do adsorvente com recurso a um solvente com baixa força de eluição. Este passo, embora opcional, permite eliminar alguns compostos indesejáveis da matriz que ficam retidos no material sólido sem remover os analitos de interesse. Quando se processam amostras aquosas poderá seguir-se um período de secagem para retirar vestígios de água do adsorvente, os quais interferem na concentração e consequente análise dos analitos.

Por fim, na última etapa do método de SPE ocorre a eluição dos analitos de interesse com um solvente apropriado, cujo volume deve ser menor do que o volume de amostra inicial para uma concentração significativa dos mesmos. O poder de eluição do solvente varia consoante o grau de retenção dos analitos no adsorvente, sendo necessário um poder de eluição maior quando a retenção é mais forte. Tal como na etapa da percolação da amostra, um ajuste adequado da taxa de fluxo e um valor de pH apropriado do solvente de eluição são essenciais para uma recuperação eficiente dos analitos (Almeida *et al.*, 2004; Camel, 2003; Lucci *et al.*, 2012).

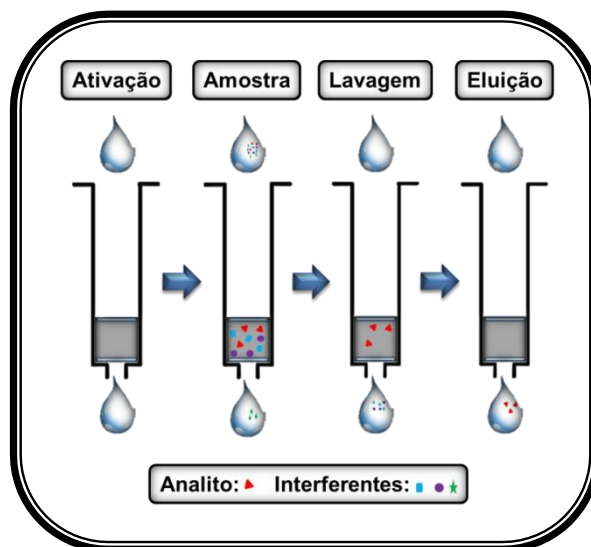


Figura 3.1. Principais etapas envolvidas na técnica de SPE (adaptado de Lucci *et al.*, 2012).

Este método de extração descrito baseia-se num procedimento manual, no qual a aplicação tanto dos solventes como da amostra no dispositivo pode ser efetuada com recurso à gravidade ou aspiração por vácuo, consoante a natureza dos solventes utilizados e do adsorvente. No entanto, já é possível automatizar esta técnica associando-a *on-line* com as técnicas analíticas, nomeadamente a cromatografia líquida. Uma metodologia que é ainda mais vantajosa no que respeita à redução a nível do consumo e exposição a solventes e da duração experimental. Além

do mais, o pouco manuseamento da amostra permite diminuir o risco de contaminação tanto para o operador como para o meio de trabalho envolvente (Camel, 2003).

3.1.2. TIPOS DE ADSORVENTE E SUAS INTERAÇÕES

Tendo em conta o tipo e volume de amostra, assim como as características do(s) analito(s) que se pretende(m) analisar, a escolha do formato do dispositivo e do material de empacotamento mais adequados revela-se de extrema importância para que se obtenham recuperações eficientes e reprodutíveis. Existem disponíveis comercialmente uma vasta gama de adsorventes com diferentes grupos funcionais, empacotados em variadas formas de dispositivos de SPE, incluindo cartuchos e discos. Toda esta variedade traduz-se na elevada seletividade da técnica de SPE, uma vez que contribui para o processamento de uma gama muito diversificada de amostras (Camel, 2003; Poole, 2003).

O formato em cartucho (figura 3.1.) tem sido o dispositivo mais frequentemente utilizado. Apresenta a forma de uma coluna feita à base de polipropileno ou polietileno que termina numa ponta de Luer macho. Este tipo de material suporta uma quantidade de volume relativamente reduzida (entre 1 a 25 mL) e é descartável, o que previne o risco de contaminação cruzada. Possui um adsorvente sólido no seu interior, empacotado entre duas secções de polipropileno ou de vidro com 20 µm de espessura, com o peso a variar entre 50 mg a 10 g. O princípio de funcionalidade nos discos é semelhante ao do cartucho, diferindo apenas na sua capacidade de suportar maior volume de amostra (Camel, 2003).

Os adsorventes podem ser classificados consoante o tipo de material em que são fabricados, quer sejam à base de sílica, à base de carbono grafitizado, poliméricos e de troca iónica. Os adsorventes baseados em sílica, com grupos funcionais como octadecilo (C18), octacilo (C8), cianopropilo (CN), entre outros, são caracterizados pela sua estabilidade do ponto de vista mecânico, térmico e químico sob variadas condições, sendo limitados ao nível do pH, onde apenas são estáveis numa gama estreita. Já nos adsorventes de carbono grafitizado a situação inverte-se, sendo estáveis em todo o intervalo de pH, para além de apresentarem áreas de superfície elevadas que proporcionam uma maior retenção dos analitos. Existe, contudo, a possibilidade de uma retenção irreversível e estão associados a uma fraca estabilidade mecânica. Os adsorventes poliméricos, contendo grupos funcionais como o poliestireno-divenilbenzeno (PS-DVB), podem ser aplicados a uma gama mais larga de polaridade dos solutos. Quanto aos adsorventes de troca iónica, apresentam uma retenção baseada na interação iónica entre os grupos funcionais do adsorvente de

uma determinada carga com os grupos funcionais do(s) analito(s) de interesse de carga oposta. Para que tal interação ocorra é necessário que o pH da matriz da amostra seja estritamente regulado de modo a que esses grupos funcionais estejam na forma ionizada. O oposto deste mecanismo também é fundamental particularmente na etapa de eluição do método de SPE. Neste caso, o pH é regulado para neutralizar os grupos funcionais do analito, do adsorvente ou de ambos, fazendo com que a interação iônica seja quebrada e, por conseguinte, permita que a eluição ocorra (Camel, 2003; Fontanals *et al.*, 2007; Poole, 2003).

No que respeita ao modo como retêm os analitos, estes adsorventes podem ser agrupados em fase normal, fase reversa ou de troca iônica, e a estrutura química dos seus grupos funcionais determina o mecanismo de interação entre ambos, que deve ser da mesma natureza. Portanto, para a retenção de analitos polares é aconselhável a utilização de materiais sólidos de fase normal contendo grupos funcionais polares à base de sílica quimicamente modificada, como CN, que estabelecem interações do tipo hidrofílico incluindo dipolos permanentes e pontes de hidrogênio. Para reter analitos menos polares são necessários adsorventes de fase reversa com grupos hidrofóbicos, de que são exemplos os grupos C18 e C8 e os poliméricos, que interagem por meio de forças van der Waals (Almeida *et al.*, 2004). Já os adsorventes de troca iônica são úteis para a retenção de analitos com grupos carregados, seja de forma positiva (catiônicos) ou negativa (aniônicos), através de atrações eletrostáticas (Fontanals *et al.*, 2007).

Apesar do disposto acima, uma ligeira modificação na composição química dos grupos funcionais presentes nos adsorventes permite alterar não só a sua área de superfície como também o mecanismo de interação com os analitos, desde que essa alteração induzida mantenha o material estável. Isto realça o poder específico da técnica de SPE e pode, em certos casos, proporcionar percentagens de recuperação mais elevadas (Fontanals *et al.*, 2007).

3.2. SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

3.2.1. PRINCÍPIO E EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Em 1906, o botânico russo Mikhail Tswett criou uma técnica que permitia separar os pigmentos fotossintéticos de extratos de plantas através de uma coluna de adsorção líquida, verificando várias bandas de cores diferentes separadas. Este processo veio a designar-se mais tarde por cromatografia (do grego “*chrom*” que significa cor e “*graphie*” correspondente a grafia), cujo princípio de separação se baseia no equilíbrio de concentrações dos componentes de uma mistura (amostra) e

nas interações que estabelecem entre duas fases imiscíveis, uma móvel e outra estacionária. Atualmente a grande variedade de fases móveis e de fases estacionárias permite múltiplas combinações entre ambas, o que torna a cromatografia numa técnica bastante versátil e de vasta aplicação (Degani *et al.*, 1998; Scott, 2003).

A fase móvel permite a deslocação da amostra ao longo da fase estacionária que se encontra fixa. Quanto maior for a afinidade dos analitos que integram a amostra com a fase estacionária relativamente à fase móvel, maior será o período de tempo do percurso até atingirem o detetor, uma vez que ficam mais tempo retidos nessa fase (Harris, 2005). Este período, designado por tempo de retenção, pode ser visualizado através de um cromatograma, o qual consiste num diagrama que revela a resposta do detetor em função do tempo de análise. A resposta é representada por um ou mais picos cromatográficos, conforme a complexidade da amostra, que possuem geralmente a forma de uma curva gaussiana e cuja área permite determinar a concentração dos analitos eluídos numa relação diretamente proporcional (Meyer, 2004). O cálculo da área é feito através da integração dos picos por *software*, podendo ser em modo automático ou manual, recorrendo-se a este último para casos de picos parcialmente resolvidos (Nováková, 2013).

Uma boa separação cromatográfica ocorre quando os picos estão bem definidos e separados uns dos outros com uma resolução aceitável, permitindo a identificação inequívoca e a quantificação dos analitos. Pode acontecer, por vezes, que os analitos não sejam separados completamente e eluam com tempos de retenção muito próximos. Isto resulta na sobreposição dos picos, o que indica uma fraca resolução do sistema cromatográfico e impossibilita a quantificação correta dos analitos (Meyer, 2004; Rouessac *and* Rouessac, 2007).

3.2.2. SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO

Atualmente a técnica cromatográfica pode ser classificada de diversas formas consoante o critério usado. Assim, quanto ao tipo de suporte da fase estacionária a cromatografia pode ser planar ou em coluna. Considerando o modo de separação dos analitos presentes na amostra, o qual depende da sua interação com ambas as fases envolvidas, as separações cromatográficas podem ser efetuadas por adsorção, partição, troca iónica, exclusão molecular, afinidade ou mistura destes mecanismos. Por fim, a nível do estado físico da fase móvel pode-se distinguir a cromatografia como líquida (LC), gasosa (GC) ou de fluido supercrítico (SFC), caso a fase móvel seja um líquido, um gás ou um fluido supercrítico, respetivamente (Harris, 2005; Scott, 2003). A LC ainda pode ser subdividida em cromatografia líquida gravitacional (GLC), onde a

fase móvel é movida por ação da força gravítica, e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), na qual a eluição da fase móvel é auxiliada com recurso a uma bomba de alta pressão e permite separar analitos de peso molecular bastante reduzido (Degani *et al.*, 1998; Rouessac *and* Rouessac, 2007).

Relativamente a este último critério de classificação, a escolha adequada do tipo de cromatografia é determinada pela natureza dos analitos. Enquanto em GC apenas se analisam compostos voláteis, termicamente estáveis e/ou com baixo peso molecular, requerendo para outro tipo de compostos um demorado passo de derivatização na preparação da amostra, em LC não é necessário executar esse passo, permitindo a análise de uma gama mais ampla de analitos, incluindo não-voláteis, termolábeis e/ou com elevado peso molecular (Wu *and* French, 2013). Admitindo as características das duas cianotoxinas mencionadas no capítulo anterior, para o presente estudo optou-se pela HPLC como método analítico.

Um sistema típico de HPLC é composto por várias unidades que podem estar interligadas por meio de módulos (figura 3.2.).

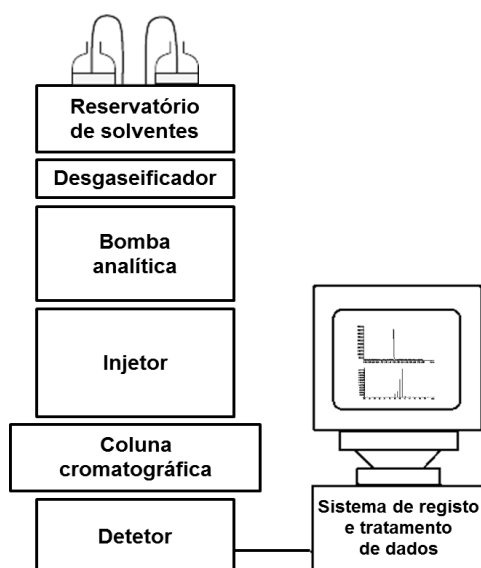


Figura 3.2. Esquema de um equipamento de HPLC modular (adaptado de Degani *et al.*, 1998, e Rouessac *and* Rouessac, 2007).

Destas unidades importa destacar o reservatório de solventes que constituem a fase móvel; o desgaseificador para remover bolhas de gás eventualmente presentes nos solventes ou mistura de solventes; a bomba analítica que retira os solventes do reservatório em direção à coluna a uma taxa de fluxo constante; o injetor que injeta um volume fixo e estipulado de amostra a uma taxa de fluxo também constante; a coluna cromatográfica que separa os analitos que integram a amostra, podendo a separação ser feita à temperatura ambiente ou, na presença de um termostato, a uma

temperatura regulada; o detetor que assinala os analitos que eluem da coluna; e o sistema de processamento de dados que permite registar o sinal obtido através de um desvio em relação à linha de base, tanto maior quanto mais elevada for a massa de analito injetado (Rouessac *and* Rouessac, 2007).

3.2.3. PROPRIEDADES DAS FASES E DAS COLUNAS

Para qualquer método analítico, o conhecimento das particularidades, a escolha criteriosa e o tratamento correto e rigoroso tanto das fases móvel e estacionária como das colunas cromatográficas são fundamentais para uma boa eficiência do método aplicado, permitindo a obtenção de resultados credíveis e válidos para o cumprimento dos objetivos propostos.

3.2.3.1. Fase móvel

No caso particular da HPLC, a fase móvel é constituída por um único solvente ou por uma mistura de solventes aquosos e orgânicos, sendo destes o metanol (MeOH) e o acetonitrilo (ACN) os mais utilizados, cujo grau de pureza deve ser elevado sob o risco de degradar a fase estacionária e alterar o sinal obtido no detetor (Harris, 2005; Meyer, 2004). A sua escolha deve ser a mais adequada possível de modo a conduzir a uma boa resolução dos analitos (Msagati *et al.*, 2006). Além disso, independentemente da escolha efetuada, quando se analisam analitos com grupos funcionais ionizáveis é fundamental que os solventes contenham uma pequena quantidade de tampão, por exemplo ácido fórmico/ião formiato, ácido acético/ião acetato, entre outros, para regular o nível de pH e auxiliar no processo de ionização desses analitos quando entram no detetor, o qual merecerá destaque mais adiante. Relativamente aos compostos neutros já não é necessário adicionar-se tampão. É também aconselhável uma renovação regular dos solventes, sobretudo os aquosos, de modo a prevenir o crescimento microbiano (Vogesser *and* Seger, 2008).

Por forma a também não comprometer a integridade da fase estacionária, um dos primeiros passos a realizar antes das análises cromatográficas passa pela remoção de eventuais bolhas de gás que estejam presentes nos solventes. Neste sentido, é importante a sonicação dos solventes com o auxílio de ultrassons e, já no sistema de HPLC, a aplicação de purga com hélio ou com recurso a um desgaseificador. Além disso, a distribuição do(s) solvente(s) é feita através de um tubo com um diâmetro interno muito pequeno, cuja extremidade em contato com os solventes apresenta um filtro que permite reter partículas em suspensão que possam ocasionalmente existir (Harris, 2005; Rouessac *and* Rouessac, 2007).

A eluição da fase móvel pode ser realizada tanto em modo isocrático, em que as condições cromatográficas se mantêm constantes durante o tempo de análise, ou em gradiente, quando num ou mais períodos de tempo estabelecidos se modificam as proporções dos solventes utilizados. Este último modo permite, por exemplo, minimizar a retenção de compostos que advieram da última injeção e, por conseguinte, prevenir que estes interfiram na análise seguinte (Van Eeckhaut *et al.*, 2009).

3.2.3.2. Coluna cromatográfica e fase estacionária

As colunas analíticas são constituídas geralmente por aço inoxidável cujo comprimento varia entre 50 a 300 mm e o diâmetro interno entre 1 a 5 mm. Internamente encontram-se revestidas pela fase estacionária e por um material inerte, como o vidro. Quando utilizadas com muita frequência ao longo do tempo, as colunas podem ser degradadas por substâncias presentes nas matrizes mais complexas e/ou nos solventes de eluição e comprometer a precisão e reprodutibilidade das análises. De modo a prevenir esta situação e prolongar o seu tempo de vida, as colunas podem ser protegidas com pré-colunas, as quais apresentam o mesmo tipo de fase estacionária e retêm as eventuais impurezas, para além de serem menos dispendiosas, podendo ser substituídas regularmente (Harris, 2005; Rouessac *and* Rouessac, 2007).

Outro parâmetro a ter em conta para um desempenho mais eficiente da coluna é a temperatura, que pode ser regulada pelo termostato. Um aumento da temperatura provoca a diminuição da viscosidade dos solventes de eluição que passam na coluna, o que se traduz numa menor pressão e em tempos de retenção mais curtos dos analitos sem interferir na resolução dos picos cromatográficos correspondentes. No entanto, temperaturas muito altas (superiores a 45°C) podem acelerar a degradação da fase estacionária e, por conseguinte, reduzir o tempo de vida da coluna, resultando nas mesmas consequências mencionadas *a priori*. Neste sentido, colunas ligeiramente aquecidas a uma temperatura constante entre 25 a 30°C são recomendadas (Rouessac *and* Rouessac, 2007).

As fases estacionárias constituem matrizes sólidas que estão empacotadas no interior das colunas cromatográficas entre dois discos porosos, cada um numa extremidade (Harris, 2005). Existe uma grande variedade deste tipo de fases, sendo as partículas porosas as mais usuais para HPLC, nomeadamente as baseadas em sílica, devido ao seu tamanho bastante reduzido (valores tipo entre 3 a 5 µm). Esta característica confere uma elevada estabilidade mecânica e térmica, uma maior permeabilidade da coluna e resistência a altas pressões que se verificam em HPLC,

resultando em separações cromatográficas mais eficientes. Contudo, as fases estacionárias baseadas em sílica apenas são estáveis a uma gama restrita de pH (entre 1 a 8) (Meyer, 2004).

Na figura 3.3. encontra-se representada a estrutura química da sílica, sendo constituída por átomos de silício (Si) ligados a átomos de oxigênio (O) através de pontes tridimensionais. A sua estrutura é bastante heterogênea, apresentando vários grupos funcionais com propriedades distintas:

- Silanóis livres: grupos ligeiramente ácidos, onde os compostos básicos vão adsorver preferencialmente;
- Siloxanos: resultantes da condensação de silanóis associados;
- Silanóis geminais: grupos não ácidos;
- Silanóis associados: grupos também não ácidos, onde os compostos com grupos hidroxilo (OH) tendem a adsorver;
- Silanóis próximos de cátions metálicos (Me^+): grupos fortemente ácidos que podem afetar de forma grave a separação de compostos básicos.

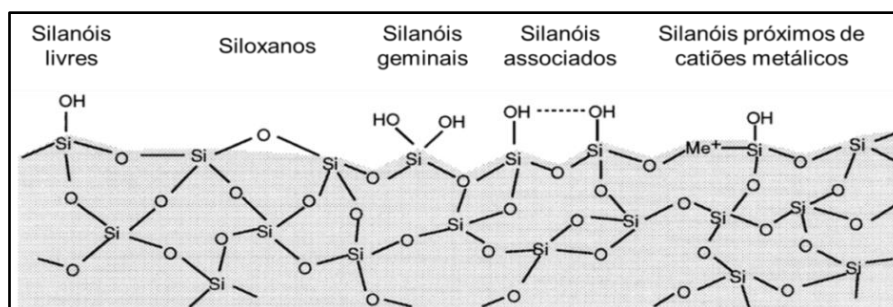


Figura 3.3. Estrutura química da sílica (adaptado de Meyer, 2004).

Além disso, estes grupos funcionais à base de sílica podem ser modificados quimicamente de modo a alterar as suas propriedades e, por conseguinte, aumentar a especificidade da fase estacionária. Destes grupos destacam-se os C18, que são bastante apolares, permitindo trabalhar em cromatografia de fase reversa (RP). Neste tipo de cromatografia usa-se uma fase estacionária apolar ou fracamente polar, enquanto na cromatografia de fase normal (NP) a fase estacionária é mais polar que a fase móvel (Meyer, 2004; Rouessac *and* Rouessac, 2007).

3.3. DETEÇÃO POR ESPETROMETRIA DE MASSA

Vários detetores analíticos foram desenvolvidos para identificarem e quantificarem os analitos presentes na amostra de acordo com as suas propriedades óticas e químicas (Meyer, 2004). Para este estudo será utilizado o detetor por espectrometria de massa (MS), o qual permite caracterizar a estrutura atômica e

molecular de variados analitos desde orgânicos, inorgânicos e biológicos, proporcionando dados tanto qualitativos como quantitativos. A constante evolução ao longo dos anos tornou esta técnica mais sensível e versátil, tendo uma ampla aplicação em diversas áreas, incluindo a toxicologia forense (Harris, 2005; Rouessac *and* Rouessac, 2007). Um sistema típico de MS é composto por três módulos, nomeadamente a fonte de ionização que trabalha a pressão atmosférica, o analisador de massas e o detetor, ambos funcionando a alto vácuo (figura 3.4.). Cada módulo será descrito de seguida.

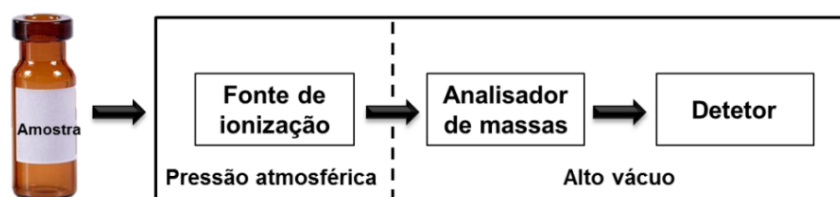


Figura 3.4. Espectrômetro de massa típico composto por três módulos.

3.3.1. FONTES DE IONIZAÇÃO: *ELECTROSPRAY*

Um requisito para a análise por MS é que a amostra seja convertida em fase gasosa e posteriormente ionizada através de técnicas de ionização à pressão atmosférica (API). Estes processos, descritos pela primeira vez em 1958 por Knewstubb e Sugden (Marquet *and* Lachâtre, 1999), constituem elos de ligação entre os sistemas de cromatografia e de MS na medida em que preparam os analitos oriundos do cromatógrafo para a sua posterior análise pelo espectrômetro. O processo de API mais adequado é determinado pelo tipo de analito presente na amostra. Assim, para analitos menos polares e com baixo peso molecular é recomendado o uso de ionização química à pressão atmosférica (APCI), enquanto para analitos mais polares e com pesos moleculares maiores recorre-se à ionização por *electrospray* (ESI) (Cech *and* Enke, 2001). Será dado maior foco a esta última técnica que se encontra representada esquematicamente na figura 3.5. para a polaridade positiva.

A técnica de ESI é rápida, sensível e exata e todo o processo ocorre numa câmara de evaporação à pressão atmosférica. Após sair do cromatógrafo, a amostra em solução é bombeada através de uma agulha de *electrospray* a uma taxa de fluxo constante e baixa, geralmente entre 0,1 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nessa agulha é aplicada uma alta voltagem que tanto pode ser positiva como negativa consoante a estrutura química dos analitos em estudo e o seu modo de fragmentação mais favorável. A voltagem aplicada gera um campo elétrico na superfície da solução através da atribuição de carga aos analitos (originando iões), fazendo com que a solução saia da agulha numa forma conhecida como “cone de Taylor”. Além disso, o campo elétrico

favorece a evaporação do solvente contido na solução, o que aumenta a densidade de carga e, por conseguinte, a tensão na sua superfície. A tensão torna-se tão elevada que ocorre fissão em gotículas (em modo de *spray*) através das forças de repulsão de Coulomb e estas, por sua vez, dividem-se em gotículas cada vez mais pequenas num processo contínuo até à formação de iões individuais em fase gasosa que se dirigem para o analisador de massas. Ao momento em que a repulsão de Coulomb da carga de superfície iguala a tensão superficial da solução dá-se o nome de limite de Rayleigh. Se necessário, este processo pode ser assistido pneumaticamente através da utilização de um gás neutro que favoreça a formação de gotículas (Cech *and* Enke, 2001; Marquet *and* Lachâtre, 1999).

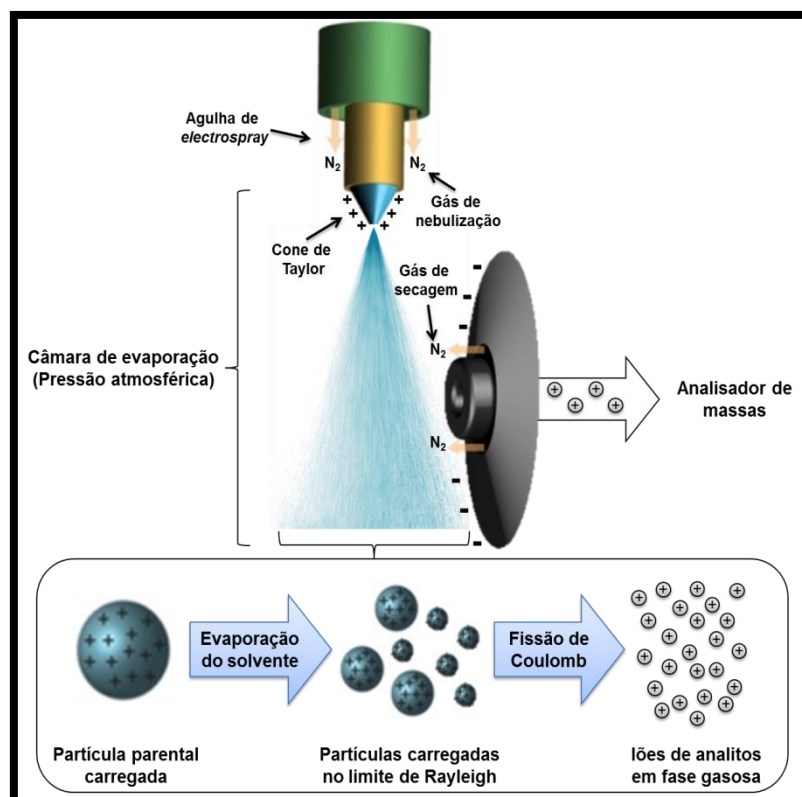


Figura 3.5. Esquema de todo o processo de ionização em modo positivo por *electrospray* (adaptado de *Lamond Laboratory*, 2014).

Para além de iões, outras espécies de compostos podem ser formadas durante a técnica de ESI, nomeadamente moléculas neutras (sem carga) e aductos. Em particular, os aductos resultam da ligação entre os analitos e certos iões oriundos de várias fontes, seja dos tampões utilizados na separação cromatográfica, dos solventes que constituem a solução da amostra e/ou da matriz da amostra, num processo dependente da polaridade com que a ESI esteja a funcionar. Assim, na ionização em modo negativo formam-se aductos com iões de carga negativa (aniões), sendo os iões cloreto (Cl⁻) os mais frequentes. Já em modo positivo verificam-se aductos de analitos

ligados a iões carregados positivamente (catiões) como sódio (Na^+), potássio (K^+), lítio (Li^+), amónio (NH_4^+), entre outros (Cech *and* Enke, 2001).

Quanto ao tipo de polaridade, a análise por ionização em modo positivo apresenta maior interferência a nível de ruído no espetro de massa em relação à análise por modo negativo, uma vez que na natureza a grande maioria das moléculas tem maior suscetibilidade de fragmentar no primeiro modo do que no segundo, incluindo eventuais contaminantes presentes nas fontes mencionadas anteriormente. Logo, o modo negativo revela-se mais específico do que o modo positivo (Nováková, 2013).

Existem situações em que a análise por ESI pode não ser adequada ao ponto de resultar numa baixa resposta no detetor. Isto acontece sobretudo com analitos que sejam instáveis, que possuam uma eficiência baixa de ionização, que tenham dificuldade em fragmentar-se ou cuja identidade não seja conhecida, sendo este último caso bastante frequente no contexto forense. Assim, uma etapa prévia de derivatização desses analitos torna-se essencial a fim de melhorar a sua resposta, a qual pode passar pela introdução de grupos funcionais que sejam facilmente carregáveis (Cech *and* Enke, 2001; van den Ouweland *and* Kema, 2012).

3.3.2. ANALISADORES DE MASSAS

Os analisadores de massas são módulos bastante sofisticados onde os analitos ionizados são separados, e possivelmente fragmentados, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), conforme o tipo de análise e os objetivos do estudo. Os iões resultantes dirigem-se, por fim, ao detetor numa trajetória controlada pelo analisador por meio de campos elétricos e magnéticos (Rouessac *and* Rouessac, 2007). Estão atualmente disponíveis vários analisadores para a MS, merecendo maior destaque a armadilha de iões e o triplo quadrupolo que serão utilizados neste estudo.

3.3.2.1. Armadilha de iões

A armadilha de iões (em inglês "*Ion Trap*" (IT), como é mais vulgarmente conhecida) caracteriza-se por um analisador de massa versátil e sensível que, tal como o próprio nome indica, aprisiona a corrente gasosa de iões oriundos da fonte de ionização durante um certo período de tempo. Hoje em dia estão disponíveis comercialmente dois tipos de configuração da IT, a forma linear e a forma quadrupolar, merecendo esta última maior foco para o presente estudo.

A IT quadrupolo, representada esquematicamente na figura 3.6., consiste em três eletrodos com geometria hiperboloidal, dois dos quais estão dispostos

simetricamente (elétrodos extremos) e assemelham-se a pequenos discos invertidos, enquanto o terceiro eletrodo em forma de anel passa por entre os outros dois (eletrodo central). Um dos eletrodos extremos apresenta uma única abertura central de onde surgem os iões a partir da fonte de ionização, ao passo que o outro eletrodo contém várias aberturas dispostas também no centro através das quais os iões seguem caminho para o detetor (March, 1997).

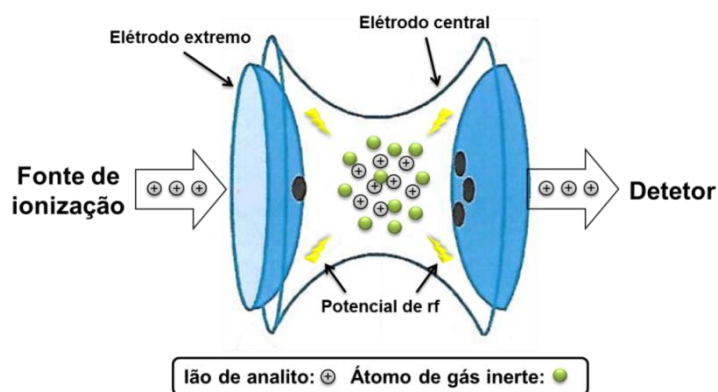


Figura 3.6. Esquema estrutural da *Ion Trap* e o seu princípio de ação (adaptado de *Bruker Daltonics*, 2006).

Os compostos, após ionizados, entram na IT e colidem com os átomos de um gás inerte, normalmente o hélio (He). Estas colisões resultam na perda da energia cinética dos iões, levando ao seu “arrefecimento” e conseqüente aprisionamento no centro da IT. De salientar que, mesmo com baixa energia cinética, os iões permanecem em movimento devido às forças de repulsão de Coulomb que afastam os iões com a mesma carga (Kaplan *et al.*, 2008). Pode-se pensar neste fenómeno de aprisionamento numa perspetiva de um “poço”, em que os iões estão armadilhados numa cavidade e só com recurso a um potencial de radiofrequência (rf) aplicado ao eletrodo central é que se libertam dessa cavidade, sendo excitados e ejetados em direção ao detetor. O valor do potencial de rf aplicado e o tamanho do ião variam de forma proporcional na medida em que um aumento gradual da amplitude deste potencial implica a ejeção de iões com razão m/z cada vez maior. A saída dos iões por ordem crescente de razão m/z ao longo do tempo é detetada por meio de sinais que indicam a sua intensidade ou abundância relativa por meio de um gráfico, designado por espectro de massa (March, 1997), o qual é característico de cada analito, como se de uma “impressão digital” se tratasse.

Equipamentos com a configuração de IT permitem obter dados do(s) analito(s) de interesse através de dois tipos de análises, os quais conferem elevada sensibilidade e especificidade. A análise em modo *full scan* permite, a partir de um intervalo amplo de valores m/z estipulado *a priori*, obter o sinal do ião-molecular do

analito-alvo com um peso molecular conhecido. A intensidade do sinal pode aumentar através da otimização de vários parâmetros do sistema ótico da IT, melhorando assim a sensibilidade da resposta ao analito em questão (Liu *et al.*, 2002).

Identificado o analito, é possível então definir a sua estrutura química através de uma outra análise conhecida como espectrometria de massa em tandem (MS^n , em que “n” indica o número de fases de fragmentação), na qual os iões são fragmentados no interior do poço uma ou várias vezes através de dissociação induzida por colisão (CID) com os já mencionados átomos de gás inerte. Tendo em conta o esquema da figura 3.7., após a acumulação dos iões no centro da IT (passo 1), é possível isolar o analito de interesse quando se seleciona o valor m/z correspondente, eliminando-se os restantes iões com diferentes valores m/z (passo 2); esta seria a fase MS^1 . Na fase MS^2 este composto isolado, designado como ião-parental, é excitado (passo 3) e fragmentado (passo 4) em vários iões-filho com valores m/z específicos, mantendo-se concentrados no centro da IT (passo 5). A partir daqui pode-se isolar um dos fragmentos do ião-parental e fragmentá-lo novamente, originando outros iões-filho, numa fase equivalente a MS^3 . O processo poderia continuar mais algumas vezes. Por fim, os iões-filho são ejetados (passo 6) pela aplicação do potencial de rf e dirigem-se ao detetor.

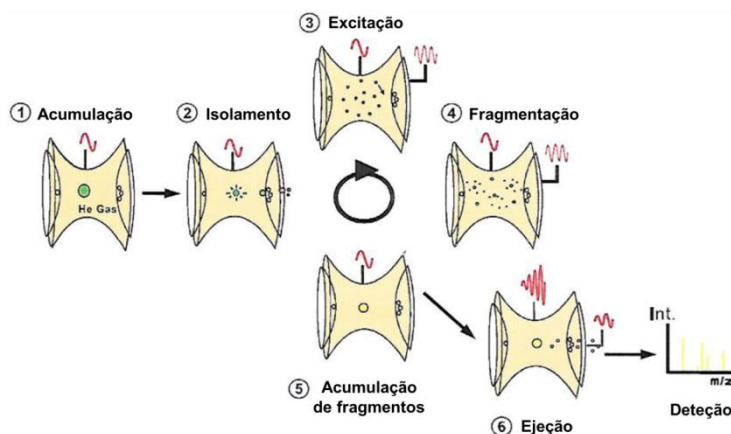


Figura 3.7. Princípio de fragmentação na *Ion Trap* (adaptado de *Bruker Daltonics*, 2006).

Esta capacidade de MS^n é útil para análises qualitativas, permitindo elucidar a estrutura química dos compostos, assim como as vias de fragmentação mais prováveis (Ingendoh *et al.*, 1997; March, 1997). Existe, contudo, uma desvantagem na execução deste processo. Em cada fase de fragmentação não se observam iões-filho até 20-30% da massa do ião-parental, pois não são aprisionados de forma eficiente. Logo, no sentido de cobrir toda massa dos fragmentos do analito de interesse, várias etapas de MS^n terão de ser realizadas necessariamente (Ingendoh *et al.*, 1997).

3.3.2.2. Triplo Quadrupolo

Um triplo quadrupolo (TQ) (figura 3.8.) é composto por três módulos em série, dos quais dois (Q1 e Q3) apresentam um conjunto de quatro barras magnéticas (daí a designação de quadrupolo) dispostas no espaço pelo seu eixo longitudinal sob a forma de um quadrado, separados por uma câmara de colisão (Q2). Neste tipo de analisador é comum efetuarem-se dois tipos de análises: monitorização de um ião selecionado (SIM ou SIR) e monitorização de uma reação selecionada (SRM) ou múltipla (MRM) (Nováková, 2013).

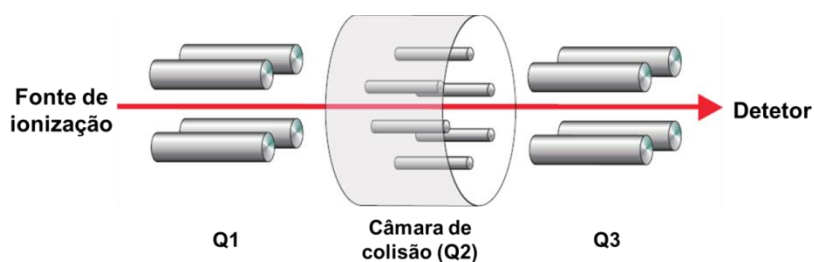


Figura 3.8. Esquema estrutural do triplo quadrupolo (adaptado de *Waters Corporation*, 2002).

No modo SIM pretende-se que o equipamento, dentre vários iões formados, selecione e identifique apenas um ião em particular com um determinado valor de m/z previamente estipulado, obtendo-se somente um sinal relativo a esse ião. No modo MRM um ião com um determinado valor m/z , designado como ião-precursor, é selecionado no módulo Q1, fragmentado na câmara de colisão através da colisão (CID) com moléculas de gás inerte e um ou mais dos fragmentos produzidos são selecionados no módulo Q3 consoante o seu valor m/z . A este processo de seleção de um ião-precursor com um dos seus fragmentos característicos designa-se por transição, e a monitorização de várias transições torna o método analítico mais específico (van den Ouweland *and* Kema, 2012). Estas análises dependem dos pesos moleculares dos iões em estudo e da configuração de certos parâmetros, como energia de colisão e tempo de permanência de iões (Seger, 2012), e conferem uma elevada especificidade analítica. Daí que o TQ seja bastante utilizado em análises quantitativas de matrizes complexas contendo quantidades vestigiais de analitos. Também é possível executar estas análises na IT, residindo a diferença no modo como os iões são separados (enquanto na IT a separação ocorre no tempo, no TQ a separação é feita no espaço) (Nováková, 2013).

Ao contrário da IT, o TQ não permite efetuar várias etapas de fragmentação. Em vez disso, para se poder detetar e identificar as estruturas dos analitos seriam necessárias várias corridas em que a informação de uma seria usada para definir a seguinte, para além de que o espectro de massa obtido revela sinais de certos iões

fragmentados que não correspondem aos de primeira geração. Assim sendo, o TQ não é adequado para a investigação de vias de fragmentação para a elucidação estrutural de um determinado analito (Liu *et al.*, 2002).

3.3.3. DETETORES

Na última fase da análise por MS, o detetor, como o próprio nome indica, deteta os iões positivos ou negativos separados pelo analisador. São conhecidos vários detetores, sendo o mais comumente utilizado, inclusive neste estudo, o multiplicador de eletrões representado esquematicamente na figura 3.9. Antes de entrarem neste detetor, os iões oriundos do analisador são acelerados e chocam com dois elétrodos designados por dínodos de conversão, onde são convertidos em eletrões. De seguida, estes eletrões entram numa estrutura afunilada que constitui um dínodo contínuo e colidem com a parede interna inúmeras vezes, o que resulta na sua amplificação num efeito de cascata. Este processo cria uma corrente elétrica proporcional à abundância dos iões, originando um sinal que é traduzido num espetro de massa (de Hoffmann *and* Stroobant, 2007).

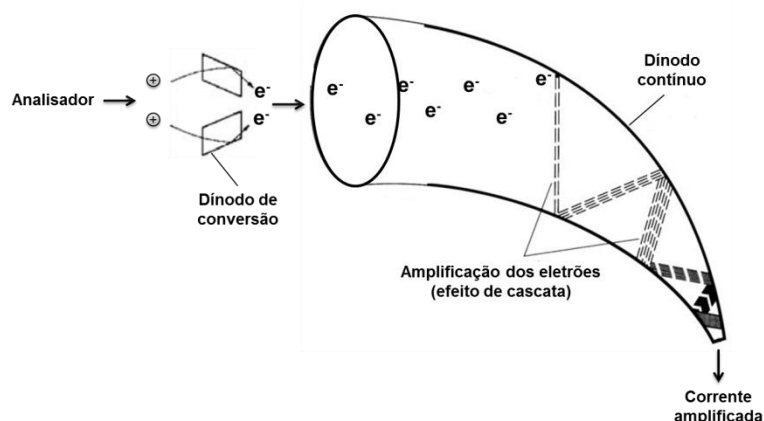


Figura 3.9. Esquema de um detetor multiplicador de eletrões (adaptado de de Hoffmann *and* Stroobant, 2007).

3.4. HPLC HIFENADA A MS: UM CASAMENTO (QUASE) PERFEITO

A identificação da substância responsável por determinada intoxicação constitui um dos principais desafios que os toxicologistas forenses enfrentam dia-a-dia, mesmo quando não existem pistas ou provas que orientem na investigação do caso. Além disso, o volume de amostras disponibilizado, sendo o sangue e a urina as mais frequentes, é geralmente baixo e a substância em causa pode estar presente nessas amostras em concentrações vestigiais. Tendo em conta o nível de sensibilidade e de

especificidade que as técnicas cromatográficas e espectrométricas conferem, a sua associação pode revelar uma preciosa ajuda para estes cientistas na resolução deste tipo de problemas (Marquet *and* Lachâtre, 1999).

De facto, um grande avanço surgiu com o acoplamento de GC com MS na década de 60 (Maurer, 2006), a qual permitia a identificação e quantificação de certos grupos de compostos, como pesticidas, drogas de abuso, fármacos, entre outros, e manteve-se como o método “padrão” ou “clássico” durante vários anos. No entanto, e como já referido anteriormente, apenas pode analisar uma gama restrita de substâncias, desde que sejam voláteis, termicamente estáveis e tenham baixo peso molecular, sendo necessário para outros compostos uma etapa prévia de derivatização na preparação da amostra, a qual se tornava demorosa e perdia especificidade. Este dilema foi então ultrapassado com a hifenação da HPLC com a MS no final dos anos 80 por Fenn (Seger, 2012), uma técnica quase perfeita, pois é muito específica, flexível, robusta e, ao contrário de GC/MS, não está limitada pela volatilidade e peso molecular dos compostos, podendo analisar uma gama mais ampla de forma viável (Wu *and* French, 2013). Neste caso particular, a HPLC/MS tem provado ser uma técnica analítica poderosa na análise das cianotoxinas, mesmo em níveis residuais (Dell'Aversano *et al.*, 2004). Em contrapartida, diz-se quase perfeita devido aos custos elevados tanto na aquisição como na manutenção deste sistema, ao tempo de vida estimado de cerca de dez anos e à necessidade de pessoal especializado para o seu manuseamento (Vogeser *and* Seger, 2008).

As amostras de cariz biológico constituem uma grande adversidade na análise tanto qualitativa como quantitativa durante a aplicação de um método cromatográfico em HPLC/MS. Para além da sua elevada complexidade, os variados compostos que integram a matriz, incluindo sais, fosfolípidos e proteínas, podem co-eluir com o(s) analito(s) de interesse, o que resulta na presença de picos sobrepostos no cromatograma e na interferência do processo de ionização no espectrómetro de massa, suprimindo ou amplificando o sinal obtido no espectro (Nováková, 2013). Estes efeitos da matriz, descritos por Kebarle e Tang pela primeira vez em 1993, alteram claramente a resposta de um determinado composto quando comparada com a de uma solução padrão, comprometendo significativamente a exatidão do método e conduzindo, no pior dos casos, a falsos negativos ou falsos positivos (Peters, 2011). Deste modo, uma preparação prévia da amostra (por exemplo, através de SPE) antes de ser sujeita a análise torna-se necessária para minimizar os efeitos e, assim, não comprometer significativamente a integridade do método analítico. Além disso, outras medidas também podem ser adotadas com o intuito de diminuir, ou até mesmo eliminar, os efeitos da matriz. A injeção de volumes menores de amostra e/ou a sua

diluição (desde que tal não influencie a sensibilidade do sistema analítico), a otimização de parâmetros cromatográficos e espectrométricos, a aplicação de taxas de fluxo mais reduzidas e o uso de um padrão interno constituem alguns exemplos (Van Eeckhaut *et al.*, 2009).

3.5. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO

Os cientistas forenses têm sempre a tarefa árdua de explicar com o mínimo detalhe todos os métodos utilizados para a resolução de um determinado caso, fundamentando a sua escolha e dando conclusões imparciais que podem ter influência direta no destino de um ou mais indivíduos envolvidos nesse caso. Por isso, é de extrema importância que tais métodos aplicados em laboratórios forenses assegurem um elevado nível de confiabilidade e atendam aos critérios rigorosos de garantia e de controlo de qualidade estabelecidos pelos programas de validação, de forma a atribuir qualidade e credibilidade a um resultado (Núñez *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2006). Apesar de ser um processo demoroso, a validação assegura que determinado método seja apropriado para os fins a que se propõe e que o resultado obtido se adeque às necessidades da problemática em estudo e seja aceite pela comunidade. Caso contrário, e parafraseando J. Mark Green, “a consequência de não fazê-lo é, com certeza, um desperdício de tempo, dinheiro e recursos” (Chasin *et al.*, 1998).

Existem diversas entidades reguladoras, incluindo a Conferência Internacional sobre a Harmonização (ICH), a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a Organização Internacional de Normalização (ISO), entre outras, e em Portugal a Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE) e o Instituto Português da Qualidade (IPQ) que estabeleceram protocolos onde definem normas de validação consoante o tipo de análise e os objetivos a cumprir, pelo que é importante especificar qual o protocolo a ser seguido (Nováková, 2013; Ribani *et al.*, 2004).

Considerando em particular o método analítico, qualquer etapa envolvida na colheita e preparação de amostras, separação cromatográfica, ionização e deteção por MS deve ser verificada e otimizada através da validação de diversos parâmetros, fazendo-se de seguida referência a apenas alguns que serão aplicados no presente estudo.

3.5.1. LINEARIDADE

Para quantificar os analitos-alvo presentes numa amostra recorrem-se a curvas de calibração baseadas em modelos matemáticos que estabelecem uma relação

diretamente proporcional entre a resposta do equipamento (a nível de área do pico cromatográfico) e a concentração desses analitos dentro de um determinado intervalo dinâmico de aplicação (Ribani *et al.*, 2004). Para cada analito em estudo deve-se elaborar uma curva de calibração correspondente através da análise de pelo menos seis soluções com concentrações conhecidas do mesmo (designadas como padrões de calibração) adicionadas, ou não, na matriz a partir da qual será aplicado o método analítico, e também da amostra branco. Estas concentrações devem ser estabelecidas num intervalo desde o limite de quantificação até 120% da concentração máxima que se pretende analisar (Cassiano *et al.*, 2009).

Para a construção da curva existem alguns métodos de padronização que podem ser selecionados (padronização externa, interna ou por adição de padrão) consoante o tipo de análise e de tratamento da amostra. Seja qual for o método escolhido, este deve conferir uma elevada precisão e exatidão. Para o presente estudo opta-se pelo método de padronização externa, dado que as amostras não necessitam de um pré-tratamento extensivo. Neste caso, os padrões de calibração são preparados com concentrações conhecidas do analito de interesse num solvente idêntico ao do extrato. Seguidamente as amostras e os padrões são analisados e as áreas dos picos cromatográficos obtidos são comparadas (Cassiano *et al.*, 2009).

Obtidas as curvas de calibração, devem-se então criar modelos de regressão linear através de um conjunto de pontos que apresentem uma tendência regular e que podem ser representados graficamente por uma função matemática ajustada por um processo conhecido como método dos mínimos quadrados. Assim sendo, a variação da área do pico cromatográfico (variável dependente y) em função da concentração do analito (variável independente x) pode ser expressa pela equação $y = m \cdot x + b$, em que m corresponde ao declive ou coeficiente angular da reta e b a ordenada na origem (ponto de interseção com o eixo y). Pela função, para cada valor de x pode-se estimar um valor de y (y_{est}), cada qual, segundo o método dos mínimos quadrados, deve ser calculado de modo a que a sua diferença com o conjunto de dados experimentais (y_i) seja o mínimo possível, através da equação $SQr = \sum (y_i - y_{est})^2$, onde SQr equivale à soma dos quadrados dos níveis residuais obtidos entre os dados experimentais e os valores estimados. É possível ainda determinar o coeficiente de determinação (r^2), i.e. o nível de erro em relação aos sinais obtidos no detetor de cada analito de interesse e a qualidade de ajuste da equação à respetiva curva. Para que uma linearidade tenha qualidade, estima-se que o valor de r^2 seja no mínimo 0,995 (RELACRE, 2013). No entanto, este valor é apenas indicativo, estando dependente dos critérios internos do laboratório assim como do próprio método analítico (Cassiano *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

3.5.2. ESPECIFICIDADE

A especificidade baseia-se na resposta que um determinado método analítico confere a um analito de interesse quando em conjunto com outras substâncias que integram a amostra, sejam estas derivadas da matriz (podendo ocorrer os chamados efeitos de matriz já referenciados) ou de outra fonte. A otimização deste parâmetro é de extrema importância, tanto a nível do método como do equipamento, pois assegura que o pico cromatográfico obtido seja exclusivo desse analito e que a sua quantificação não seja influenciada por essas substâncias, para além de não comprometer outros parâmetros, como a linearidade, a precisão e a exatidão (Cassiano *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

Segundo Cassiano *et al.*, 2009, a avaliação da especificidade é feita através da análise de seis amostras branco (sem o analito de interesse) da mesma matriz de diferentes origens. Eventuais picos cromatográficos obtidos de interferentes não devem coincidir com o tempo de retenção da substância em estudo; caso contrário, os mesmos não devem ser maiores que 20% do limite de quantificação.

3.5.3. PRECISÃO

Tanto a precisão como a exatidão (que se falará mais adiante) são parâmetros fundamentais no processo de validação na medida em que revelam o nível de confiabilidade e de qualidade de um determinado método analítico. A precisão caracteriza-se pela medição de erros aleatórios efetuados entre várias análises repetidas e independentes de uma mesma amostra, representando a dispersão dos resultados obtidos. Esta dispersão pode ser expressa pelo desvio-padrão absoluto (s), o qual é determinado pela seguinte fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

em que x_i corresponde ao valor da área do pico cromatográfico individual de uma análise, \bar{x} à média aritmética de todas as análises e n ao número de análises efetuadas. Além disso, a precisão também pode ser expressa pelo desvio-padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), através da expressão:

$$RSD \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Para um método analítico ser preciso, os resultados obtidos de todas as análises devem ser próximos entre si, considerando-se um valor aceitável de RSD entre 1 a 2% quando se lidam com amostras com elevado teor de analito, ou até 20% no caso de quantidades vestigiais. De qualquer modo, este valor pode ser melhorado aumentando o número de replicados (Cassiano *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

Existem três formas de avaliar a precisão do método, entre as quais se destacam a repetibilidade (precisão intra-dia), a precisão intermediária (precisão inter-dias) e a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). Para o presente estudo importa considerar a repetibilidade, a qual define a concordância entre os resultados de várias análises sucessivas efetuadas num curto período de tempo e sempre nas mesmas condições, ou seja, o mesmo método, o mesmo operador, o mesmo equipamento sem alteração de quaisquer parâmetros e no mesmo laboratório (Cassiano *et al.*, 2009). Este tipo de precisão envolve várias medições de várias soluções preparadas da mesma forma a partir de uma única amostra, o que difere da precisão instrumental, que avalia as medições de injeções repetitivas de uma única solução (Ribani *et al.*, 2004).

3.5.4. EXATIDÃO

A exatidão associa-se a erros sistemáticos, ao contrário da precisão, e define o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método analítico e o valor esperado, referido como verdadeiro. Este parâmetro é determinado pela seguinte expressão:

$$Exatidão (\%) = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100$$

onde x_i é o valor de concentração individual obtida de uma análise e x o valor de concentração esperada. Importa realçar que a exatidão é obtida por meio de aproximação de resultados uma vez que, dada a impossibilidade de se trabalhar com amostras certificadas do analito na matriz-alvo, as amostras padrão obtêm-se através da adição desse analito na amostra branco (Cassiano *et al.*, 2009; Chasin *et al.*, 1998).

3.5.5. LIMITES DE DETEÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) são expressos pela menor concentração de um determinado analito-alvo presente numa amostra que é possível ser detetada e quantificada, respetivamente, e podem ser associados tanto ao instrumento como ao método.

O LD a nível instrumental pode ser definido por dois processos distintos: um a partir dos dados do cromatograma, correspondente à concentração de um dado analito que produza um sinal superior a três vezes à amplitude do ruído da linha de base; e outro a partir da equação da reta de regressão linear obtida pelas curvas de calibração, determinado pela razão entre três vezes o desvio-padrão absoluto dos níveis residuais (S_y) do sinal produzido pelo analito e o declive (m) da reta. Já o LD do método é definido pelo sinal produzido pela menor concentração do analito em amostras fortificadas quando submetido a todo o processo analítico, tendo em consideração o LD instrumental, a percentagem de recuperação e o fator de concentração (Cassiano *et al.*, 2009; Chasin *et al.*, 1998).

O LQ, seja instrumental ou do método, é determinado segundo os mesmos critérios que o LD, diferindo somente na razão entre o sinal produzido pelo analito-alvo e o ruído, que deve ser superior a dez vezes com valores de precisão e exatidão aceitáveis (Ribani *et al.*, 2004).

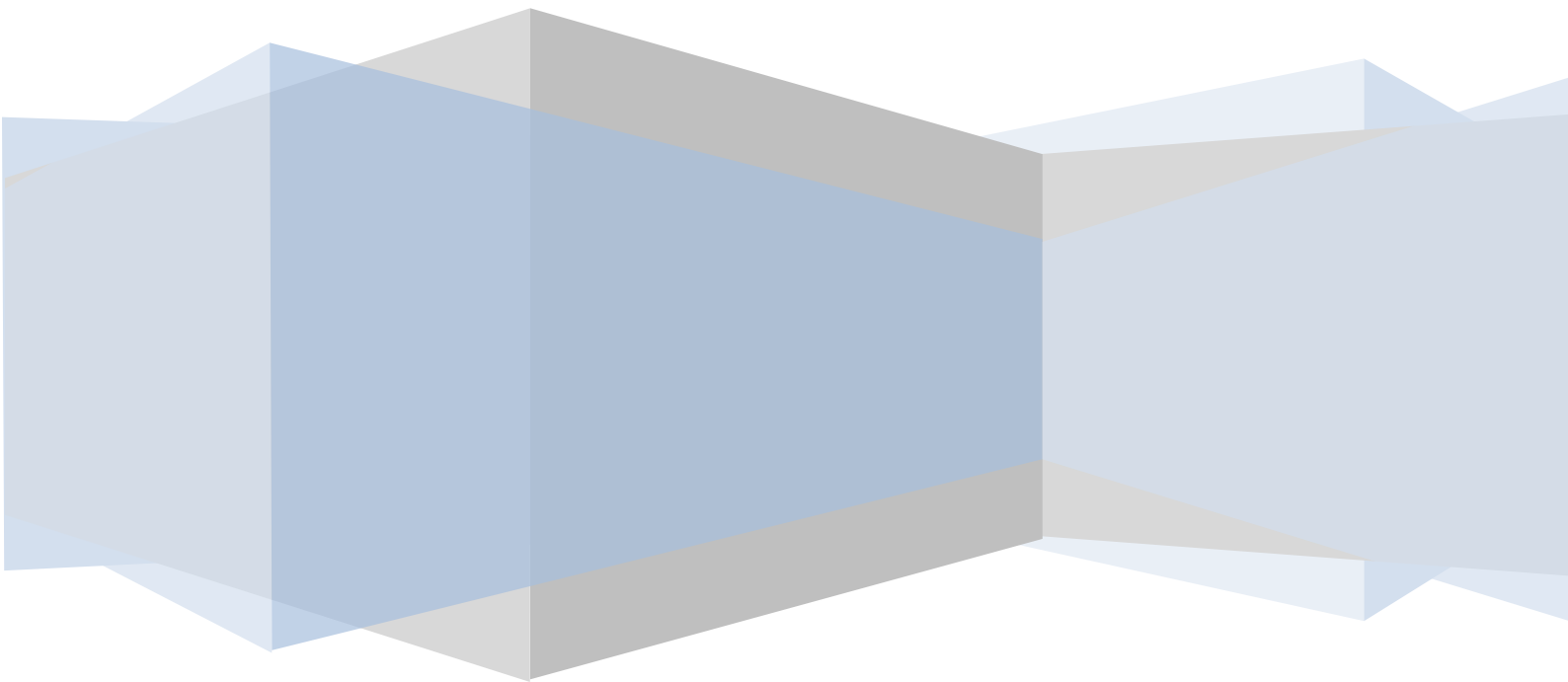
3.5.6. RECUPERAÇÃO (EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO)

Como já foi descrito, os componentes que integram a matriz interferem muitas vezes na identificação do(s) analito(s) de interesse, podendo suprimir ou amplificar o sinal obtido no detetor. Portanto, um passo prévio de preparação de amostra torna-se necessário recorrendo-se, por exemplo, à aplicação de técnicas de extração como a SPE. De modo a avaliar a eficiência da extração, relacionando a quantidade de analito que se obtém antes e após o tratamento da amostra, utiliza-se o parâmetro da recuperação. Este valor, expresso em percentagem, é determinado pela razão entre a resposta (área do pico cromatográfico) obtida para o analito adicionado na matriz e extraído e a resposta obtida para a solução padrão utilizada para a fortificação das amostras, a qual corresponde a 100% (Cassiano *et al.*, 2009).

Além disso, qualquer procedimento de extração está sujeito a erros por precisão, pelo que a cada valor obtido da percentagem de recuperação deve-se associar a variação relativa. Esta é calculada através da realização de pelo menos cinco ensaios paralelos de forma a determinar a repetibilidade do método, expressa pelo RSD ou CV. Pretende-se que as percentagens de recuperação sejam superiores a 70% e que os respetivos valores de RSD sejam inferiores a 10% para uma boa eficiência e precisão do método (Ribani *et al.*, 2004). Apesar destas percentagens estipuladas serem desejáveis, é também essencial que a recuperação seja consistente e reprodutiva (Cassiano *et al.*, 2009).

Capítulo 4

Materiais e métodos utilizados



4.1. MATERIAIS

Dos diversos materiais utilizados para a realização do trabalho experimental destacam-se essencialmente os cartuchos para as metodologias de SPE, as colunas cromatográficas para a separação das cianotoxinas, os solventes aquosos e orgânicos tanto para as extrações referidas como para a constituição da fase móvel em HPLC/MS, as soluções necessárias para o ajuste do pH e no processo de ionização na fonte e os padrões certificados das cianotoxinas em estudo para a preparação de novas soluções padrão de trabalho, assim como para a fortificação das amostras.

4.1.1. CARTUCHOS

Os cartuchos *Bond Elut Carbon* (6 mL/500 mg) e *Bond Elut Env* (3 mL/200 mg) foram adquiridos a partir da *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, EUA), os cartuchos *Chromabond C18* (3 mL/200 mg) e *Chromabond Easy* (3 mL/200 mg) a partir da *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* (Düren, Alemanha) e os cartuchos *GracePure C18-Aq* (3 mL/500 mg) a partir da *Grace-Alltech* (Columbia, EUA). Um exemplar de cada cartucho encontra-se representado na figura 4.1.

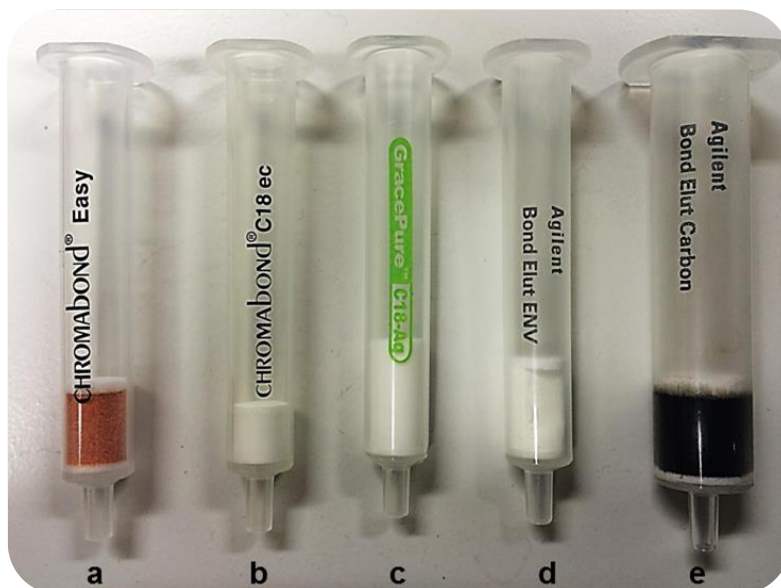


Figura 4.1. Cartuchos utilizados para os métodos de SPE. (a) *Chromabond Easy* (3 mL/200 mg); (b) *Chromabond C18* (3 mL/200 mg); (c) *GracePure C18-Aq* (3 mL/500 mg); (d) *Bond Elut Env* (3 mL/200 mg); (e) *Bond Elut Carbon* (6 mL/500 mg).

4.1.2. COLUNA CROMATOGRÁFICA

Neste projeto utilizou-se a coluna *GraceSmart Reverse Phase (RP)-18* (figura 4.2.) adquirida a partir da *Grace-Alltech* (Columbia, EUA), com um comprimento de 150 mm, um diâmetro interno de 2,1 mm e um diâmetro de partícula de 3 µm.

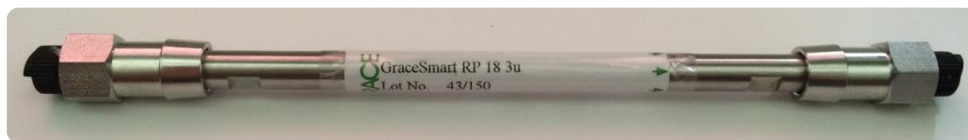


Figura 4.2. Coluna *GraceSmart* RP-18 (150 × 2,1 mm; 3 µm) utilizada em HPLC/MS para efeitos de separação cromatográfica.

4.1.3. SOLVENTES

No trabalho experimental foi utilizada água desionizada purificada por um sistema *Millipore Simplicity™* 185. O metanol (MeOH) e o acetonitrilo (ACN), tanto *gradient grade* como *isocratic grade LiChrosolv®* para LC, foram adquiridos a partir da *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemanha). O diclorometano (DCM) *Chromasolv®* foi adquirido a partir da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EUA) e o ácido clorídrico (HCl) a 37% a partir da *Pronalab*, José M. Vaz Pereira, S.A. (Lisboa, Portugal). O ácido fórmico (CH₂O₂, pureza ~98%) e o acetato de amónio (C₂H₇NO₂, pureza >99,0%) foram adquiridos a partir da *Fluka Analytical*, *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EUA). O ácido acético (CH₃COOH, *puriss. p.a.*) foi adquirido a partir da *Fluka-Garantie*.

4.1.4. PADRÕES CERTIFICADOS

Dois padrões certificados da CYN foram adquiridos a partir da *Potencial Zero – Instrumentação Científica, Lda.* (Lisboa, Portugal), ambos com uma concentração de 10 µg/mL em MeOH (1 mL) e uma pureza superior a 95% HPLC. Dos padrões certificados da STX, um deles foi adquirido também à *Potencial Zero*, apresentando uma concentração de 10 µg/mL em 3 mM HCl etanólico (1 mL) e uma pureza superior a 95% HPLC, e o outro a partir da *National Research Council Canada* (Ontário, Canadá), apresentando uma concentração de 66,3 µM em 3 mM HCl aquoso e filtrado (0,5 mL). Os padrões certificados das três variantes das microcistinas (MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR), cada um com uma concentração de 10 µg/mL em MeOH (1 mL) e uma pureza superior a 95% HPLC, foram adquiridos a partir da *Cyano Biotech GmbH* (Berlim, Alemanha).

4.2. EQUIPAMENTOS DE HPLC/MS

Para a identificação e quantificação das cianotoxinas em estudo foram utilizados dois equipamentos de HPLC/MS distintos, que podem ser visualizados na figura 4.3. Na imagem **a** encontra-se um sistema de HPLC da *Waters Alliance 2695* associada a um detetor da *Quattro micro API*, com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e um analisador triplo quadrupolo, sediado no Centro Interdisciplinar de

Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) no Porto. O *software* *MassLynx* 4.1 foi utilizado para o registo e tratamento dos cromatogramas e espectros de massa obtidos. Na imagem **b** observa-se um sistema de HPLC da *Agilent Technologies* 1200 Series associada a um detetor da *Bruker Daltonics* HCT Ultra, apresentando também fonte de ESI e analisador de massas por armadilha de iões (“*ion trap*”), localizado no Departamento de Química e Farmácia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve. Neste equipamento foram necessários dois *softwares*: o *Bruker Daltonics Esquire* 6.1 para a aquisição e registo dos cromatogramas e dos espectros e o *DataAnalysis*TM versão 3.4 para o seu tratamento.

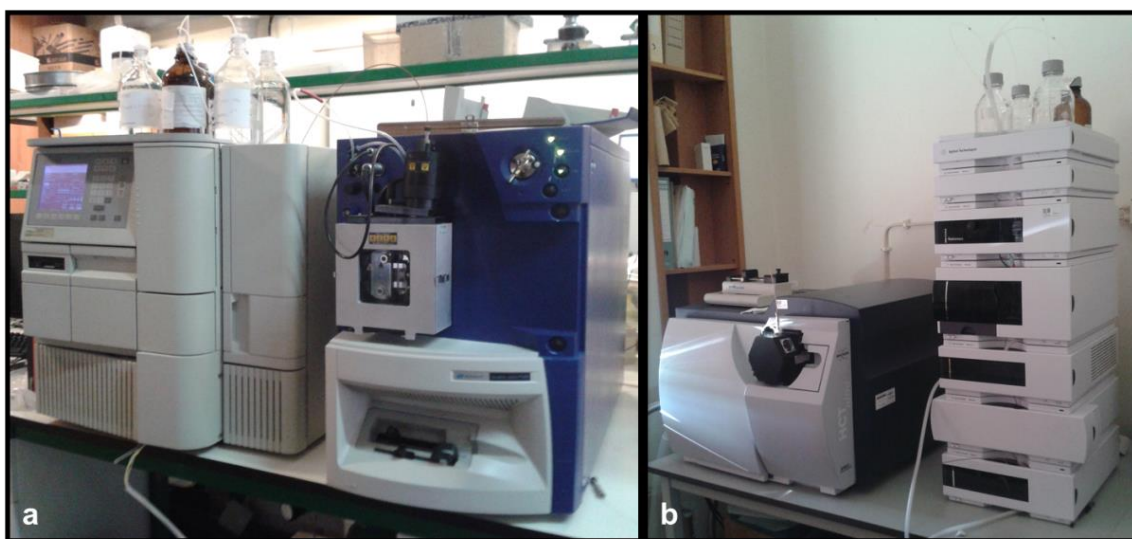


Figura 4.3. Equipamentos de HPLC/MS. (a) HPLC da *Waters Alliance* 2695 associada a um detetor da *Quattro micro* API; (b) HPLC da *Agilent Technologies* 1200 Series associada a um detetor da *Bruker Daltonics* HCT Ultra.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. ANÁLISE POR HPLC/MS²

Num estudo preliminar para a análise das cianotoxinas no equipamento de HPLC da *Waters Alliance* 2695 associada ao detetor da *Quattro micro* API utilizaram-se os parâmetros descritos na tabela 4.1. adaptados de Pinheiro *et al.*, 2013. As condições cromatográficas tabeladas foram aplicadas para a separação das cianotoxinas na coluna *GraceSmart* RP-18 (150 × 2,1 mm; 3 µm), enquanto as condições espetrométricas permitiram identificá-las.

Tabela 4.1. Parâmetros cromatográficos e espetrométricos utilizados para a análise das cianotoxinas em estudo no equipamento de HPLC da *Waters Alliance 2695* associada ao detetor da *Quattro micro API* (adaptado de Pinheiro *et al.*, 2013).

	STX	CYN
PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS		
Fase móvel	A: MeOH com 0,1% de ácido fórmico B: Água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico	
Modo de eluição	Isocrático (2% A durante 10 min)	
Fluxo da fase móvel	0,25 mL/min	
Temperatura na coluna	30°C	
Pressão na coluna	1450-1480 psi (100-102 bar)	
PARÂMETROS ESPETROMÉTRICOS		
Polaridade	Positiva	Positiva
Voltagem do capilar	3000 V	3000 V
Voltagem do cone	40 V	40 V
Voltagem do extrator	3 V	3 V
Voltagem das lentes	1 V	1 V
Temperatura na fonte	120°C	120°C
Temperatura de secagem	300°C	300°C
Fluxo do gás de secagem	10,80 L/min	10,80 L/min
Energia de colisão	30 eV	30 eV
Tempo de permanência dos iões	0,50 s	0,50 s
Razão <i>m/z</i> do ião-parental	300	416
Razão <i>m/z</i> dos iões-filho	137, 204, 221, 240, 282	176, 194, 274, 318, 336

Tendo como base os parâmetros da tabela anterior otimizou-se o método analítico no equipamento de HPLC da *Agilent Technologies 1200 Series* acoplada ao detetor da *Bruker Daltonics HCT Ultra*, ajustando-se as condições cromatográficas e espetrométricas para a separação e deteção das cianotoxinas nas diferentes polaridades (tabela 4.2.).

Tabela 4.2. Parâmetros cromatográficos e espetrométricos otimizados para a STX em modo positivo e para a CYN em ambos os modos no equipamento de HPLC da *Agilent Technologies 1200 Series* acoplada ao detetor da *Bruker Daltonics HCT Ultra*.

	STX	CYN	
PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS			
Fase móvel	A: Água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico B: MeOH com 0,1% de ácido fórmico		
Modo de eluição	Gradiente (0-3 min 2% B, 6-8 min 40% B, 12-20 min 2% B)		
Fluxo da fase móvel	0,20 mL/min		
Temperatura na coluna	30°C		
Pressão inicial na coluna	79-80 bar (1146-1160 psi)		
PARÂMETROS ESPETROMÉTRICOS – MODO <i>FULL SCAN</i>			
Polaridade	Positiva	Positiva	Negativa
Voltagem do capilar	-4000 V	-4000 V	3000 V
Pressão no nebulizador	45 psi	45 psi	45 psi
Fluxo do gás de secagem	10,00 L/min	10,00 L/min	10,00 L/min
Temperatura de secagem	360°C	360°C	360°C

Voltagem do <i>skimmer</i>	15,00 V	37,70 V	-43,30 V
Voltagem à saída do capilar	175,00 V	187,50 V	-208,30 V
Voltagem do octopolo 1 DC	12,00 V	9,52 V	-8,00 V
Voltagem do octopolo 2 DC	1,87 V	2,80 V	-2,27 V
<i>Trap Drive</i>	37,40	49,50	50,20
Amplitude de rf do octopolo	237,50 Vpp	154,20 Vpp	175,00 Vpp
Voltagem das lentes 1	-3,30 V	-3,80 V	3,30 V
Voltagem das lentes 2	-53,50 V	-62,50 V	64,00 V
PARÂMETROS ESPETROMÉTRICOS – MODO MS²			
Razão <i>m/z</i> do ião-parental	300	416	414
Intervalo <i>m/z</i>	2	2	2
Amplitude de fragmentação	0,50 V	0,31 V	0,90 V
Razão <i>m/z</i> dos iões-filho	204, 221, 266, 282	176, 194, 274, 318, 336	272, 302, 371

Adicionalmente foi realizado um estudo complementar com as microcistinas (MCT), particularmente as variantes MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR, tendo sido analisadas pelo equipamento anterior segundo os parâmetros mencionados na tabela 4.3., adaptados de Rodrigues *et al.*, 2013.

Tabela 4.3. Parâmetros cromatográficos e espectrométricos utilizados para a análise de três variantes das microcistinas (MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR) em modo negativo no equipamento de HPLC da *Agilent Technologies 1200 Series* acoplada ao detetor da *Bruker Daltonics HCT Ultra* (adaptado de Rodrigues *et al.*, 2013).

	MCT-LR	MCT-RR	MCT-YR
PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS			
Fase móvel	A: Água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico B: MeOH com 0,1% de ácido fórmico		
Modo de eluição	Gradiente (0-1 min 2% B, 7-10 min 60% B, 12-20 min 2% B)		
Fluxo da fase móvel	0,20 mL/min		
Temperatura na coluna	30°C		
Pressão inicial na coluna	79-80 bar (1146-1160 psi)		
PARÂMETROS ESPETROMÉTRICOS – MODO FULL SCAN			
Polaridade	Negativa	Negativa	Negativa
Voltagem do capilar	4000 V	4000 V	4000 V
Pressão no nebulizador	45 psi	45 psi	45 psi
Fluxo do gás de secagem	10,00 L/min	10,00 L/min	10,00 L/min
Temperatura de secagem	360°C	360°C	360°C
Voltagem do <i>skimmer</i>	-26,30 V	-26,30 V	-26,30 V
Voltagem à saída do capilar	-264,00 V	-264,00 V	-264,00 V
Voltagem do octopolo 1 DC	-20,00 V	-20,00 V	-20,00 V
Voltagem do octopolo 2 DC	-2,75 V	-2,75 V	-2,75 V
<i>Trap Drive</i>	99,40	99,40	99,40
Amplitude de rf do octopolo	204,20 Vpp	204,20 Vpp	204,20 Vpp
Voltagem das lentes 1	7,00 V	7,00 V	7,00 V
Voltagem das lentes 2	89,50 V	89,50 V	89,50 V
PARÂMETROS ESPETROMÉTRICOS – MODO MRM			
Razão <i>m/z</i> do ião-parental	994	1037	1044
Intervalo <i>m/z</i>	2	2	2

Amplitude de fragmentação	0,52 V	0,52 V	0,52 V
Razão <i>m/z</i> dos iões-filho	976	1019	1026

4.3.2. EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS PELO MÉTODO DE SPE

Na tabela 4.4. estão descritos os protocolos de alguns métodos de SPE aplicados neste projeto, denominados por diclorometano-metanol (“DCM-MeOH”), acetonitrilo (“ACN”) e metanol-ácido clorídrico (“MeOH-HCl”), para avaliar a eficiência de extração das cianotoxinas nos cartuchos utilizados. O método implementado para a extração de amostras encontra-se na tabela 4.5.

Tabela 4.4. Metodologias de SPE aplicadas em vários cartuchos para a avaliação da eficiência de extração.

MÉTODO “DCM-MEOH” ^[1]	MÉTODO “ACN” ^[2]	MÉTODO “MEOH-HCL” ^[3]
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ativação <ul style="list-style-type: none"> ➤ 5 mL DCM ➤ 5 mL MeOH ➤ 5 mL água Milli-Q 2. Introdução da amostra 3. Eluição: 5 mL DCM:MeOH (1:4) com 1% de ácido fórmico 4. Evaporação à secura com azoto 5. Ressolubilização com 50% MeOH aquoso com 0,1% de ácido fórmico 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ativação <ul style="list-style-type: none"> ➤ 5 mL 10% ACN com 0,1% de ácido fórmico ➤ 5 mL 90% ACN com 0,1% de ácido fórmico 2. Introdução da amostra 3. Lavagem <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2,5 mL 90% ACN com 0,1% de ácido fórmico ➤ 2,5 mL 80% ACN com 0,1% de ácido fórmico 4. Eluição: 2,5 mL 10% ACN com 0,1% de ácido fórmico 5. Evaporação à secura com azoto 6. Ressolubilização com 50% MeOH aquoso com 0,1% de ácido fórmico 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ativação <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2 mL MeOH ➤ 2 mL 0,1 M HCl 2. Introdução da amostra 3. Eluição: 2 mL água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico

^[1] Adaptado de Wormer *et al.*, 2009; ^[2] Vale, 2010; ^[3] Adaptado de Vale *and* Taleb, 2005

Tabela 4.5. Metodologia de SPE implementada para a extração de amostras.

MÉTODO “DCM-MEOH B” ^[1]
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ativação <ul style="list-style-type: none"> ➤ 5 mL DCM ➤ 5 mL MeOH ➤ 5 mL água Milli-Q 2. Introdução da amostra 3. Eluição: 5 mL DCM:MeOH (1:4) com 0,05% de ácido acético 4. Evaporação à secura com azoto 5. Ressolubilização com água Milli-Q com 0,05% de ácido acético

^[1] Adaptado de Wormer *et al.*, 2009

4.3.3. PREPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para o estudo da linearidade em água pura prepararam-se oito padrões de calibração (200; 100; 50; 25; 12,5; 5; 3; 1,5 µg/L) nessa matriz acidificada com 0,05% de ácido acético, incluindo uma amostra branco, os quais foram analisados *a posteriori* por HPLC/MS² segundo os parâmetros otimizados da tabela 4.2.

Também foi estudada a linearidade em água natural filtrada não contaminada da barragem do Beliche, preparando-se para esse efeito nove padrões de calibração (200; 100; 50; 25; 12,5; 7,5; 5; 3; 1,5 µg/L) nessa matriz acidificada com 0,05% de ácido acético, incluindo uma amostra branco, e analisando-se por HPLC/MS². Os padrões de 100 e 7,5 µg/L em particular foram preparados em cinco replicados independentes para avaliar a gama de trabalho através do teste da homogeneidade de variâncias.

4.3.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS REAIS

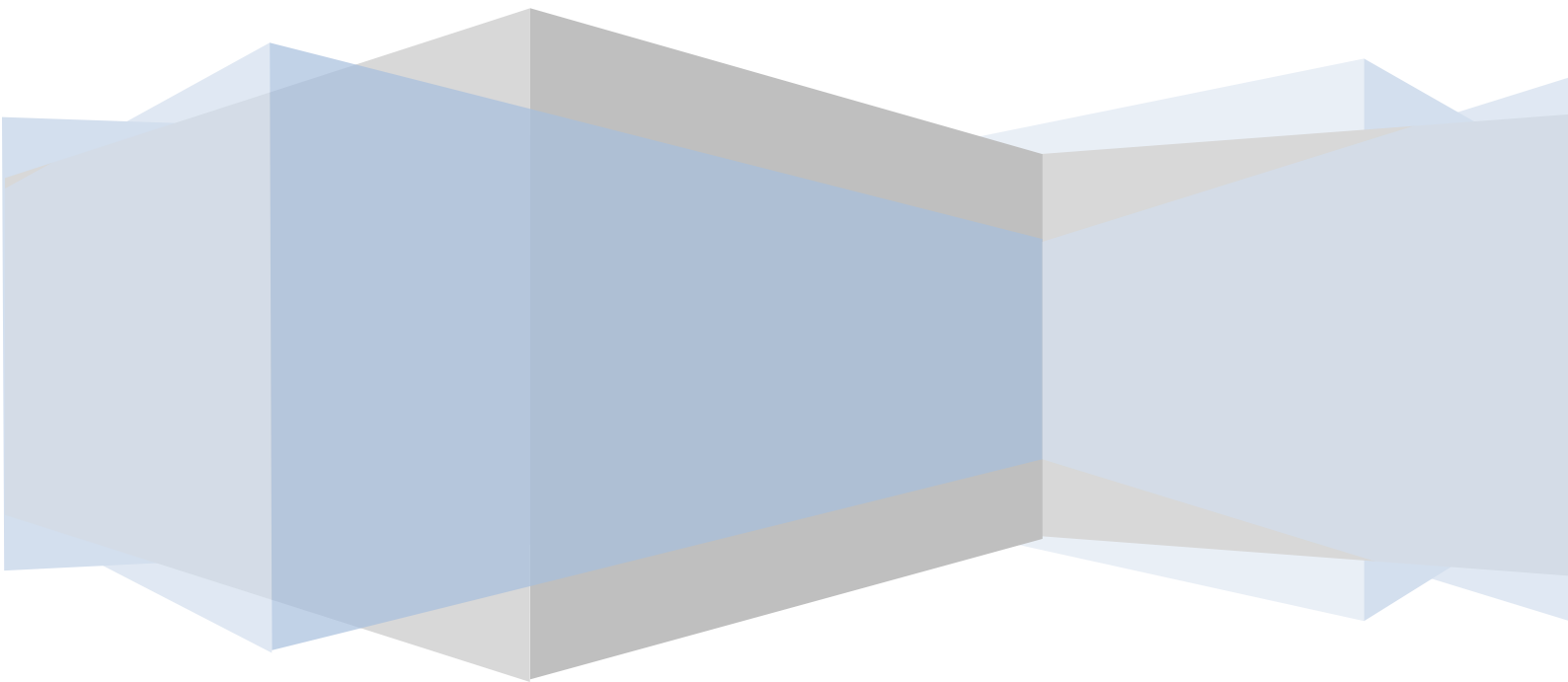
As amostras de água natural oriundas das barragens do Beliche e do Alqueva foram descongeladas e filtradas com filtros de membrana de celulose regenerada (RC 55), possuindo poros com 0,45 µm de diâmetro, seguido do processo de extração implementado (tabela 4.5.).

Várias amostras de urina colhidas a partir do próprio autor foram armazenadas a -20°C tendo sido, sempre que necessário, descongeladas e submetidas ao processo analítico. Numa situação em particular a urina foi sujeita a um tratamento de precipitação de proteínas, adaptando-se um protocolo praticado por Foss *and* Aubel, 2013. A uma solução de 10 mL de urina foi adicionado 0,1 M de NaOH até atingir pH 10, essencial para precipitar as proteínas, seguido de centrifugação a 1250 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. As proteínas precipitadas foram descartadas e ao sobrenadante colhido adicionou-se 0,1 M de HCl para neutralizar o pH para um valor aproximado de 7. Noutra situação, para avaliar a eficiência de extração em urina diluída, prepararam-se três replicados de 5 mL de urina não precipitada, os quais foram acidificados com 0,05% de ácido acético, fortificados com a CYN com a concentração de 5 µg/L e diluídos dez vezes.

Antes das análises por HPLC/MS² os extratos de urina foram filtrados com filtros de membrana à base de fluoreto de polivinilideno (PVDF), possuindo poros com 0,45 µm de diâmetro, uma vez que se encontravam turvos contendo partículas sólidas em suspensão, uma condição imprópria para este tipo de análises.

Capítulo 5

Resultados obtidos e sua discussão



5.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1. HPLC/MS COM TRIPLO QUADRUPOLO

A primeira fase deste projeto teve como propósito otimizar as condições cromatográficas que melhor se ajustam para a separação das cianotoxinas em estudo, nomeadamente a STX e a CYN, assim como otimizar as condições de análise para a deteção dessas cianotoxinas por espetrometria de massa. Para esse efeito foi realizado um estudo preliminar na HPLC da *Waters Alliance 2695* associada ao detetor da *Quattro micro API*. Este detetor apresenta o triplo quadrupolo como analisador de massas que, como já referido na secção 3.3.2.2., é preferencialmente usado para a quantificação de analitos presentes em quantidades vestigiais nas matrizes complexas. Esse tipo de análises requer uma elevada especificidade analítica que pode ser conferida pela função MRM, pois permite analisar especificamente um ou vários analitos através da seleção de determinados valores de razão m/z do ião-parental e de um ião-filho característico. No entanto, antes de se proceder à análise pelo modo MRM, alguns passos tiveram de ser efetuados para determinar não só o tempo de retenção das cianotoxinas como também o valor de razão m/z do ião-filho mais relevante.

Para efeitos de separação cromatográfica foi sempre utilizada neste trabalho a coluna *GraceSmart RP-18* (150 × 2,1 mm; 3 µm), que pode ser visualizada na figura 4.2. Esta coluna apresenta uma fase estacionária à base de sílica quimicamente modificada contendo grupos funcionais C18 que lhe conferem propriedades apolares, permitindo trabalhar em cromatografia de fase reversa. Assim sendo, a fase móvel deve ser mais polar do que a fase estacionária, tendo-se adaptado um sistema de Pinheiro *et al.*, 2013, que consiste numa mistura de água Milli-Q com 2% de metanol, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Relativamente ao diâmetro de partícula, um valor baixo de 3 µm implica a aplicação de altas pressões que são comuns em HPLC. Além disso, a coluna é *endcapped*, o que minimiza o número de grupos silanol livres na matriz de sílica. Esta característica impede que ocorram interações secundárias com grupos polares dos analitos, não interferindo na eficiência de retenção dos mesmos.

Uma solução padrão com ambas as cianotoxinas com a concentração de 500 µg/L (ou ppb – partes por bilião) em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético foi preparada a partir dos padrões certificados adquiridos e analisada nas condições mencionadas na tabela 4.1. A análise foi primeiramente realizada em modo SIM com polaridade positiva para apurar o tempo de retenção das cianotoxinas, tendo sido estipulado *a priori* um valor de $[M+H]^+ = 300$ m/z para a massa do ião-parental da STX

e de $[M+H]^+ = 416$ m/z para a CYN. Como se pode verificar pela figura 5.1., a STX apresentou um tempo de retenção de 1,41 minutos, enquanto a CYN eluiu ao fim de 5,53 minutos. Significa que a STX interage pouco com a fase estacionária contida na coluna cromatográfica, ao passo que a CYN apresenta uma maior interação com a mesma.

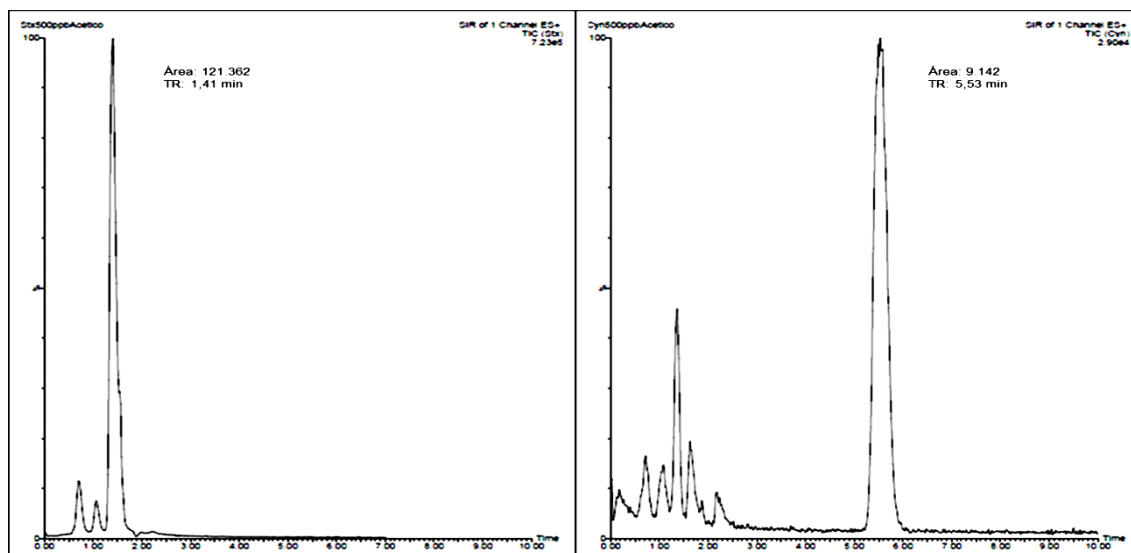


Figura 5.1. Cromatogramas em modo SIM com polaridade positiva de ambas as cianotoxinas em estudo.

Tendo em consideração os tempos de retenção referidos procedeu-se à diminuição da janela de tempo para a deteção das cianotoxinas, definindo-se um período de 1 a 2 minutos para a STX e de 5 a 6 minutos para a CYN. De seguida efetuou-se uma nova análise da solução padrão de 500 $\mu\text{g/L}$ no modo *Daughters* para, a partir do cromatograma obtido (figura 5.2.), se adquirirem os espectros de massa de fragmentação característicos de cada cianotoxina (figura 5.3.). Esta função permite que o ião-parental seja fragmentado nos seus iões-filho correspondentes, cuja intensidade do sinal depende do valor estabelecido para a energia de colisão (*Waters Corporation, 2002*).

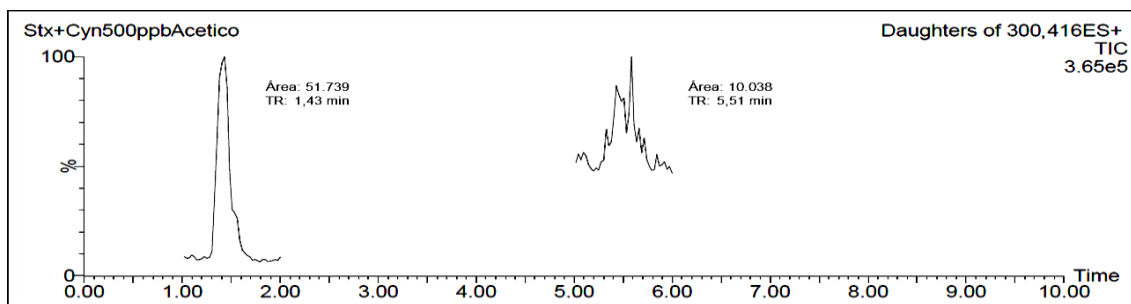


Figura 5.2. Cromatograma em modo *Daughters* com polaridade positiva das cianotoxinas. O primeiro pico cromatográfico corresponde à STX, enquanto o segundo é referente à CYN.

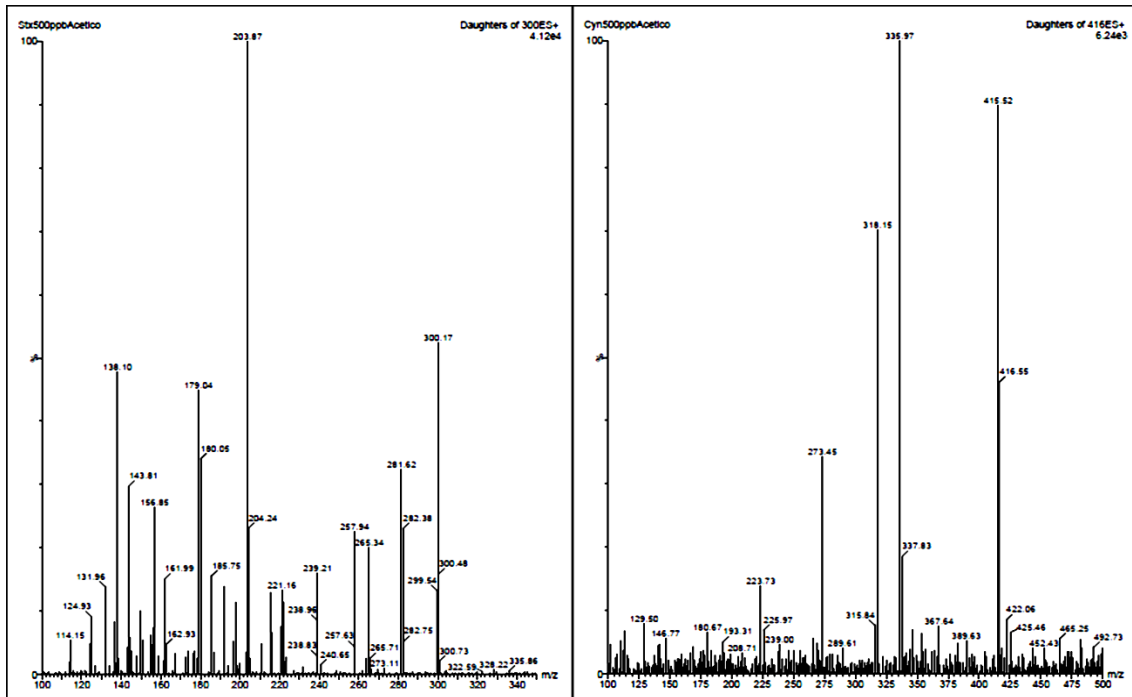


Figura 5.3. Espectros MS² com polaridade positiva das cianotoxinas.

O pico cromatográfico correspondente à STX apresentou um sinal elevado, mas com uma ligeira curvatura no lado direito do pico resultante dos diferentes estados de protonação da cianotoxina. O pico referente à CYN apresentou um sinal baixo e mal definido, podendo haver interferentes de natureza desconhecida a co-eluir com esta cianotoxina. Pelos espectros da figura 5.3. verificou-se que os iões-filho com massas 204 e 336 m/z obtiveram o sinal mais elevado para a STX e a CYN, respetivamente.

Com estes dados foi possível estabelecer as transições para a análise em modo positivo de cada cianotoxina na função MRM, sendo de 300 > 204 para a STX e de 416 > 336 para a CYN. Na figura 5.4. encontra-se o cromatograma obtido após análise neste modo.

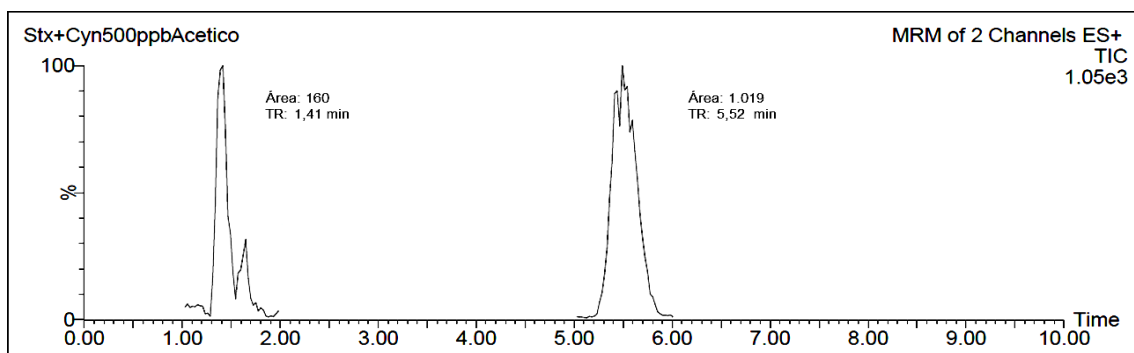


Figura 5.4. Cromatograma em modo MRM com polaridade positiva das cianotoxinas, correspondendo o primeiro pico cromatográfico à STX com a transição 300 > 204, enquanto o segundo é referente à CYN com a transição 416 > 336.

Conclui-se que as duas cianotoxinas, nestas condições estabelecidas, podem ser separadas com boa resolução, apresentando a STX um tempo de retenção de 1,41 minutos e a CYN de 5,52 minutos. Não obstante, e tal como verificado pelo cromatograma obtido pela função *Daughters*, os picos representados das cianotoxinas não se encontram “puros”. O desdobramento do pico da STX deve-se a estados de protonação distintos da cianotoxina, enquanto no caso da CYN co-eluem outras substâncias de natureza desconhecida que interferem no seu sinal.

Otimizadas as condições para a deteção das cianotoxinas, foram analisados vários extratos resultantes da extração de amostras de água Milli-Q fortificadas por três métodos de SPE em quatro cartuchos distintos. Este procedimento serviu para avaliar a eficiência de extração, determinando qual o melhor método e o melhor cartucho que permitissem a extração simultânea de ambas as cianotoxinas com boas percentagens de recuperação, sendo descrito com maior detalhe mais adiante. A análise referida foi efetuada em modo SIM com polaridade positiva, contudo, os cromatogramas obtidos não se revelaram conclusivos. Com a repetição desta análise noutro equipamento constatou-se que no tempo de retenção da STX eluíram outras substâncias que não a cianotoxina em questão. Além disso, no modo SIM obtém-se informação sobre o ião-molecular de interesse, mas não das suas transições de fragmentação, não sendo possível definir com clareza a identidade dos picos cromatográficos. Os resultados obtidos com este equipamento não permitiram então avaliar a eficiência dos métodos de SPE aplicados.

5.1.2. HPLC/MS COM ION TRAP

Tendo como base o estudo preliminar realizado no equipamento anterior foram ajustadas as condições cromatográficas e espetrométricas para a identificação da STX e da CYN na HPLC da *Agilent Technologies 1200 Series* acoplada ao detetor da *Bruker Daltonics HCT Ultra*. Para esse efeito foi preparada uma solução padrão com ambas as cianotoxinas com a concentração de 500 µg/L em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético a partir dos padrões certificados. Desta vez a solução foi injetada diretamente no espetrómetro de massa e analisada em modo *full scan* e MS². Na tentativa de se obter o melhor sinal possível foram otimizados todos os parâmetros do sistema ótico do espetrómetro de massa tanto em polaridade positiva como negativa, estando descritos na tabela 4.2. Com este procedimento conclui-se que a STX apenas ioniza em modo positivo (figura 5.5.), ao invés da CYN que pode ionizar tanto em modo positivo como em modo negativo (figuras 5.6. e 5.7., respetivamente). Além disso, o ruído diminui significativamente em modo negativo, o que significa que

existem menos compostos a ionizar nesta polaridade, conferindo maior especificidade do que em modo positivo.

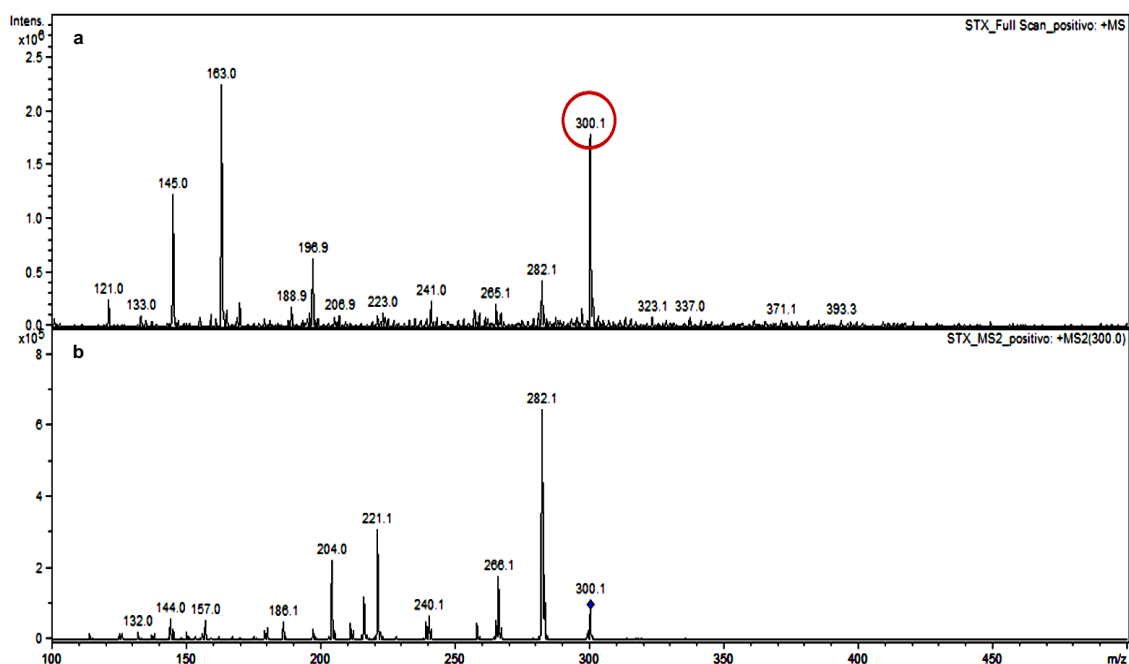


Figura 5.5. Espectros em modo *full scan* (a) e MS² (b) da STX com polaridade positiva após infusão direta de uma solução padrão de 500 µg/L em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético.

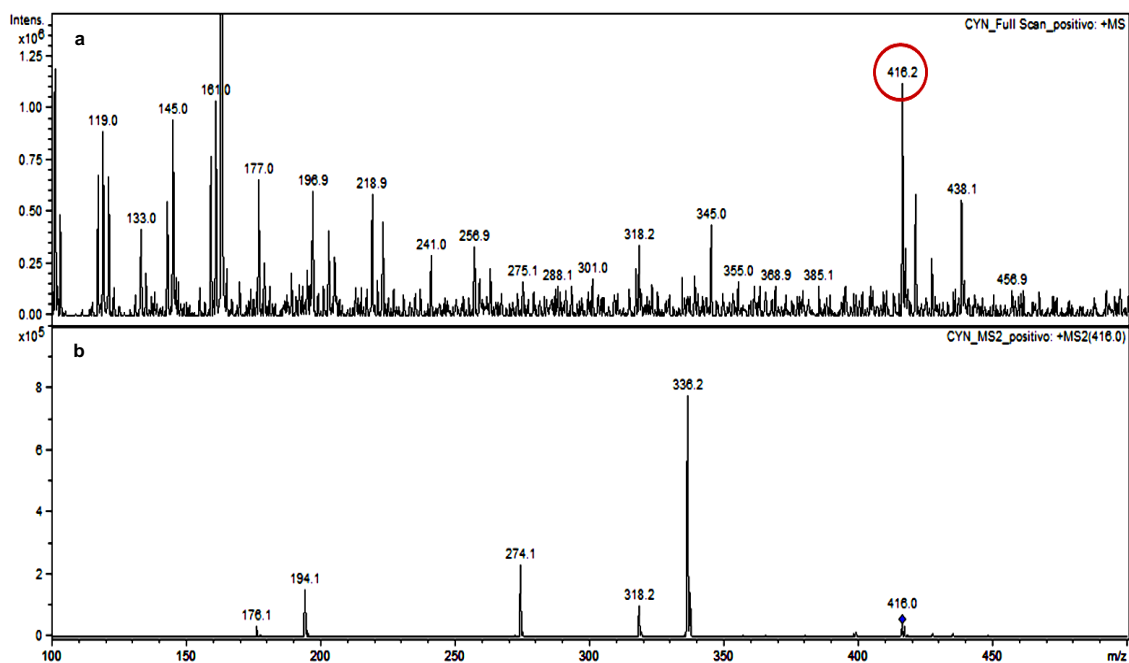


Figura 5.6. Espectros em modo *full scan* (a) e MS² (b) da CYN com polaridade positiva após infusão direta de uma solução padrão de 500 µg/L em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético.

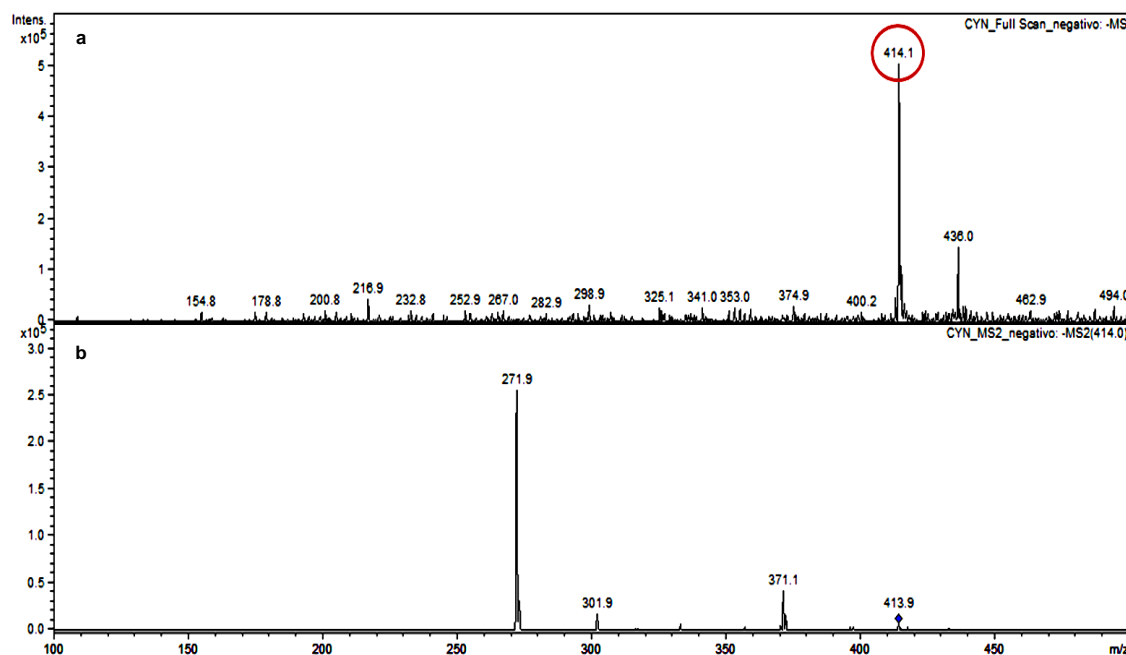


Figura 5.7. Espectros em modo *full scan* (a) e MS^2 (b) da CYN com polaridade negativa após infusão direta de uma solução padrão de 500 $\mu\text{g/L}$ em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético.

De seguida procedeu-se à análise por HPLC/ MS^2 de uma solução padrão com 100 $\mu\text{g/L}$ usando-se a mesma coluna *GraceSmart* RP-18 (150 \times 2,1 mm; 3 μm), a fim de avaliar o sinal em modo positivo da STX e da CYN pelo cromatograma, e em modo negativo apenas para a CYN. Cada cianotoxina foi analisada por um método analítico distinto para uma determinada polaridade, considerando os parâmetros espetrométricos tabelados (tabela 4.2.). Nestas análises por MS^2 o sinal obtido advém da corrente total de iões (TIC) resultantes da fragmentação do ião-molecular selecionado. Pode por vezes ser necessário complementar esta informação com um cromatograma de iões extraídos (EIC), em que do total conjunto de iões se extraem apenas os que correspondem ao ião-molecular e seus fragmentos característicos das cianotoxinas em estudo. Esta função permite, assim, obter cromatogramas mais “limpos” e mais específicos, sendo útil por exemplo na análise de amostras complexas que apresentam muitos analitos, alguns podendo co-eluir com as substâncias de interesse (*Bruker Daltonics*, 2006).

Nas análises por HPLC foram aplicadas as condições cromatográficas indicadas na tabela 4.2., semelhantes às utilizadas com o equipamento anterior. No entanto, optou-se pela análise em sistema de gradiente ao invés do modo isocrático para minimizar a retenção sucessiva de substâncias com menor polaridade na coluna cromatográfica.

Através dos cromatogramas da STX e da CYN com polaridade positiva presentes nas figuras 5.8. e 5.9., respetivamente, verificou-se que as duas

cianotoxinas eluíram em tempos ligeiramente diferentes dos obtidos pelo equipamento anterior (2,10 minutos no caso da STX e 4,30 minutos em relação à CYN), resultado da alteração do sistema de eluição. Mais uma vez verificou-se uma ligeira curvatura na forma do pico cromatográfico correspondente à STX, derivado dos diferentes estados de protonação da cianotoxina. No que só à CYN diz respeito, o pico presente no cromatograma obtido em modo negativo (figura 5.10.) apresentou uma área bastante inferior em relação ao modo positivo, contudo, o ruído da linha de base diminuiu significativamente, o que quer dizer que, como referido *a priori*, existem menos compostos a ionizar com polaridade negativa. Por conseguinte ocorrem menos interferências, conferindo maior especificidade.

Dada a boa resolução entre os picos cromatográficos das duas cianotoxinas, para as análises posteriores por HPLC/MS² foram definidos dois segmentos de análise em períodos de tempo distintos, um para a deteção da STX nos primeiros 3 minutos e outro para a deteção da CYN desde esse período até ao final da corrida cromatográfica. Cada segmento está programado para detetar a substância de interesse com os parâmetros espetrométricos correspondentes otimizados anteriormente (tabela 4.2.).

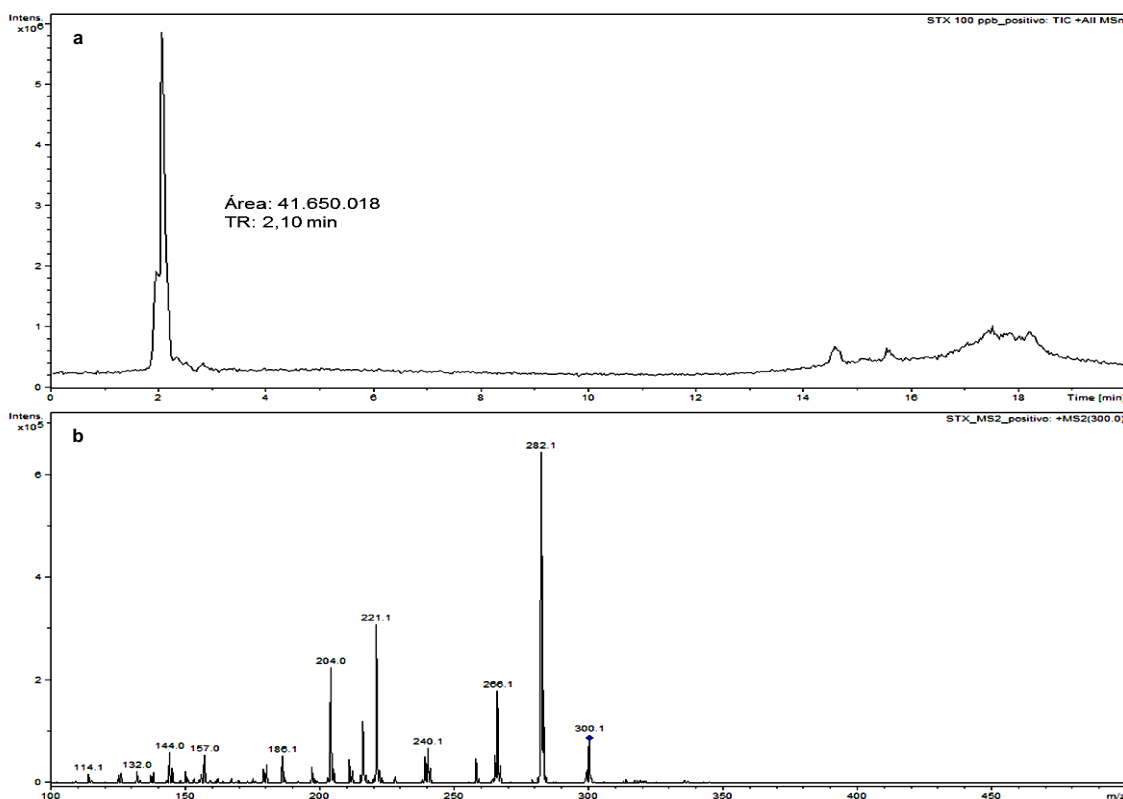


Figura 5.8. Cromatograma em modo TIC (a) e espetro MS² característico (b) da STX com polaridade positiva.

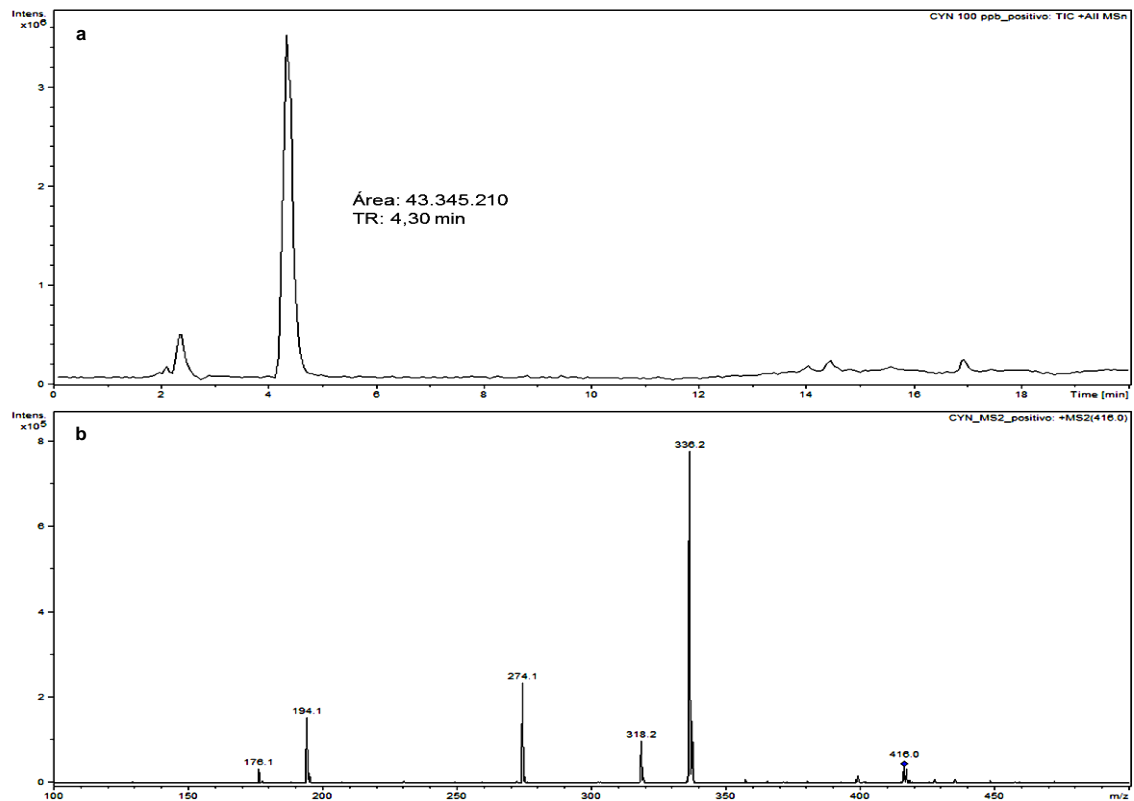


Figura 5.9. Cromatograma em modo TIC (a) e espectro MS² característico (b) da CYN com polaridade positiva.

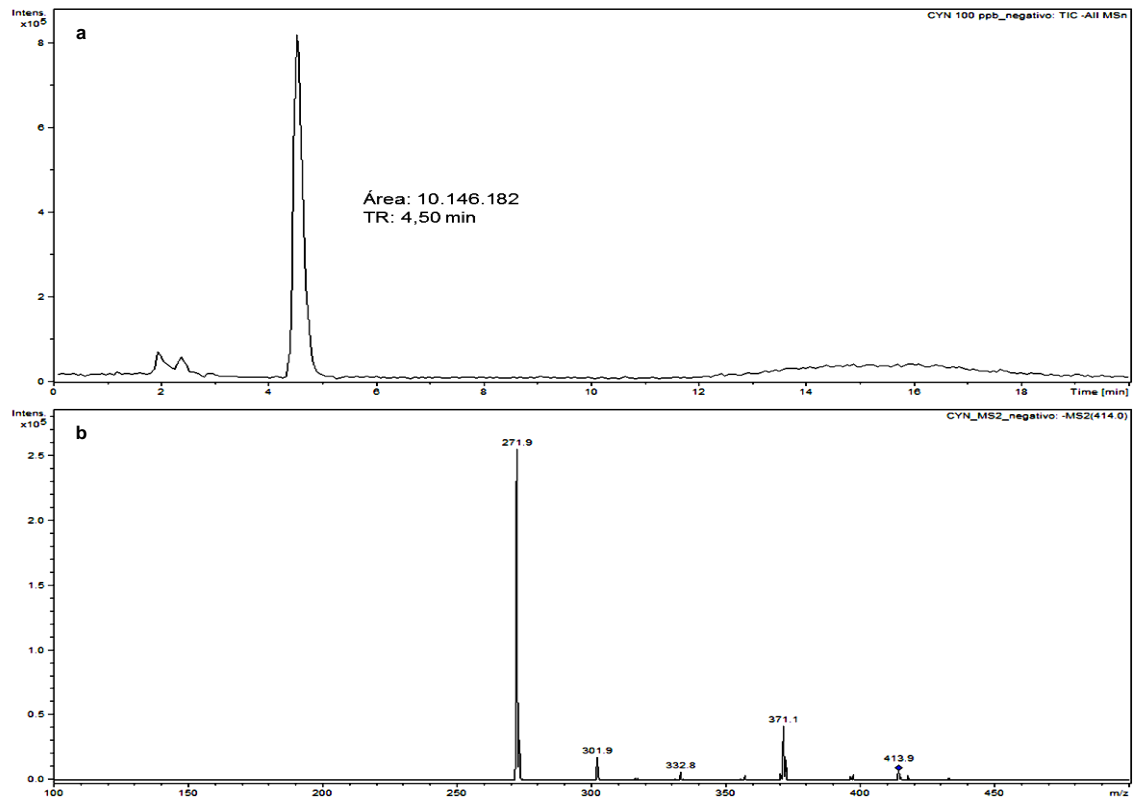


Figura 5.10. Cromatograma em modo TIC (a) e espectro MS² característico (b) da CYN com polaridade negativa.

5.1.3. CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1.3.1. Curvas de calibração e sua linearidade

Para o estudo da linearidade foram analisados por HPLC/MS² nas polaridades positiva e negativa três replicados de oito padrões de calibração (200; 100; 50; 25; 12,5; 5; 3; 1,5 µg/L) em água Milli-Q acidificada com 0,05% de ácido acético, incluindo uma amostra branco, obtendo-se as curvas de calibração presentes em anexo (figuras 8.1. e 8.2.). Para a construção destas curvas foi considerada a média dos pontos experimentais obtidos em modo EIC. Por um lado, a média revela a tendência central do sinal obtido a partir do conjunto de análises efetuadas para cada padrão de calibração, conferindo menor desvio-padrão dos níveis residuais do que se considerasse cada ponto individualmente. Por outro lado, o modo EIC é mais específico do que o modo TIC, obtendo-se informação somente dos picos característicos das cianotoxinas. Na tabela 8.4. que consta em anexo estão indicados os dados relativos aos coeficientes de determinação (r^2) e aos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumentais calculados de duas formas distintas, como já referenciado na secção 3.5.5., obtidos em modo EIC.

A STX não apresentou linearidade para a gama de trabalho considerada, visto que o valor tabelado de r^2 de 0,9780 encontra-se abaixo do limite mínimo estipulado de 0,995 para que a linearidade de uma curva de calibração tenha qualidade (RELACRE, 2013). Pelo gráfico da figura 8.1. em anexo verificou-se que o sinal apresenta uma forma logarítmica, ao invés de uma função polinomial típica do primeiro grau. Significa que para as concentrações mais elevadas da STX o sinal é inferior ao esperado. Foram então retirados alguns pontos experimentais correspondentes aos padrões de calibração com maior concentração (200; 100 e 50 µg/L), obtendo-se a curva a azul da figura 5.11. Com esta modificação o valor de r^2 subiu substancialmente, enquanto ambos os limites instrumentais desceram (tabela 5.1.).

A CYN foi linear para o mesmo intervalo de concentrações em qualquer polaridade com valores de r^2 acima de 0,995. Procedeu-se, contudo, à remoção do padrão de calibração com menor concentração (1,5 µg/L) para a linearidade em modo negativo, uma vez que o sinal obtido foi inferior a dez vezes a amplitude do ruído da linha de base (tabela 8.4. em anexo), não sendo viável para quantificar. Obtiveram-se assim as curvas a vermelho das figuras 5.11. e 5.12. para os modos positivo e negativo, respetivamente, considerando a gama de trabalho entre 1,5 a 200 µg/L para o primeiro caso e entre 3 a 200 µg/L para o segundo caso, incluindo a amostra branco. Os valores dos limites e do r^2 constam na tabela 5.1.

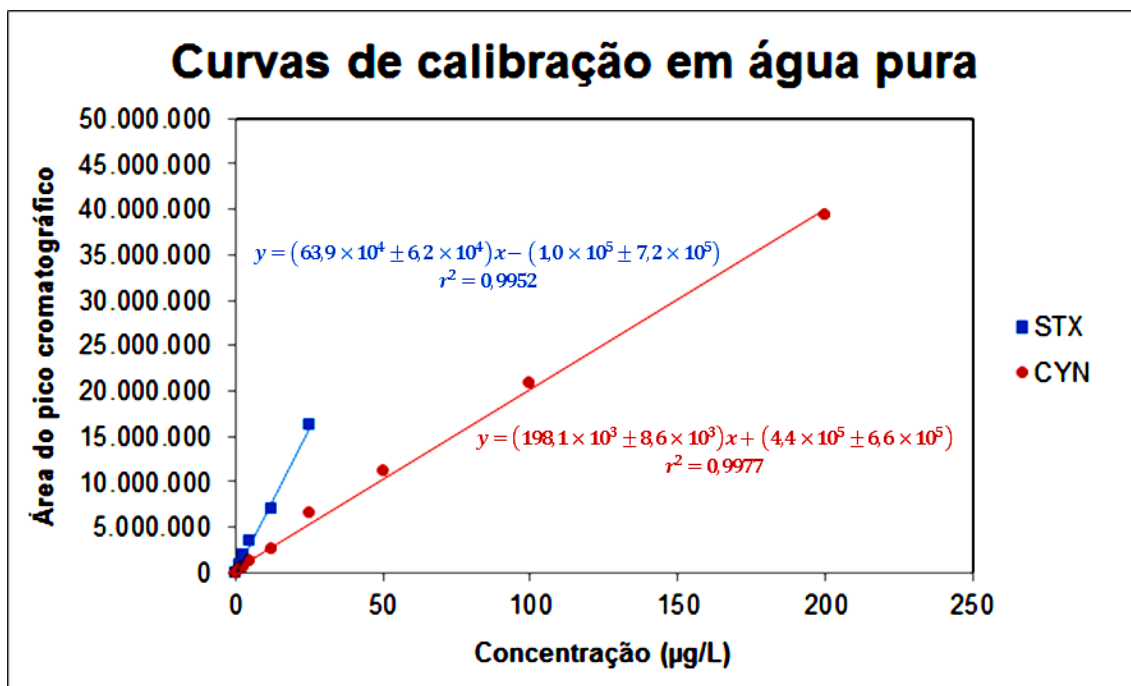


Figura 5.11. Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 25 µg/L para a STX e de 1,5 a 200 µg/L para a CYN, incluindo a amostra branco.

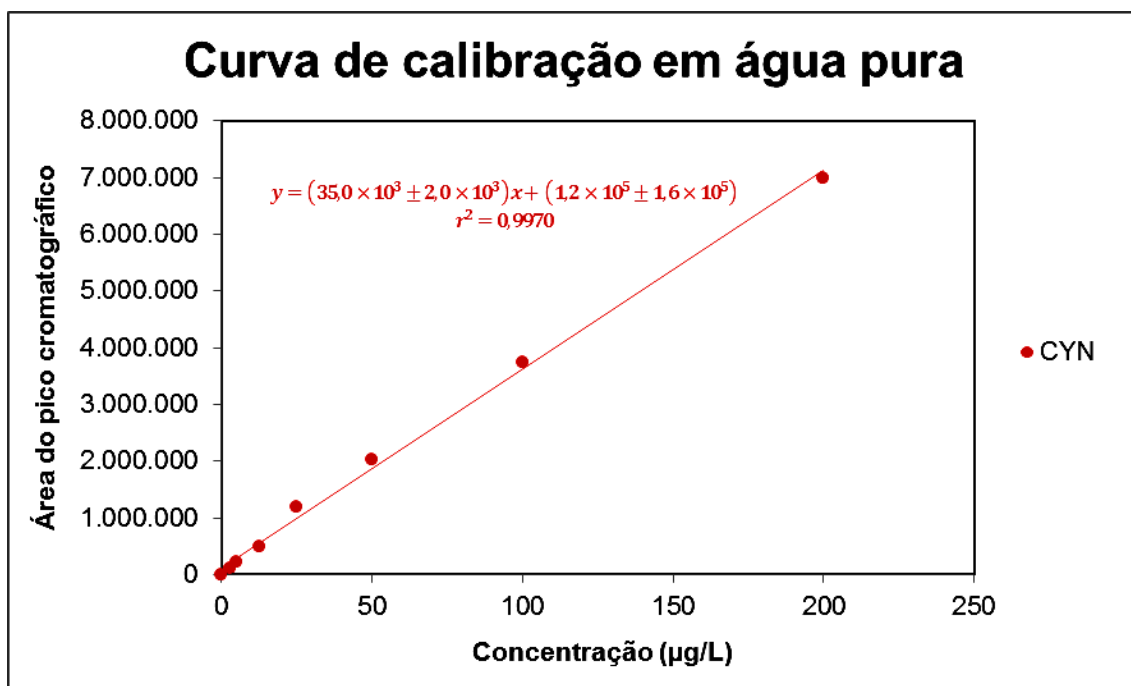


Figura 5.12. Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 3 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.

Tabela 5.1. Limites instrumentais e coeficientes de determinação corrigidos obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água pura.

	Polaridade	LD ($\mu\text{g/L}$)		LQ ($\mu\text{g/L}$)		r^2
		Razão $3(S_y/m)$	Razão $3(\text{sinal/ruído})$	Razão $10(S_y/m)$	Razão $10(\text{sinal/ruído})$	
STX	Positiva	2,2	0,3	7,4	1,0	0,9952
CYN	Positiva	10,3	0,4	34,5	1,3	0,9977
	Negativa	12,4	0,6	41,2	2,4	0,9970

S_y – Desvio-padrão absoluto dos níveis residuais; m – Declive da reta

Conclui-se pela tabela acima que os limites na água pura são inferiores para a STX em comparação com a CYN, sendo que para esta cianotoxina em particular atingem-se limites mais baixos em modo positivo do que em modo negativo. Além disso, verifica-se uma grande discrepância entre os limites calculados a partir da curva de calibração e os obtidos através da razão sinal-ruído, sobretudo para a CYN, devido à dispersão dos pontos experimentais considerados em relação à reta de calibração.

De modo semelhante foi estudada a linearidade das cianotoxinas em água natural filtrada não contaminada da barragem do Beliche. Para esse efeito prepararam-se nove padrões de calibração (200; 100; 50; 25; 12,5; 7,5; 5; 3; 1,5 $\mu\text{g/L}$) nesta matriz acidificada com 0,05% de ácido acético, incluindo uma amostra branco, e analisaram-se por HPLC/MS² nas duas polaridades. As curvas obtidas em modo EIC após análise em duplicado de cada padrão encontram-se em anexo (figuras 8.3. e 8.4.), assim como os dados respeitantes aos limites instrumentais e ao r^2 (tabela 8.5.).

As duas cianotoxinas apresentaram linearidade na gama de trabalho estipulada com valores de r^2 muito próximos de 1. Neste caso retirou-se o ponto experimental com a concentração de 1,5 $\mu\text{g/L}$ para ambas as cianotoxinas pois, pela tabela 8.5. presente em anexo, verificou-se que o sinal obtido foi igual ou inferior a dez vezes a amplitude do ruído da linha de base. Nas figuras 5.13. e 5.14. obtiveram-se as novas curvas para as polaridades positiva e negativa, respetivamente. Os valores de r^2 praticamente mantiveram-se. Quanto aos limites, em modo positivo subiram ligeiramente, enquanto em modo negativo o LD manteve-se e o LQ desceu (tabela 5.2.).

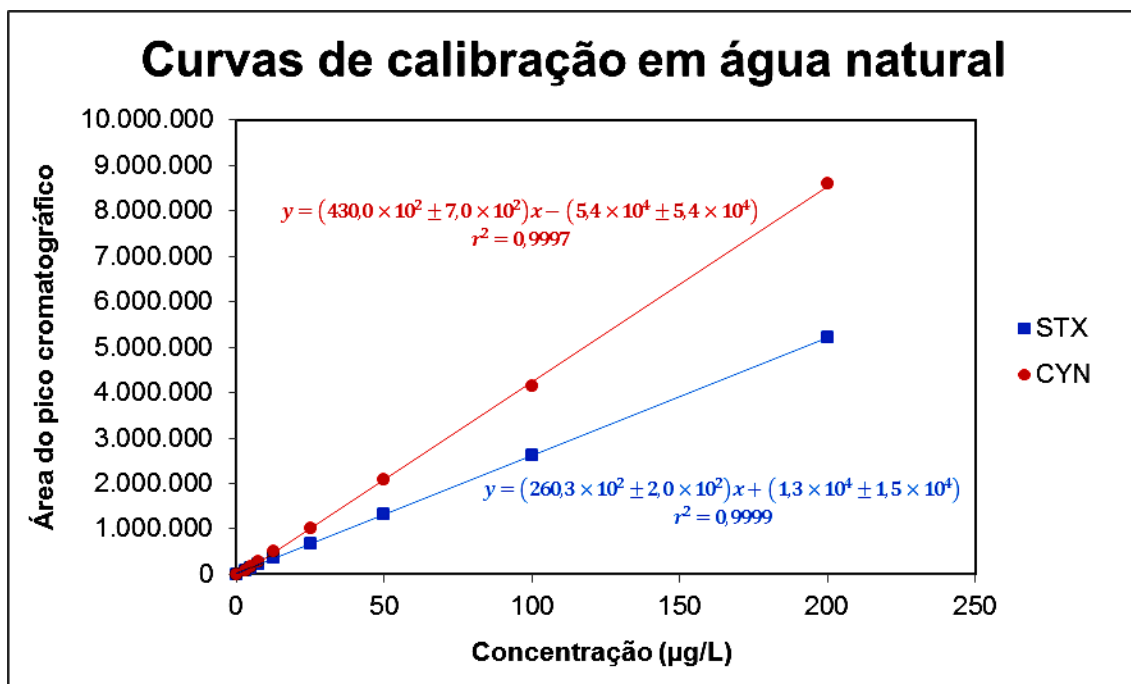


Figura 5.13. Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 3 a 200 $\mu\text{g/L}$, incluindo a amostra branco.

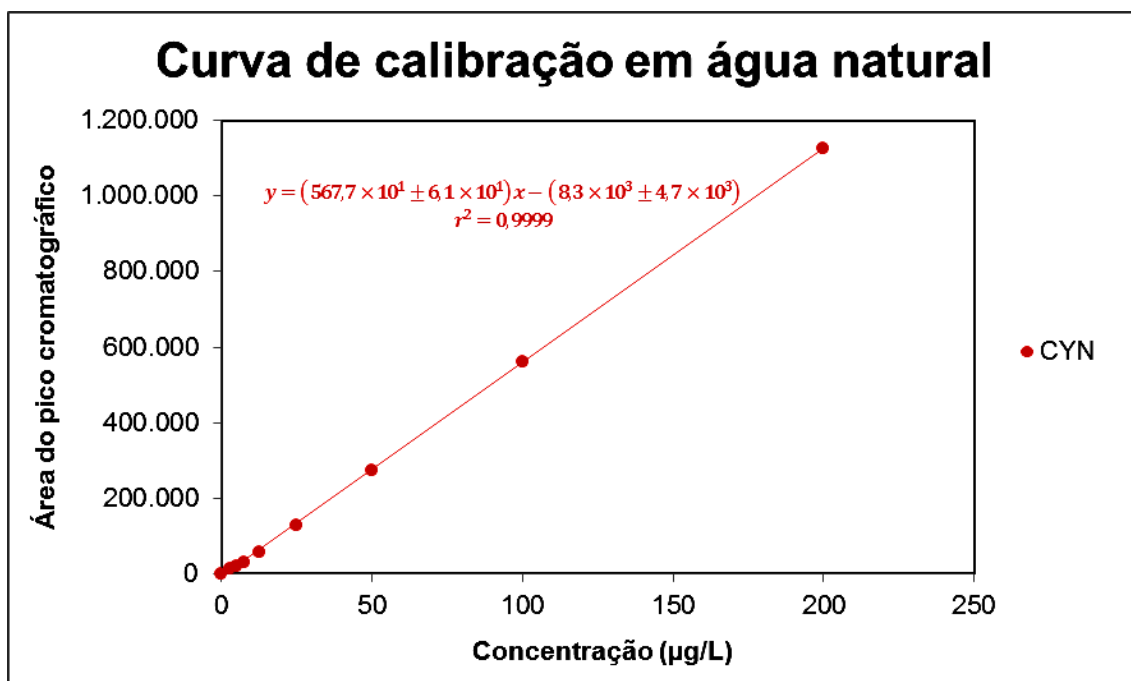


Figura 5.14. Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 3 a 200 $\mu\text{g/L}$, incluindo a amostra branco.

Tabela 5.2. Limites instrumentais e coeficientes de determinação corrigidos obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água natural.

	Polaridade	LD ($\mu\text{g/L}$)		LQ ($\mu\text{g/L}$)		r^2
		Razão $3(S_y/m)$	Razão $3(\text{sinal/ruído})$	Razão $10(S_y/m)$	Razão $10(\text{sinal/ruído})$	
STX	Positiva	1,8	0,4	5,9	1,5	0,9999
CYN	Positiva	3,9	0,5	12,9	2,4	0,9997
	Negativa	2,6	0,8	8,5	2,8	0,9999

S_y – Desvio-padrão absoluto dos níveis residuais; m – Declive da reta

Constata-se que a STX apresenta limites inferiores aos obtidos para a CYN em água natural. Relativamente à CYN, apenas se observam limites mais baixos para a polaridade positiva quando calculados pela razão sinal-ruído, sendo superiores à polaridade negativa quando determinados a partir da curva de calibração, uma situação diferente à verificada em água pura. A discrepância entre os limites calculados nas duas formas é menor quando comparada à da água pura, o que se traduz num maior ajuste, i.e. numa maior colinearidade, entre os pontos experimentais em relação à reta de calibração.

5.1.3.1.1. TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS

Para averiguar se a gama de trabalho encontra-se bem ajustada, efetuou-se um teste de homogeneidade de variâncias através da análise por HPLC/MS², nas diferentes polaridades, de cinco replicados dos padrões de calibração de 100 e 7,5 $\mu\text{g/L}$ em água natural acidificada com 0,05% de ácido acético. O cálculo das médias e das variâncias para estes padrões encontram-se na tabela 5.3.

Tabela 5.3. Teste de homogeneidade de variâncias.

	STX	CYN	
	Modo positivo	Modo positivo	Modo negativo
\bar{x}_{100}	2.628.294,4	4.129.145,8	563.037,0
$\bar{x}_{7,5}$	217.224,6	271.148,0	30.925,2
S_{100}^2	6.821.770.303,3	254.915.813,7	19.583.866,0
$S_{7,5}^2$	15.345.395,8	24.641.709,5	5.194.857,2
$S_{100}^2/S_{7,5}^2$	444,6	10,3	3,8

Para a STX a razão entre as variâncias foi de 444,6, um valor muito elevado quando comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para quatro graus de liberdade com 99% de confiança, correspondente a 16,0 (tabela 8.6. em anexo). Quer dizer que as diferenças de variâncias são significativas, devendo a

gama de trabalho ser modificada. Já para a CYN os valores obtidos foram inferiores a 16,0 para qualquer polaridade, o que define uma gama de trabalho bem ajustada, pois as diferenças de variâncias não são significativas. No entanto, estes resultados são meramente indicativos, uma vez que as normas de validação estabelecidas pela RELACRE recomendam a realização deste teste com dez replicados dos padrões de calibração e, neste caso, apenas foram preparados cinco replicados (RELACRE, 2013).

5.1.3.2. Especificidade

Amostras não fortificadas de água pura, água natural filtrada não contaminada da barragem do Beliche e urina filtrada tanto precipitada como não precipitada, antes e após extração pelo método de SPE, foram analisadas pelo método analítico otimizado para avaliar as interferências de cada matriz e se os picos respectivos não coincidiam com o tempo de retenção das cianotoxinas em estudo. As análises foram efetuadas em polaridades distintas tanto no modo TIC como no modo EIC, obtendo-se os cromatogramas das figuras 8.5. a 8.8. presentes em anexo.

Constata-se que o método é específico para ambas as cianotoxinas nas matrizes de água pura e água natural em qualquer situação. Quanto à urina verifica-se um pico cromatográfico no tempo de retenção correspondente à CYN em determinadas análises, embora o sinal obtido não inviabilize a quantificação de amostras reais.

5.1.3.3. Precisão

Foram preparadas duas soluções padrão de 50 µg/L tanto em água Milli-Q como em água natural filtrada, ambas acidificadas com 0,05% de ácido acético, para testar a precisão instrumental através de três injeções sucessivas de cada padrão. Os cromatogramas em modo TIC e EIC com os desvios-padrão relativos (RSD) tabelados afiguram-se em anexo (figuras 8.9. a 8.12.).

Os RSDs calculados variaram entre 0,1 a 2,0% para o modo TIC e entre 1,0 a 3,9% em modo EIC (tabela 5.4.). Apesar de revelarem precisão, estes valores são apenas indicativos, pois deveriam ser efetuadas dez análises da mesma solução em vez de três (RELACRE, 2013).

Tabela 5.4. Ensaio de precisão instrumental para diferentes polaridades nas matrizes de água pura e água natural.

	Polaridade	TIC		EIC	
		Água pura	Água natural	Água pura	Água natural
STX	Positiva	1,3%	0,6%	3,9%	2,3%
CYN	Positiva	1,2%	0,1%	2,1%	1,7%
	Negativa	1,3%	2,0%	2,2%	1,0%

5.1.3.4. Exatidão

As curvas de calibração em água natural foram testadas a fim de avaliar o erro por exatidão. Para esse efeito prepararam-se duas amostras de 100 mL de água natural filtrada, sendo acidificadas com 0,05% de ácido acético e extraídas segundo o método de SPE adotado (tabela 4.5.). Os extratos foram ressolubilizados com 500 µL de água Milli-Q com 0,05% de ácido acético e fortificados para concentrações diferentes das cianotoxinas a partir de uma solução padrão de 200 µg/L previamente preparada. A concentração efetiva do extrato com menor quantidade da cianotoxina foi de 9,5 µg/L, enquanto o de maior quantidade foi de 66,7 µg/L (os cálculos efetuados encontram-se na tabela 8.7. em anexo). Os cromatogramas resultantes da análise dos extratos por HPLC/MS² em modo EIC nas polaridades positiva e negativa podem ser visualizados nas figuras 8.13. e 8.14. em anexo, respetivamente.

A partir das áreas dos picos cromatográficos obtidos para cada cianotoxina calcularam-se as concentrações respetivas através das equações das retas de calibração respetivas e determinaram-se os erros por exatidão para ambas as polaridades (tabela 5.5.). Constata-se pelos valores tabelados que os erros obtidos para a STX em qualquer concentração encontram-se acima do valor máximo de 10% definido pelas normas da RELACRE, enquanto para a CYN os erros encontram-se próximos desse valor (RELACRE, 2013).

Tabela 5.5. Ensaio de exatidão em água natural para duas concentrações distintas.

	STX		CYN			
	Modo positivo		Modo positivo		Modo negativo	
	Concentração calculada (µg/L)	Erro (%)	Concentração calculada (µg/L)	Erro (%)	Concentração calculada (µg/L)	Erro (%)
Extrato 9,5 µg/L	7,8	17,7	10,0	4,9	10,8	13,7
Extrato 66,7 µg/L	52,0	22,0	60,5	9,3	69,7	4,5

5.2. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE SPE

5.2.1. ESCOLHA DO MÉTODO E DO CARTUCHO MAIS EFICIENTES

A segunda fase do projeto consistiu em determinar o cartucho mais apropriado e o método de SPE mais eficiente e preciso que permitisse extrair simultaneamente as cianotoxinas em estudo com uma elevada percentagem de recuperação. Para esse fim foram preparados três conjuntos de amostras de 200 mL de água Milli-Q acidificadas com 0,1% de ácido fórmico (registando-se um valor de pH de 2,17), sendo fortificadas com ambas as cianotoxinas com a concentração de 0,25 µg/L e extraídas segundo as metodologias de SPE descritas na tabela 4.4.

Num primeiro ensaio foram testados quatro cartuchos distintos para cada método de SPE, estando um exemplar de cada um representado na figura 4.1. O cartucho *Bond Elut Env* (3 mL/200 mg) apresenta uma matriz polimérica de PS-DVB, conferindo-lhe propriedades hidrofóbicas (*Agilent Technologies*, 2015b). O cartucho *Chromabond C18* (3 mL/200 mg), *endcapped*, é também apolar, sendo constituído por sílica quimicamente modificada por grupos funcionais C18 (*Macherey-Nagel*, 2015a). O cartucho *Chromabond Easy* (3 mL/200 mg), à semelhança do *Bond Elut Env*, apresenta uma matriz de PS-DVB, com a diferença de esta ser modificada quimicamente de modo a conferir propriedades de trocador aniónico fraco (*Macherey-Nagel*, 2015b). O cartucho *GracePure C18-Aq* (3 mL/500 mg), *endcapped*, é composto por uma matriz à base de sílica contendo grupos C18 modificados ao ponto de apresentarem propriedades polares, permitindo estabelecer interações hidrofílicas (*Altmann Analytik*, 2015).

Os extratos, com a concentração final das cianotoxinas de 100 µg/L, foram analisados por HPLC/MS² na polaridade positiva com as condições otimizadas que constam na tabela 4.2., apresentando-se apenas os cromatogramas em modo EIC obtidos para o método “DCM-MeOH” na figura 5.15. (os cromatogramas em modo TIC encontram-se na figura 8.15. em anexo). Neste capítulo todos os cromatogramas e dados obtidos relativos às extrações de amostras são apresentados em modo EIC, podendo-se visualizar em modo TIC nos anexos, salvo algumas exceções que serão referenciadas.

O cartucho *Chromabond Easy* foi o único a revelar resultados neste primeiro ensaio, extraindo apenas a CYN com o método “DCM-MeOH” com uma percentagem de recuperação de cerca de 65,1%, um resultado próximo do mínimo estipulado de 70% para que um método de SPE seja eficiente (Ribani *et al.*, 2004). Apesar de possuir uma matriz polimérica de PS-DVB convencionalmente apolar, a polaridade deste cartucho foi modificada de modo a interagir com substâncias moleculares com

carga. O pico do padrão analisado, contudo, não se apresenta “puro”, derivado do efeito de solvente do extrato (50% MeOH aquoso com 0,1% de ácido fórmico), o que se traduz numa interação menos eficiente com a fase estacionária.

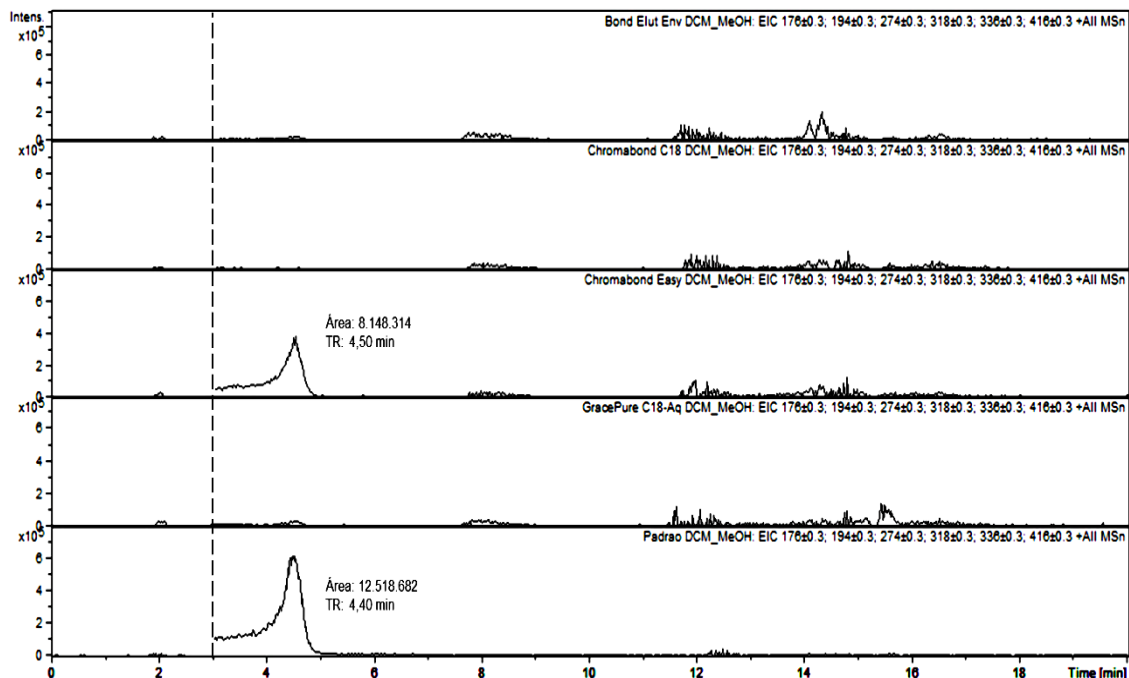


Figura 5.15. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH”.

Considerando ainda este método, tanto a CYN como a STX não foram extraídas pelos cartuchos *Bond Elut Env* e *Chromabond C18*, um resultado previsível uma vez que estes cartuchos possuem propriedades hidrofóbicas, não estabelecendo interações com substâncias ionizadas, como é o caso destas cianotoxinas com diferentes estados de ionização, dependendo do pH do meio. O mesmo se verificou para o cartucho *GracePure C18-Aq*, apesar de ser expectável a interação das cianotoxinas com o adsorvente possuindo propriedades polares.

Os restantes métodos de SPE aplicados não foram eficientes na extração de ambas as cianotoxinas em qualquer cartucho (figura 8.16. em anexo para os cromatogramas respeitantes ao método “ACN”), sendo alguns resultados relativos à STX contraditórios aos obtidos por Vale, 2010, e Vale *and* Taleb, 2005. Para esta cianotoxina em particular seria então necessário avaliar a eficiência de extração de cartuchos contendo fases estacionárias de outras classes, nomeadamente as de troca catiónica, dada a sua natureza catiónica. Os picos que se observam no tempo de eluição da STX nos cromatogramas em modo TIC (figuras 8.15. e 8.16a. em anexo) são referentes a substâncias não retidas na coluna, não correspondendo efetivamente à cianotoxina em questão.

Partindo deste conjunto de resultados optou-se por modificar ligeiramente o método “DCM-MeOH”, utilizando-se como solvente de eluição a mistura DCM:MeOH (1:4) acidificada com 0,05% de ácido acético e como solvente de ressolubilização a água Milli-Q também acidificada com 0,05% de ácido acético (tabela 4.5.). Este método adaptado, denominado de “DCM-MeOH B”, foi comparado com o anterior através de uma nova extração de ambas as cianotoxinas nas mesmas condições apenas com o cartucho *Chromabond Easy*, analisando-se os extratos por HPLC/MS² com polaridade positiva. Os cromatogramas em modo EIC encontram-se na figura 5.16., enquanto os obtidos em modo TIC afiguram-se em anexo (figura 8.17.).

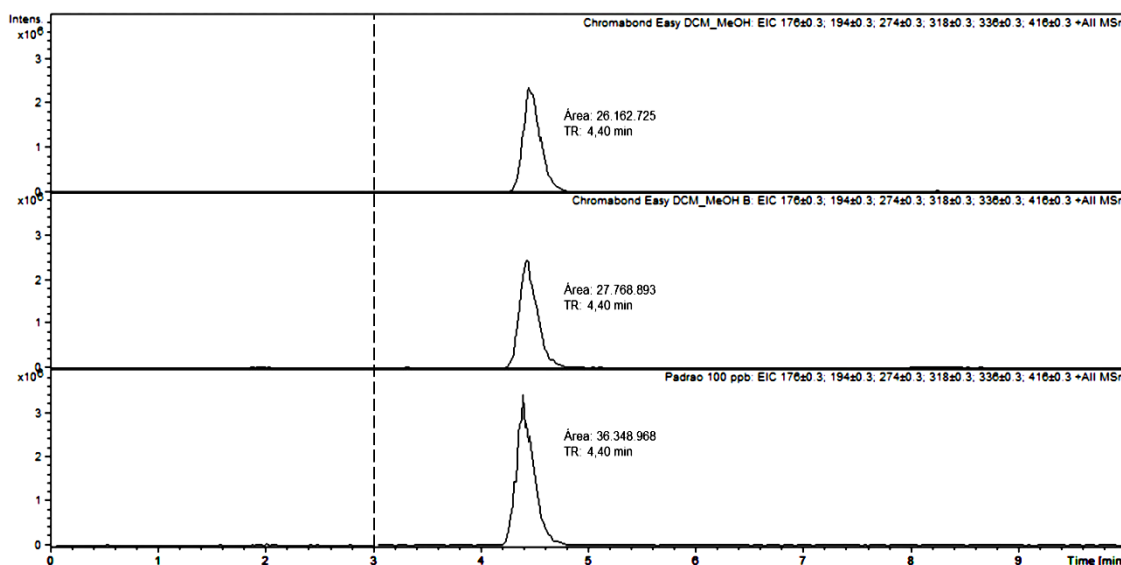


Figura 5.16. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração dos métodos de SPE “DCM-MeOH” e “DCM-MeOH B” aplicados no cartucho *Chromabond Easy*.

A CYN eluiu no mesmo tempo para qualquer método, aos 4,40 minutos, diferindo somente na área dos picos cromatográficos, sendo maior quando aplicado o método “DCM-MeOH B”, o que resultou numa percentagem de recuperação de 76,4%. Para o método “DCM-MeOH” foi recuperada 72,0% da cianotoxina. Já a STX continuou a não ser extraída, confirmando os resultados do conjunto de extrações anterior. Assim sendo, o método “DCM-MeOH B” é o mais eficiente para a extração da CYN quando aplicado no cartucho *Chromabond Easy*, ficando por determinar o método de SPE que seja eficaz para extrair a STX.

Ainda foi feito um segundo ensaio aplicando este novo método no cartucho *Bond Elut Carbon* (6 mL/500 mg) (estando também representado na figura 4.1.), empacotado com partículas de carbono grafitizado ultra puras (*Agilent Technologies*, 2015a). Os resultados não foram satisfatórios, pois apenas foi recuperada cerca de 5,7% da CYN, um valor bastante mais baixo ao obtido por Wormer *et al.*, 2009, ao

passo que a STX também não foi extraída nesta classe de cartuchos (figura 8.18. em anexo).

5.2.2. AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE SPE IMPLEMENTADO

5.2.2.1. Água pura

Apurado o método de SPE mais eficaz para a extração da CYN, torna-se necessário testá-lo a nível da precisão dos resultados para concentrações diferentes da cianotoxina, avaliando se as percentagens de recuperação são semelhantes sempre que o método for aplicado. Além disso, o ensaio com concentrações mais baixas serve também para determinar o LQ do método, tendo como base o LQ instrumental determinado *a priori*.

Com esse propósito foram preparadas nove amostras de 200 mL de água Milli-Q acidificadas com 0,05% de ácido acético (pH 3,30), sendo quatro fortificadas com a CYN com a concentração de 0,25 µg/L e as restantes cinco com a concentração de 0,0125 µg/L. Após a extração as amostras foram concentradas 400 vezes, contendo uma concentração final da CYN de 100 e 5 µg/L para as que continham maior e menor quantidade da cianotoxina, respetivamente, e analisadas por HPLC/MS² com polaridade positiva. Os cromatogramas resultantes desta análise afiguram-se em anexo (figuras 8.19. e 8.20.), estando tabelados os dados relativos ao modo EIC (tabela 5.6.).

Tabela 5.6. Ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas e fortificadas com concentrações mais altas (0,25 µg/L) e mais baixas (0,0125 µg/L) da CYN.

	Água Milli-Q (100 µg/L)			Água Milli-Q (5 µg/L)		
	Área	TR (min)	Eficiência de recuperação (%)	Área	TR (min)	Eficiência de recuperação (%)
Replicado 1	24.813.272	4,50	81,1	1.418.377	4,50	101,1
Replicado 2	24.435.051	4,50	79,9	575.378	4,60	41,0
Replicado 3	22.949.685	4,60	75,0	1.061.712	4,50	75,7
Replicado 4	22.172.227	4,60	72,5	623.354	4,50	44,4
Replicado 5	---	---	---	1.389.979	4,50	99,1
Média	23.592.558,8	4,55	77,1	1.013.760,0	4,52	72,3
DP	1.242.385,2	0,1	4,1	403.779,3	0,1	28,8
CV (%)	5,3	1,3	5,3	39,9	1,0	39,9
Padrão	30.593.132	4,60	---	1.402.844	4,70	---

TR – Tempo de retenção; DP – Desvio-padrão; CV – Coeficiente de variação

Com este ensaio obtiveram-se eficiências de recuperação de cerca de 77,1 ± 5,3% para a concentração mais elevada da CYN, correspondendo este último valor à

percentagem do CV ou RSD a 68% de confiança. Estes valores são indicativos de que o método de SPE adotado tanto é eficiente, com eficiências de recuperação acima de 70%, como preciso, com erros relativos inferiores a 10% (Ribani *et al.*, 2004). Para as concentrações mais baixas da cianotoxina as percentagens de recuperação rondaram os $72,3 \pm 39,9\%$, sendo o método eficiente mas com um erro bastante superior a 10%. Significa que para esta concentração a precisão do método fica comprometida, não sendo viável definir o LQ.

Repetiu-se este último ensaio para uma concentração da CYN um pouco mais elevada ($0,025 \mu\text{g/L}$), contendo os extratos uma concentração final de $10 \mu\text{g/L}$ depois de ressolubilizados. Após análise por HPLC/MS² (figura 8.21. em anexo) obtiveram-se percentagens de recuperação de $73,2 \pm 5,8\%$, um erro bem mais baixo e aceitável quando comparado com o ensaio anterior, o que revela que o método tanto é eficiente como preciso para esta concentração.

Em suma, o método “DCM-MeOH B” é eficiente e preciso para as concentrações da CYN de 0,25 e de $0,025 \mu\text{g/L}$ em água pura, podendo-se estabelecer um valor de $0,034 \mu\text{g/L}$ para o LQ, considerando a eficiência de recuperação e o fator de concentração das amostras.

5.2.2.2. Água natural

A precisão do método de SPE “DCM-MeOH B” foi também testada para concentrações distintas da CYN em água natural não contaminada da barragem do Beliche, situada no concelho de Castro Marim do distrito de Faro (figura 5.17.), tendo sido analisadas algumas amostras colhidas em maio de 2013, armazenadas entretanto a -20°C .

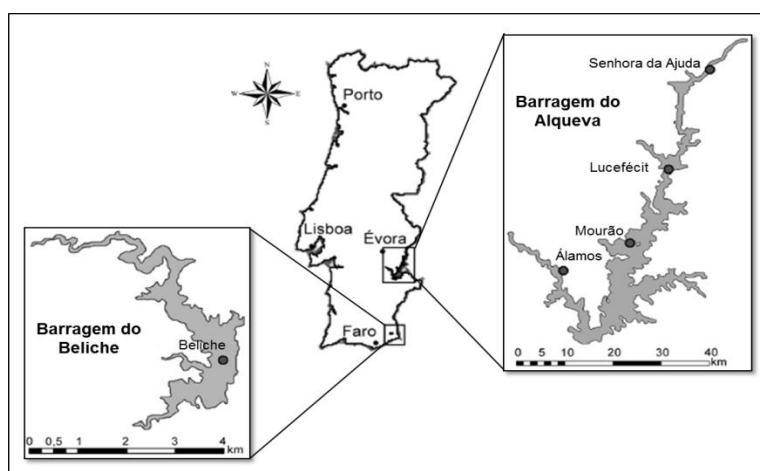


Figura 5.17. Locais de amostragem de água natural nas barragens do Beliche e do Alqueva em maio de 2013 (adaptado de Rodrigues *et al.*, 2013).

Antes do ensaio da precisão efetuou-se um conjunto de extrações com dois volumes iniciais de amostra distintos (100 e 200 mL) para avaliar o sinal adquirido. Constatou-se pelos cromatogramas e pelos dados obtidos (figura 8.23. em anexo) que não ocorreram variações significativas do sinal, optando-se nas próximas extrações por um volume inicial menor de amostra.

Posteriormente prepararam-se nove amostras de modo semelhante às do ensaio anterior com a água pura, sendo quatro fortificadas com a CYN com a concentração de 0,25 µg/L e outras tantas com a concentração de 0,025 µg/L, servindo apenas uma amostra como branco. A concentração final da CYN nos extratos foi de 50 e de 10 µg/L para os que continham maior e menor quantidade da cianotoxina, respetivamente. Seguiu-se análise por HPLC/MS² dos extratos em ambas as polaridades, estando somente representados na tabela 5.7. os dados relativos ao modo EIC com polaridade positiva (os cromatogramas obtidos encontram-se nas figuras 8.24. a 8.27. em anexo).

Tabela 5.7. Ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas, acidificadas e fortificadas com concentrações mais altas (0,25 µg/L) e mais baixas (0,025 µg/L) da CYN.

	Água natural (50 µg/L)			Água natural (10 µg/L)		
	Área	TR (min)	Eficiência de recuperação (%)	Área	TR (min)	Eficiência de recuperação (%)
Replicado 1	10.569.648	4,90	82,4	1.629.574	4,90	67,5
Replicado 2	11.000.571	4,80	85,8	1.690.257	4,90	70,1
Replicado 3	12.382.985	4,90	96,6	1.738.610	4,80	72,1
Replicado 4	11.923.973	4,90	93,0	1.718.023	4,80	71,2
Média	11.469.294,2	4,88	89,4	1.694.116,0	4,85	70,2
DP	830.788,5	0,1	6,5	47.370,3	0,1	2,0
CV (%)	7,3	1,1	7,3	2,8	1,2	2,8
Padrão	12.822.029	4,60	---	2.412.621	4,60	---

TR – Tempo de retenção; DP – Desvio-padrão; CV – Coeficiente de variação

As eficiências de recuperação em modo positivo para as concentrações mais altas da CYN foram de $89,4 \pm 7,3\%$, enquanto para as concentrações mais baixas rondaram os $70,2 \pm 2,8\%$, significando que para qualquer caso o método de SPE aplicado é eficiente e preciso na água natural com um LQ de 0,036 µg/L, muito semelhante ao obtido em água pura. Este limite é bastante inferior ao valor de 1 µg/L recomendado pela OMS (WHO, 1998). As percentagens de recuperação obtidas em modo negativo para as concentrações mais altas foram de $80,0 \pm 3,7\%$, revelando eficiência e precisão, ao passo que para as concentrações mais baixas rondaram os

63,0 ± 7,7%, sendo menos eficiente, mas preciso. Neste caso calculou-se um LQ de 0,040 µg/L, mantendo-se abaixo do valor indicado pela OMS.

Pelos cromatogramas respeitantes às análises em água natural (figuras 8.24. a 8.27. em anexo) verificou-se que a linha de base subiu comparativamente às análises em água pura (figuras 8.19. a 8.21. em anexo), o que se deve à extração de uma maior quantidade de compostos conjuntamente com as cianotoxinas que também apresentam ionização favorável em modo positivo. Além da eficiência de extração e da precisão, comprovou-se a especificidade do método em água natural a partir da análise do branco (figuras 8.24a. e 8.25a. em anexo), visto não ter revelado a presença de qualquer pico no tempo de eluição da CYN.

5.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

Com as condições cromatográficas e espetrométricas otimizadas para a deteção das cianotoxinas por HPLC/MS² e com o método de SPE implementado como o mais eficiente para extrair apenas a CYN procedeu-se para a última fase deste projeto, caracterizada pela análise de amostras reais de água natural e urina humana.

5.3.1. ÁGUA NATURAL

Para além da água natural da barragem do Beliche, também no mesmo período de maio de 2013 foram colhidas amostras de diversas localidades da barragem do Alqueva, que se situa no Alentejo interior e é considerada a maior barragem não só de Portugal como da Europa Ocidental. Na figura 5.17. encontram-se destacados os locais de amostragem, entre os quais Senhora da Ajuda, Álamos, Luceférit e Mourão.

Prepararam-se conjuntos de 100 mL de amostras acidificadas com 0,05% de ácido acético (pH 3,70), cada qual respeitante a um local de amostragem. Por cada conjunto uma das amostras foi fortificada com a CYN com a concentração de 0,25 µg/L para servir como controlo de eficiência de extração. No final do processo a concentração adicional da CYN nos controlos foi de 50 µg/L. Os extratos resultantes foram analisados por HPLC/MS² em ambas as polaridades, estando representados na figura 5.18. apenas os cromatogramas e os espetros MS² relativos aos controlos obtidos em modo EIC com polaridade positiva. Em anexo estão presentes os cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva (figura 8.29.) e nos modos TIC e EIC com polaridade negativa (figura 8.30.).

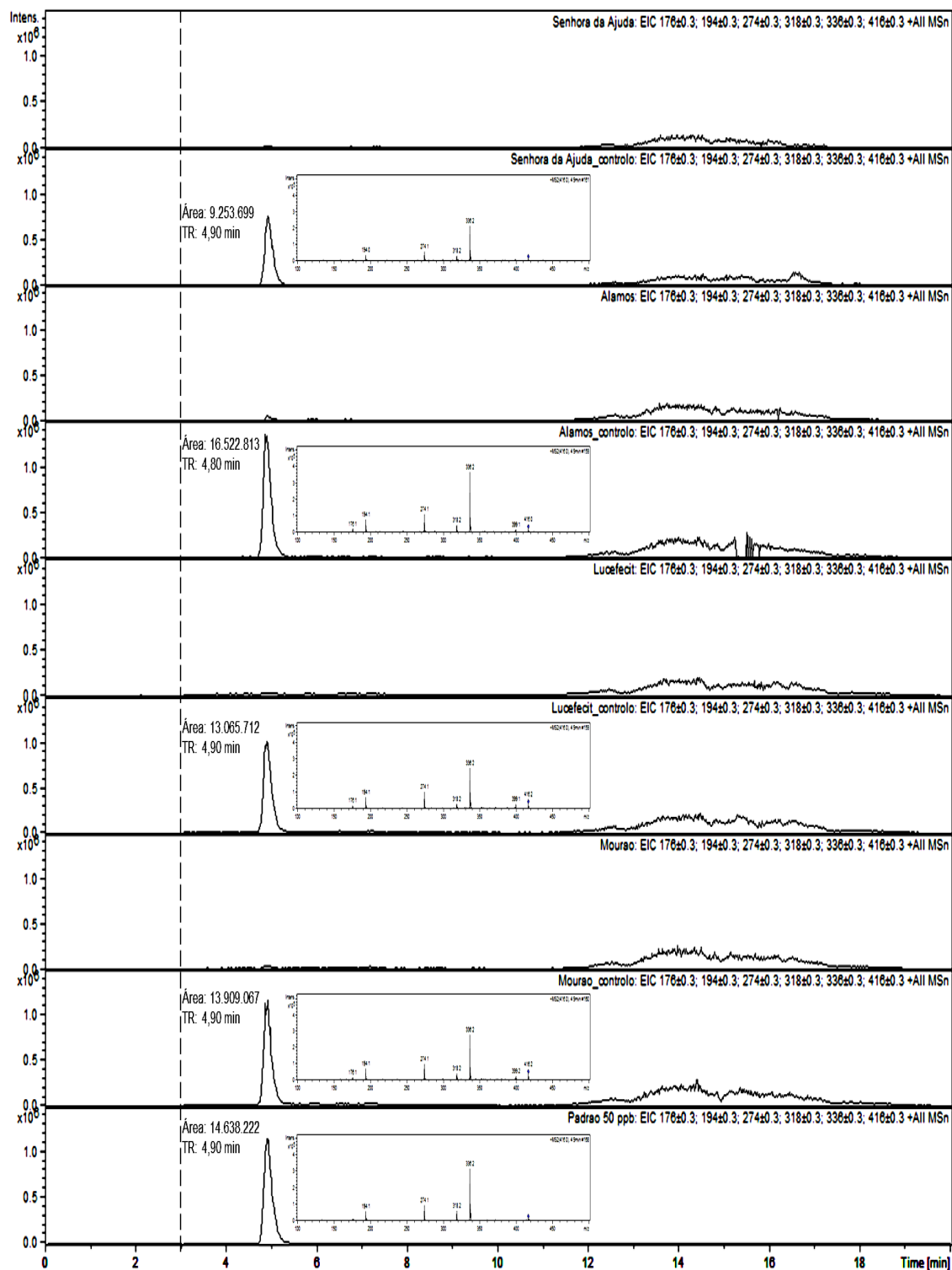


Figura 5.18. Cromatogramas em modo EIC e espetros MS² com polaridade positiva relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração.

Não foi detetada a CYN nas amostras colhidas nos locais de amostragem considerados da barragem do Alqueva. Além disso, foi possível confirmar a presença desta cianotoxina nos controlos, apesar de surgir um pico com uma razão m/z de 399 em modo positivo que não se verificou no padrão. Para a média dos controlos obtiveram-se percentagens de recuperação de $90 \pm 23\%$ em modo positivo e de $94 \pm 20\%$ em modo negativo, o que indica uma boa eficiência de extração, mas uma má precisão, devido eventualmente ao efeito da matriz. No entanto, não se pode afirmar nada quanto à veracidade dos valores obtidos, pois apenas foi feito um replicado para cada controlo, não sendo possível calcular o erro relativo para cada local de amostragem.

5.3.2. URINA

A toxicidade das cianotoxinas constitui um grande fator de risco para a saúde pública, daí ser fundamental que os cientistas forenses detetem e quantifiquem de forma rigorosa e fiável estas substâncias em matrizes complexas, como a urina, para se determinar corretamente a causa de morte de determinado cadáver vitimado por intoxicação. A urina é uma matriz estéril bastante requerida nos laboratórios forenses dada a sua facilidade de colheita de modo não invasivo (Dinis-Oliveira *et al.*, 2010).

Dada a impossibilidade de obtenção de amostras de urina *post-mortem*, por razões de índole burocrática, foi analisada a urina do próprio autor, o que alterou forçosamente os objetivos do projeto. Assim, ao invés de se analisar o metabolismo das cianotoxinas até à sua excreção pela urina, avaliou-se o efeito que esta matriz poderia exercer sobre elas.

Inicialmente avaliou-se a eficiência do método de SPE adotado em extrair a CYN da urina para averiguar o sinal obtido. Prepararam-se quatro amostras de urina acidificadas com 0,05% de ácido acético com um volume inicial de apenas 10 mL, inferior ao limite máximo estabelecido (30 mL) para a colheita de amostras *ante-mortem* e/ou *post-mortem* desta matriz com interesse forense (Dinis-Oliveira *et al.*, 2010). Fortificaram-se três destas amostras com a CYN com a concentração de 0,5 $\mu\text{g/L}$, servindo uma como branco. No final do processo os extratos foram concentrados 20 vezes, contendo uma concentração final da CYN de 10 $\mu\text{g/L}$, e filtrados. Os cromatogramas em modo EIC e os espetros MS^2 relativos aos picos obtidos após análise por HPLC/ MS^2 com polaridade positiva podem ser visualizados nas figuras 5.19a. e b., respetivamente (os cromatogramas em modo TIC estão representados na figura 8.31. em anexo).

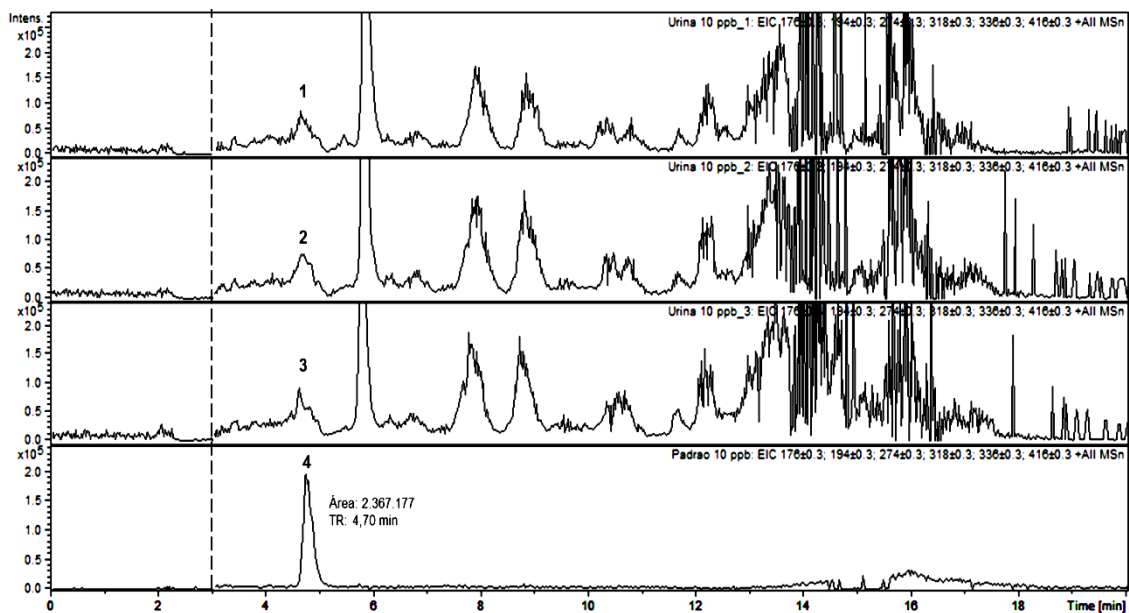


Figura 5.19a. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva de extratos de urina acidificada, fortificados com 0,5 μg da CYN. Os espectros dos picos cromatográficos numerados encontram-se na figura 5.19b.

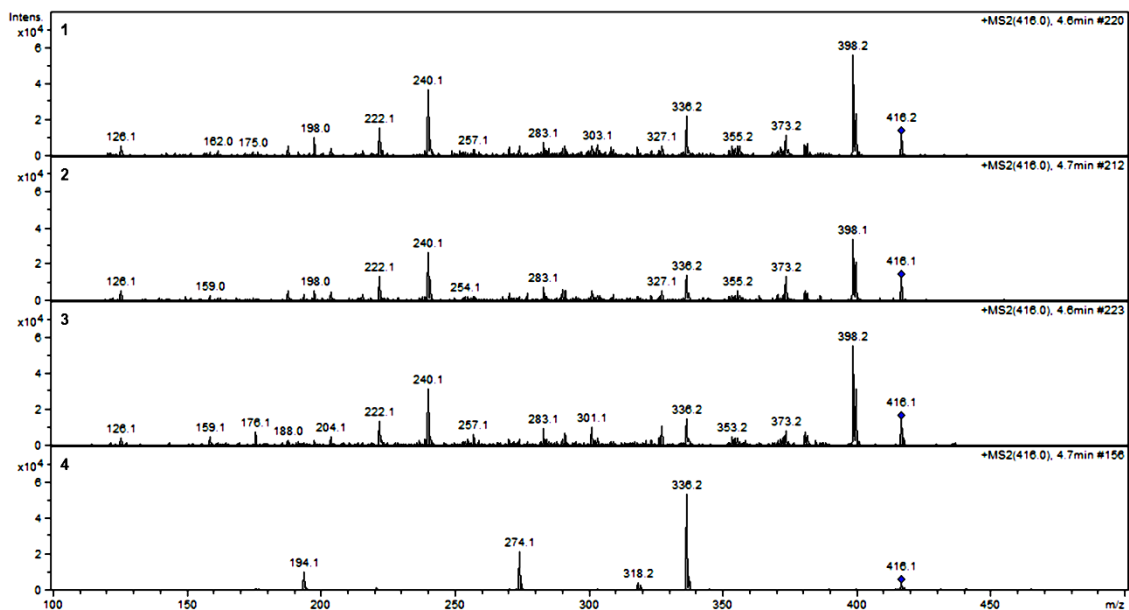


Figura 5.19b. Espectros MS^2 com polaridade positiva dos picos numerados.

Apesar de surgirem picos cromatográficos no tempo de retenção da CYN, os seus espectros permitem aferir que não correspondem efetivamente à cianotoxina. Os espectros das amostras apenas apresentam em comum com o do padrão os picos com valores m/z de 336 e 416, os quais *per se* não permitem confirmar a identidade da CYN, podendo tratar-se de uma outra substância. Significa que a CYN não foi extraída da urina por este método de SPE, podendo esta matriz exercer algum efeito sobre a cianotoxina, causando uma supressão do seu sinal.

Para avaliar de que modo a urina suprime o sinal da CYN recorreu-se a um tratamento de precipitação das proteínas constituintes desta matriz. A partir da urina precipitada prepararam-se duas amostras de 5 mL acidificadas com 0,05% de ácido acético, uma das quais fortificada com a CYN com a concentração de 1 µg/L, sendo extraídas e filtradas. Os extratos resultantes, com a concentração final da CYN de 10 µg/L, foram analisados por HPLC/MS² em ambas as polaridades, obtendo-se os cromatogramas em modo TIC e os espectros MS² respetivos nas figuras 5.20a. e b., respetivamente.

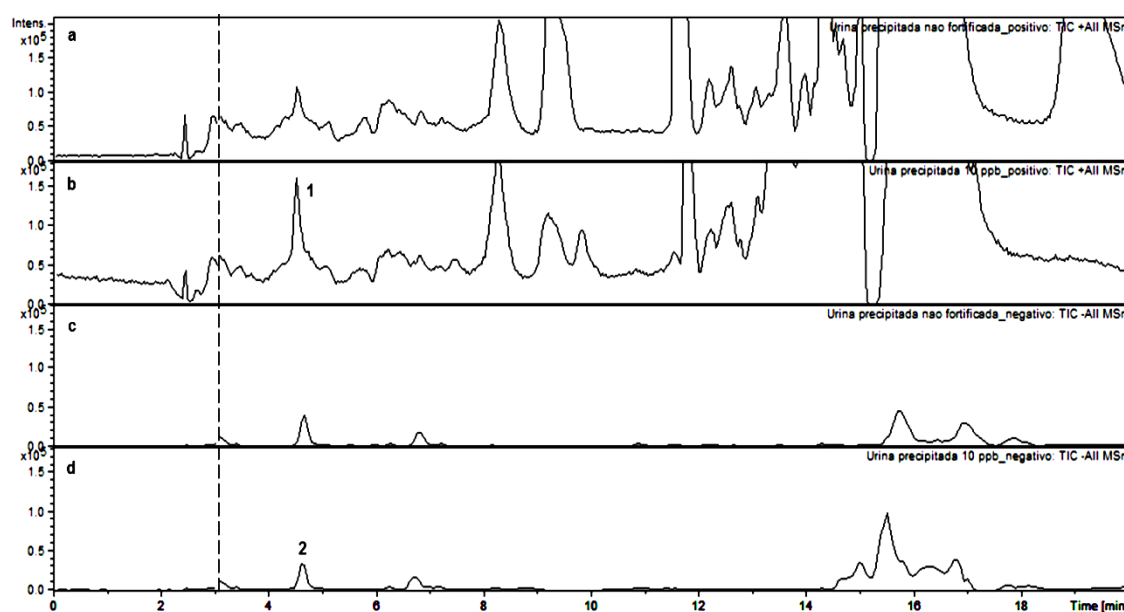


Figura 5.20a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva (a e b) e negativa (c e d) de amostras de urina acidificadas, uma delas fortificada com 1 µg da CYN. Os espectros dos picos cromatográficos numerados encontram-se na figura 5.20b.

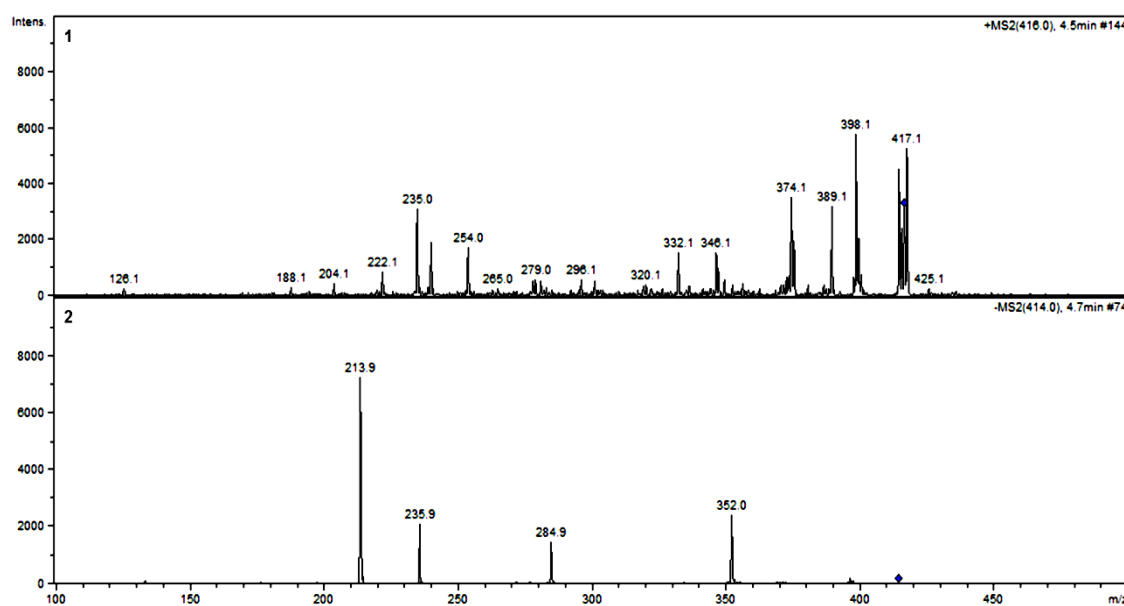


Figura 5.20b. Espectros MS² com polaridade positiva (1) e negativa (2) dos picos numerados.

Com esta experiência também não se identificou a CYN, visto que os espectros obtidos não se associam aos dos padrões em modo positivo (figura 5.6.) e em modo negativo (figura 5.7.). Este resultado indica que o tratamento efetuado à urina não surte efeito, continuando a verificar-se uma supressão de sinal da CYN, se bem que o ruído da linha de base diminui, resultante do menor número de interferentes.

Ainda se efetuou um teste variando o pH da solução, pois poderia ocorrer a hipótese da CYN não estar estável ao valor de pH convencional da urina (cerca de 5,28). Nesse caso foram preparadas duas amostras de 5 mL de urina não precipitada, uma acidificada com 0,05% de ácido acético como normalmente (ficando com um valor de pH de 5,12), e outra adicionando-se ácido acético até atingir um valor de pH de 3,68, semelhante ao verificado para as amostras reais de água natural acidificadas. Ambas as amostras foram fortificadas com a CYN com a concentração de 1 µg/L, extraídas, filtradas e analisadas por HPLC/MS² (a concentração final da CYN nos extratos foi de 10 µg/L). Pelos cromatogramas presentes em anexo (figura 8.32.) constatou-se que a resposta ao sinal obtido é semelhante, para além de se continuar a não verificar sinal da CYN para qualquer valor de pH considerado. Significa que a acidez da amostra não foi determinante nos resultados anteriores.

Optou-se por analisar diretamente no espectrómetro de massa em modo *full scan* algumas soluções de urina tanto na forma precipitada como natural, diluídas duas vezes com água Milli-Q, filtradas e fortificadas com a STX e a CYN com a concentração final de 500 µg/L para verificar a intensidade do sinal do ião-parental das cianotoxinas. Registaram-se espectros com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas (figura 5.21.) e com polaridade negativa somente para a CYN (figura 5.22.).

Em nenhuma situação se verificou sinal do ião-parental de qualquer cianotoxina, ocorrendo supressão total de ambas. Outras soluções à base de urina não precipitada foram também analisadas variando-se o agente ionizante e a sua concentração, mas em nada alterou a conclusão inferida anteriormente (figuras 8.33. a 8.35. em anexo).

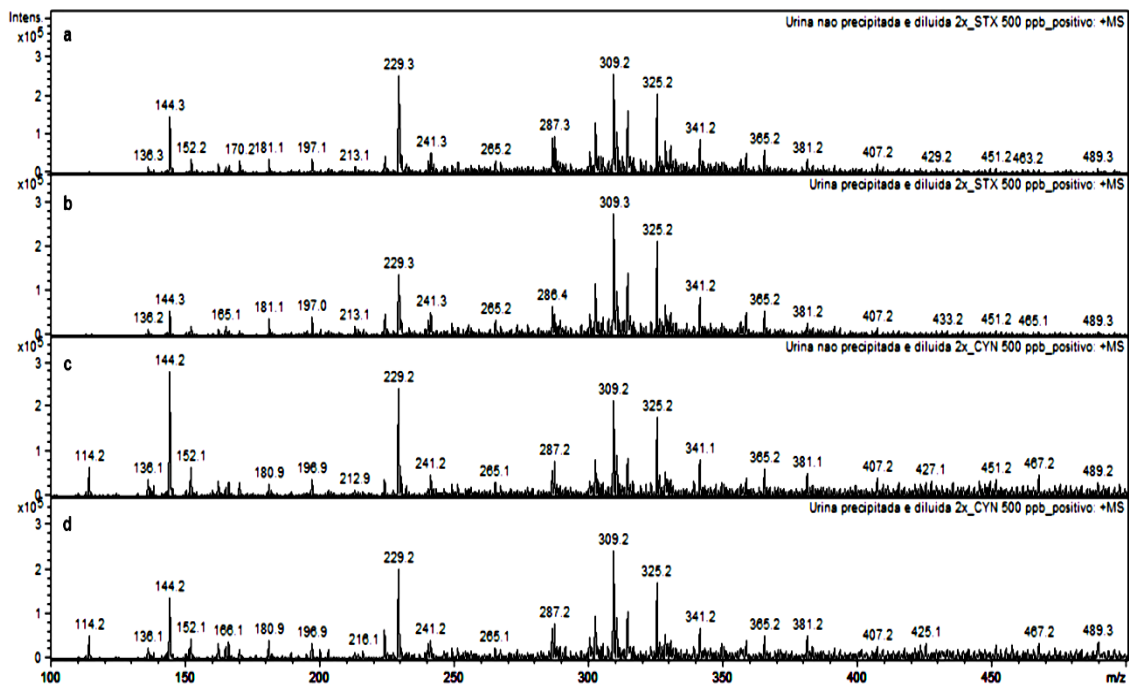


Figura 5.21. Espectros *full scan* com polaridade positiva de soluções diluídas de urina tanto precipitada como natural, filtradas e fortificadas com ambas as cianotoxinas com a concentração de 500 µg/L. Os espectros **a** e **b** dizem respeito à STX, enquanto os espectros **c** e **d** são referentes à CYN.

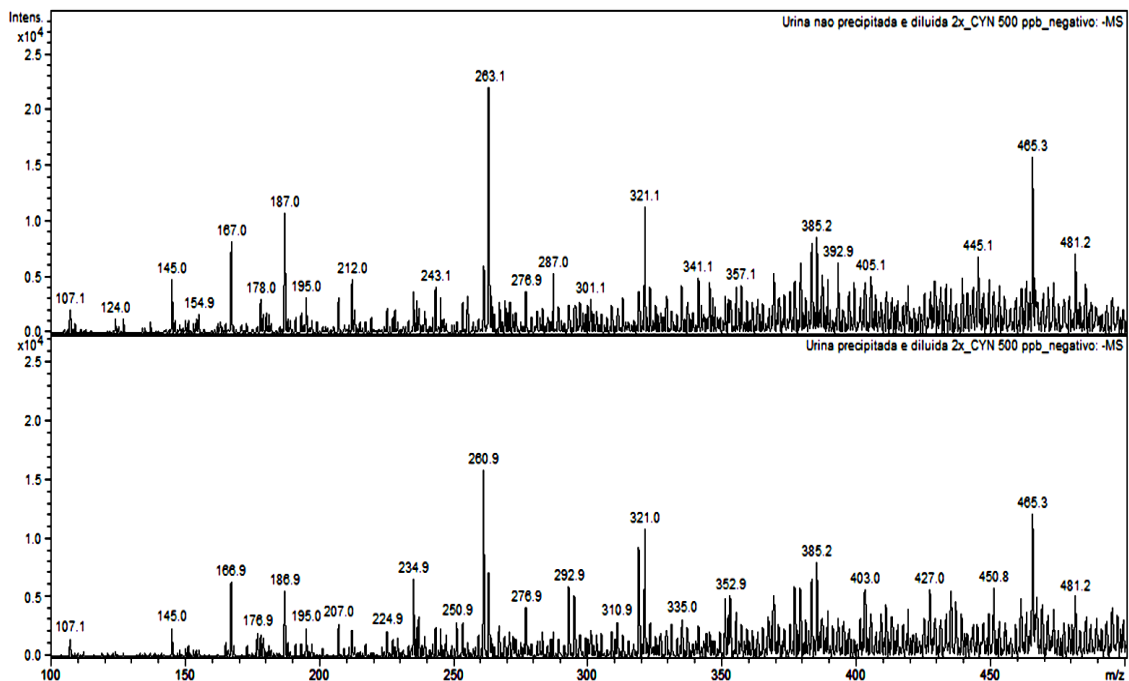


Figura 5.22. Espectros *full scan* com polaridade negativa de soluções diluídas de urina tanto precipitada como natural, filtradas e fortificadas com ambas as cianotoxinas com a concentração de 500 µg/L. Os dois espectros são relativos apenas à CYN.

Todo este conjunto de resultados indica claramente que a urina influencia o sinal das cianotoxinas, suprimindo-o independentemente do estado (natural ou precipitado), agente ionizante (ácido acético, ácido fórmico ou acetato de amônio) e sua concentração. Assim sendo, preparou-se uma sucessão de diluições de urina não precipitada (1:50, 1:25, 1:10, 1:5, 1:2) em água Milli-Q, cada uma acidificada com 0,05% de ácido acético, filtrada e fortificada com a CYN com a concentração de 50 µg/L, para testar se o sinal da cianotoxina diminui com o aumento da quantidade de urina. Estas soluções foram analisadas por HPLC/MS² em modo TIC na polaridade negativa conjuntamente com uma solução padrão de 50 µg/L da CYN em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético (figura 5.23.).

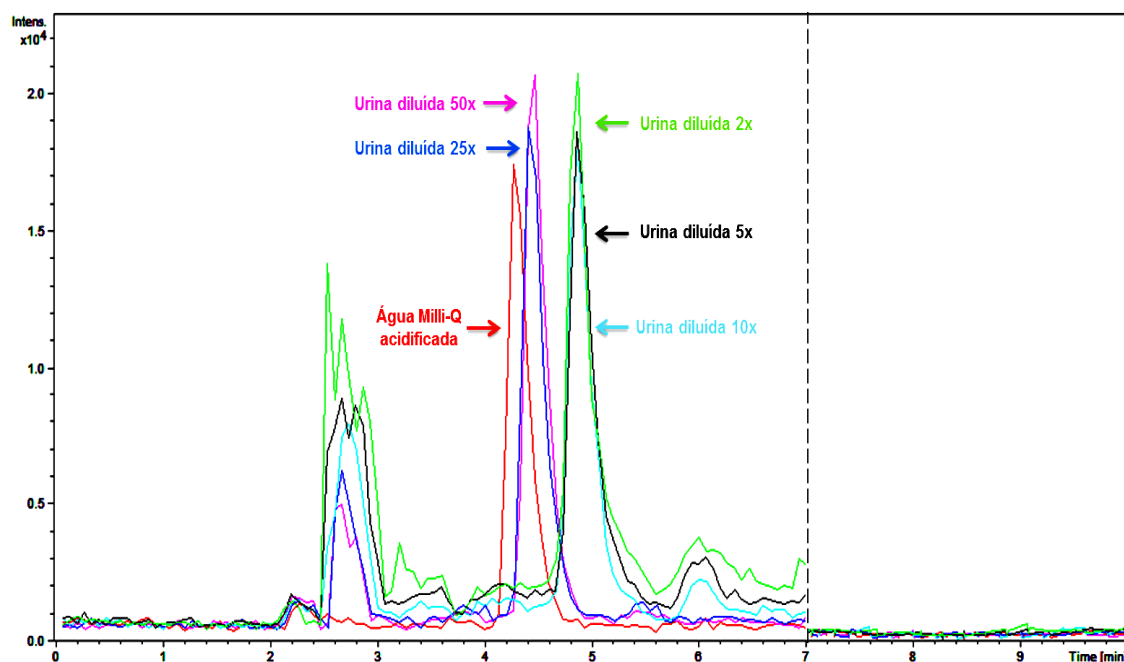


Figura 5.23. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa de um ensaio de diluições de urina não precipitada, acidificada, filtrada e fortificada com 50 µg da CYN.

Constatou-se que para qualquer fator de diluição considerado obteve-se sempre sinal da CYN. Além disso, o ruído da linha de base foi aumentando quanto maior a quantidade de urina, o que seria expectável devido a um maior número de interferentes envolvidos. Tendo em conta este resultado realizou-se um outro conjunto de extrações envolvendo urina diluída num fator de 1:10 para averiguar se os extratos obtidos também apresentam sinal. Os extratos, com a concentração final da CYN de 50 µg/L, foram analisados por HPLC/MS² na polaridade positiva, registando-se os dados da tabela 5.8. (na figura 8.36. em anexo encontram-se os cromatogramas obtidos).

Tabela 5.8. Ensaio de eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de urina não precipitada, diluídas dez vezes e fortificadas com 5 µg da CYN.

	Urina (50 µg/L)		
	Área	TR (min)	Eficiência de recuperação (%)
Replicado 1	427.590	4,90	27,8
Replicado 2	508.549	5,00	33,1
Replicado 3	453.918	4,90	29,6
Média	463.352,3	4,93	30,2
DP	41.295,9	0,1	2,7
CV (%)	9,0	1,2	9,0
Padrão	1.535.802	5,20	---

TR – Tempo de retenção; DP – Desvio-padrão; CV – Coeficiente de variação

De facto comprovou-se os resultados do ensaio das diluições, pois obteve-se sinal da CYN nos extratos em urina diluída dez vezes. No entanto, o sinal foi baixo relativamente ao padrão, tendo-se recuperado apenas $30,2 \pm 9,0\%$ da cianotoxina. Portanto, apesar do método de SPE “DCM-MeOH B” não ser eficiente na extração da CYN em urina diluída, revela ainda assim precisão com um erro relativo inferior a 10%.

5.4. ESTUDO COMPLEMENTAR COM OUTRAS CIANOTOXINAS

5.4.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Adicionalmente aos objetivos do projeto foi feito um estudo complementar com um outro grupo de cianotoxinas designadas por microcistinas (MCT). As MCT são produzidas por algumas espécies de cianobactérias, nomeadamente a *Anabaena*, a *Microcystis* e a *Planktothrix*, e são consideradas como hepatotoxinas, pois exercem a sua ação somente nas células do fígado, inibindo as fosfatases proteicas. As múltiplas combinações dos aminoácidos presentes na sua constituição já resultaram na identificação de cerca de 90 variantes deste género de cianotoxinas com pesos moleculares entre 900 a 1.100 g/mol, sendo as MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR as mais comuns. A sua importância para o presente estudo resultou da sua distribuição quase cosmopolita nos sistemas aquáticos, inclusive em Portugal, sendo responsável pela maioria das intoxicações humanas relatadas até ao momento (Campos *and* Vasconcelos, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013).

Uma solução de 50 µg/L com a CYN e as variantes MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR em água Milli-Q com 0,05% de ácido acético foi preparada a partir dos padrões certificados adquiridos e analisada por HPLC/MS², com o intuito de avaliar o sinal

obtido pelas cianotoxinas em modo negativo, por ser mais específico e sensível na análise das MCT, segundo Rodrigues *et al.*, 2013. Para as soluções contendo MCT recorreu-se à análise com a função MRM dada a semelhança da estrutura molecular entre as variantes, o que se traduz especificamente na co-eluição das variantes MCT-LR e MCT-YR com tempos de retenção bastante próximos. Com esta função foram analisados e fragmentados paralelamente diferentes iões-moleculares correspondentes às diferentes espécies das cianotoxinas. Os parâmetros utilizados para analisar as MCT estão descritos na tabela 4.3.

Para a análise do padrão de 50 µg/L criaram-se dois segmentos distintos, um desde o instante inicial até aos 7 minutos com os parâmetros de deteção da CYN (tabela 4.2.), e outro desde esse período até ao final da corrida cromatográfica com os parâmetros de deteção das MCT. Na figura 5.24. está representado o cromatograma obtido em modo TIC com as áreas e os tempos de retenção das cianotoxinas e na figura 5.25. os espetros MS² respetivos.

Com este novo método os dois grupos de cianotoxinas são claramente separados pela coluna cromatográfica, eluindo a CYN aos 5,30 minutos e as variantes MCT-RR, MCT-YR e MCT-LR ao fim de 15,20, 16,00 e 16,40 minutos, respetivamente. Estas duas últimas variantes praticamente co-eluem, daí a utilidade da função MRM para o cálculo das áreas dos picos correspondentes.

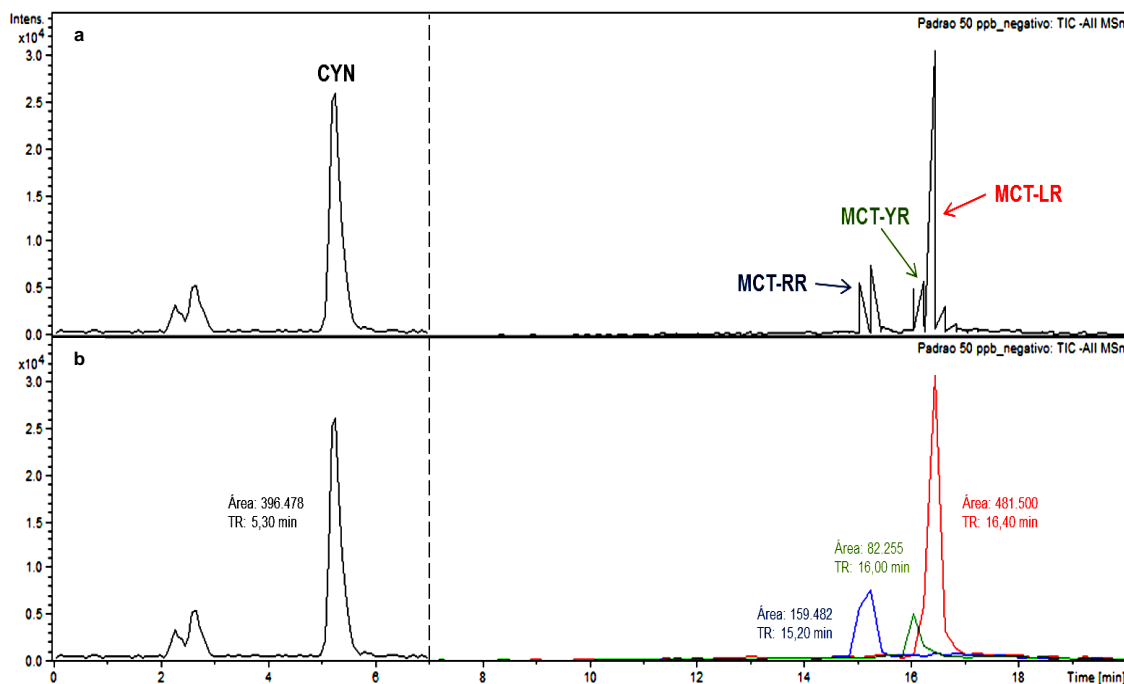


Figura 5.24. Cromatograma em modo TIC da CYN e das três variantes das MCT com polaridade negativa (a) com a determinação das áreas e dos tempos de retenção respetivos (b).

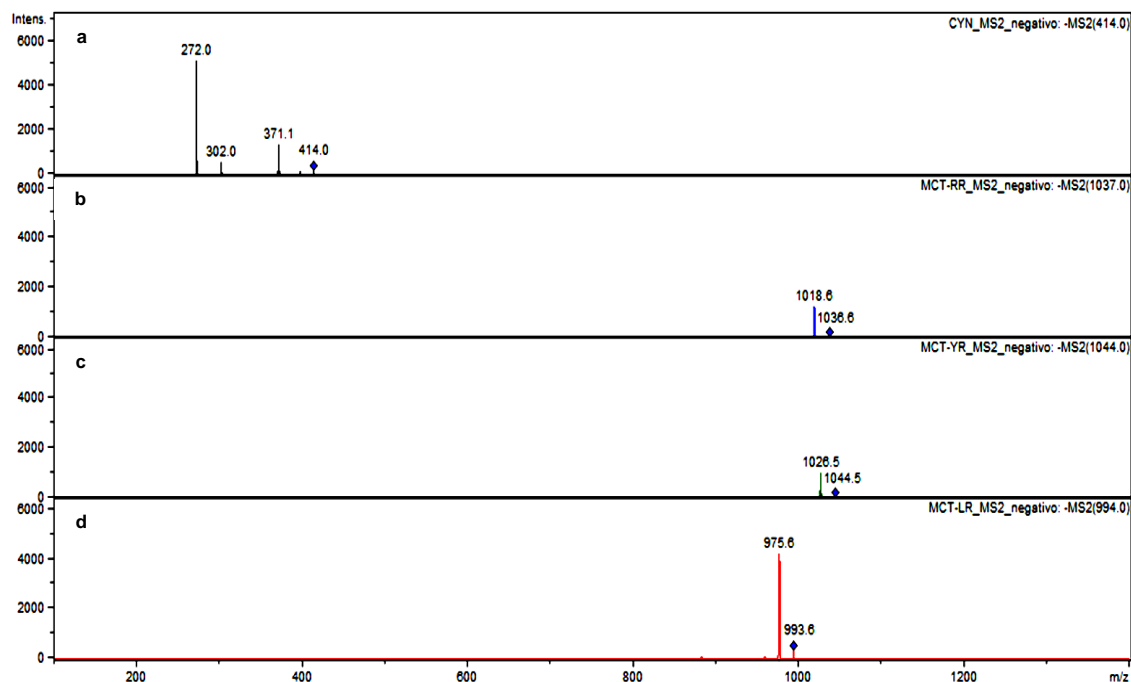


Figura 5.25. Espectros MS² característicos da CYN (a) e das três variantes das MCT (b, c e d) com polaridade negativa.

5.4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

Implementado o sistema analítico para a análise da CYN e das três variantes das MCT em modo negativo, avaliou-se a eficiência e a precisão do método de SPE “DCM-MeOH B” em extrair estas cianotoxinas tanto em água pura como em água natural filtrada não contaminada. Com esse propósito prepararam-se algumas amostras de 100 mL nas duas matrizes, acidificadas com 0,05% de ácido acético e fortificadas com as cianotoxinas com a concentração de 0,25 µg/L. Depois de ressolubilizados a concentração das cianotoxinas nos extratos foi de 50 µg/L. Após análise por HPLC/MS² obtiveram-se os cromatogramas em modo MS² com polaridade negativa presentes nas figuras 5.26. e 5.27. relativos aos extratos em água pura e em água natural, respetivamente. Os cromatogramas em modo TIC afiguram-se em anexo (figuras 8.22. e 8.28.).

Apenas a CYN foi extraída em água pura com uma percentagem de recuperação de $70,3 \pm 3,2\%$, o que demonstra a eficiência e a precisão do método de SPE para esta cianotoxina. Para as variantes das MCT não se verificou sinal nesta matriz, resultado contraditório ao de Rodrigues *et al.*, 2013, que obtiveram recuperações entre 64,2 a 82,7% com um erro relativo entre 1,6 a 4,5% usando um método diferente. No outro ensaio foi possível extrair ambos os grupos de cianotoxinas na água natural, obtendo-se as eficiências de recuperação da tabela 5.9.

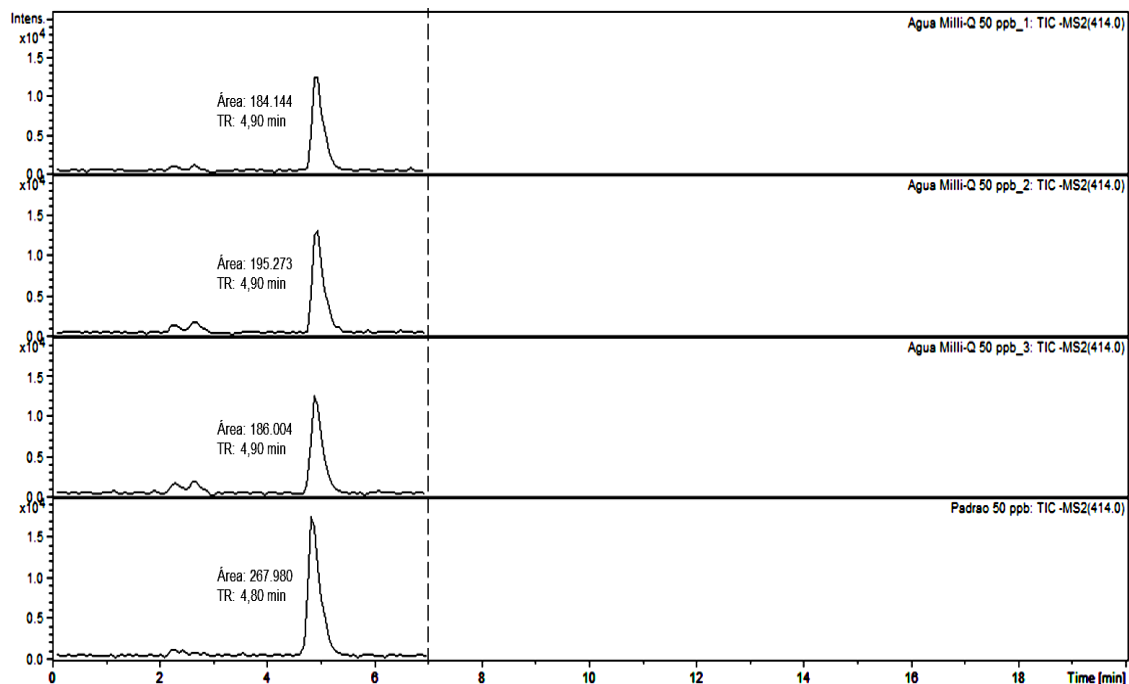


Figura 5.26. Cromatogramas em modo MS² com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR.

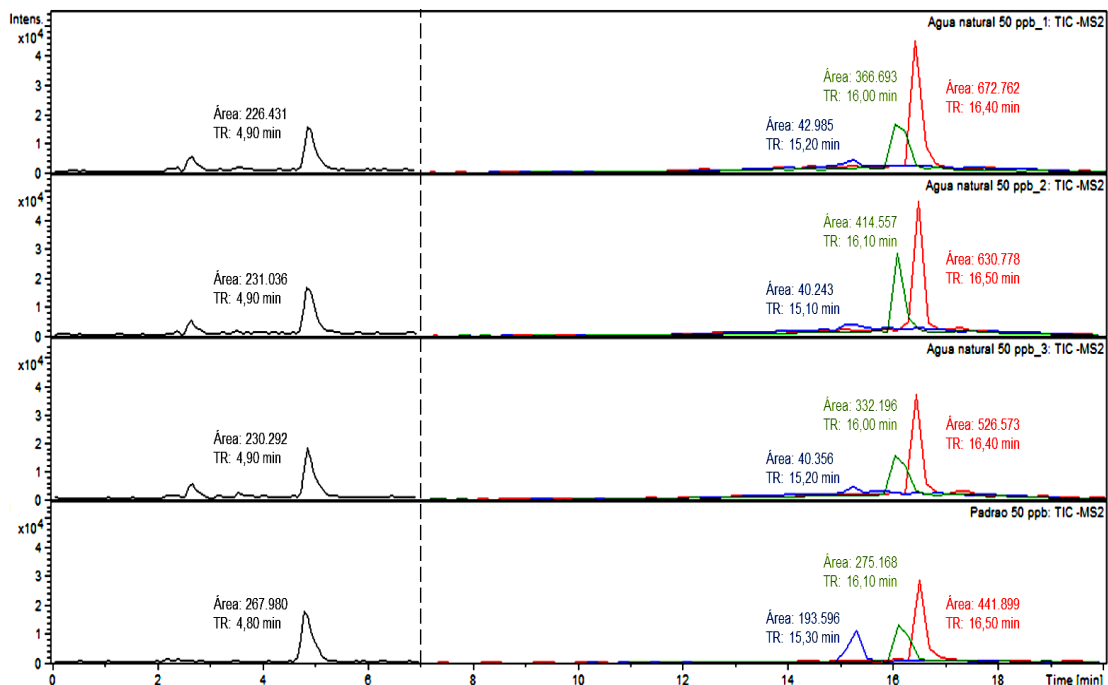


Figura 5.27. Cromatogramas em modo MS² com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR.

Tabela 5.9. Eficiências de recuperação das cianotoxinas em água natural.

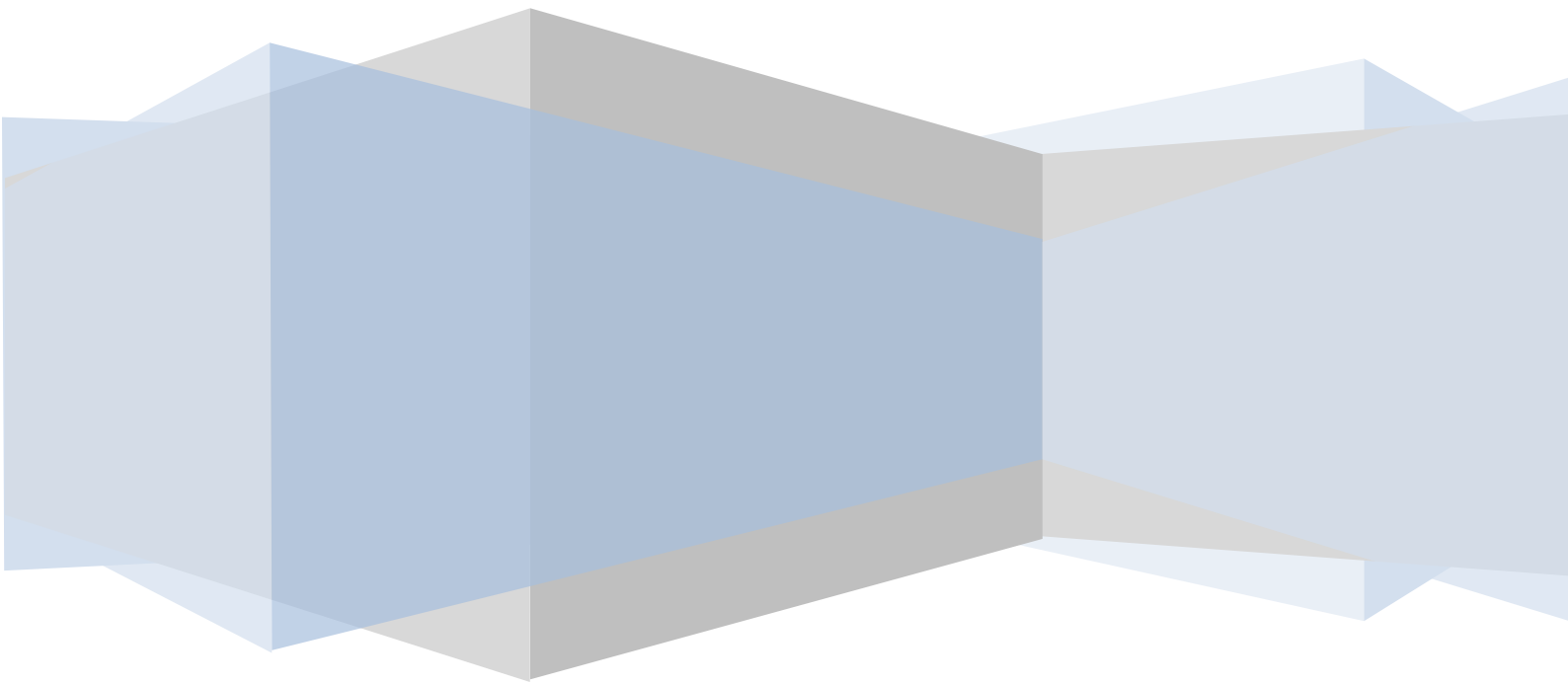
	Tempo médio de retenção (min)	Eficiência de recuperação (%)	RSD (%)
CYN	4,90	85,6	1,1
MCT-RR	15,17	21,3	3,8
MCT-YR	16,03	134,9	11,2
MCT-LR	16,43	138,0	12,4

Significa que das quatro cianotoxinas testadas o método de SPE adotado apenas é eficiente e preciso na extração da CYN em água natural, com valores de recuperação acima dos 70% e o erro associado inferior a 10% (Ribani *et al.*, 2004). Quanto às MCT, embora seja preciso, o método não é eficiente em extrair a MCT-RR, dada a quantidade diminuta recuperada da cianotoxina. Para as restantes variantes verifica-se o oposto, pois o método é bastante eficiente, com um sinal instrumental excessivamente elevado, mas pouco preciso.

Em suma, o método analítico implementado apresenta potencialidade para extrair, separar e detetar a CYN e as MCT, mas deveria ser otimizado a nível dos ensaios de extração e da aquisição do sinal experimental.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas futuras



6.1. CONCLUSÕES

Neste projeto foi otimizado um método analítico de HPLC/MS² *ion trap* para separar e detetar a STX e a CYN na polaridade positiva, com os iões de fragmentação 204, 221, 266 e 282 *m/z* para a primeira cianotoxina, e os iões 176, 194, 274, 318 e 336 *m/z* para a segunda cianotoxina, e apenas a CYN na polaridade negativa, com os iões-filho 272, 302 e 371 *m/z*. O método revelou especificidade e precisão tanto em água pura como em água natural, e exatidão apenas para a CYN em água natural.

Na polaridade positiva obtiveram-se LQ instrumentais para a STX de 5,9 µg/L obtido a partir da curva de calibração e de 1,5 µg/L estipulado através da razão sinal-ruído, enquanto para a CYN os LQ obtidos foram de 12,9 e de 2,4 µg/L, respetivamente. Relativamente ao modo negativo atingiram-se LQ instrumentais de 8,5 e de 2,8 µg/L para a CYN. Todos estes valores obtidos em água natural encontram-se acima do limite de 1 µg/L recomendado pela OMS considerado aceitável para a água potável (WHO, 1998).

Implementou-se um método de SPE para a extração da CYN no cartucho *Chromabond Easy* (3 mL/200 mg), sendo eficiente e preciso para concentrações distintas desta cianotoxina em água natural, com eficiências de recuperação de 89,4 ± 7,3% para as concentrações mais altas e de 70,2 ± 2,8% para as concentrações mais baixas na polaridade positiva. O LQ obtido de 0,036 µg/L é bastante inferior ao valor recomendado pela OMS.

Todo este procedimento analítico foi aplicado para a análise de amostras reais de água natural colhidas em maio de 2013 em diversas localidades da barragem do Alqueva, nomeadamente Senhora da Ajuda, Álamos, Lucefécit e Mourão, com o intuito de avaliar a ocorrência da CYN. As amostras não apresentaram sinal para esta cianotoxina.

A urina, quer seja natural ou precipitada, suprimiu totalmente o sinal das cianotoxinas independentemente do agente ionizante utilizado, da sua concentração e da acidez da amostra. Apenas verificou-se sinal num ensaio de extrações em amostras de urina diluída, obtendo-se eficiências de recuperação de cerca de 30,2 ± 9,0%, sendo o método pouco eficiente, embora preciso.

Implementou-se ainda um método analítico para a separação e deteção da CYN e de algumas variantes das MCT na polaridade negativa. Em água pura verificou-se sinal apenas da CYN, enquanto todas as cianotoxinas foram extraídas em água natural. No entanto, as eficiências de recuperação em água natural diferiram bastante entre as variantes das MCT, sendo baixas para a MCT-RR (21,3 ± 3,8%) e excessivamente elevadas para as MCT-YR (134,9 ± 11,2%) e MCT-LR (138,0 ±

12,4%), o que sugere interferência de matriz ou erro no processo analítico que carece ser futuramente estudado para avaliação comparativa.

6.2. PERSPETIVAS FUTURAS

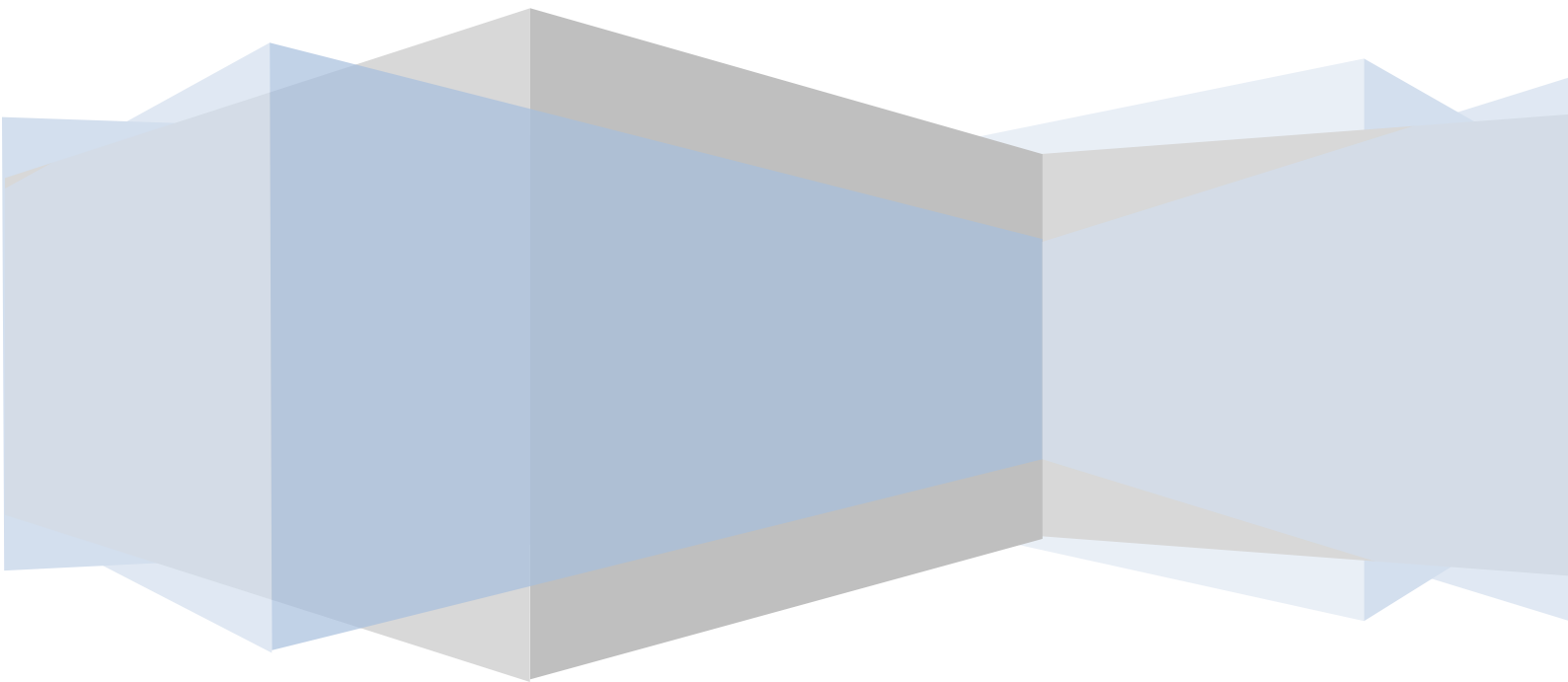
Deveriam ser testados cartuchos com adsorventes de troca catiónica para avaliar a eficiência de extração da STX com o método de SPE implementado, uma vez que para outras classes de fases estacionárias não surtiu efeito.

No que respeita à urina, deveria ser realizado um novo ensaio de extrações para testar os resultados obtidos em urina diluída. Além disso, seria interessante examinar de que forma esta matriz suprime o sinal das cianotoxinas. A partir deste estudo poder-se-ia analisar *a posteriori* amostras reais provenientes de vitimados por intoxicação.

Quanto ao estudo das MCT, o método analítico implementado deveria ser otimizado a nível dos ensaios de extração e da aquisição do sinal experimental.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas



- Acres, J., Gray, J., 1978. Paralytic shellfish poisoning. Canadian Medical Association journal 119, 1195-1197.
- Agilent Technologies (2015a) Solid Phase Extraction (SPE) – Bond Elut Carbon and Carbon/NH₂. <http://www.agilent.com/en-us/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/solid-phase-extraction-%28spe%29/bond-elut-carbon-carbon-nh2> [Acedida em: 05/08/15 10:02].
- Agilent Technologies (2015b) Solid Phase Extraction (SPE) – Bond Elut ENV. <http://www.agilent.com/en-us/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/solid-phase-extraction-%28spe%29/bond-elut-env> [Acedida em: 05/08/15 9:35].
- Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J.-P., Dogliotti, E., Domenico, A., Fernández-Cruz, M.L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Galli, C., Grandjean, P., Gzyl, J., Heinemeyer, G., Johansson, N., Mutti, A., Schlatter, J., Van Leeuwen, R., Van Peteghem, C., Verger, P., 2009. Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2006-065E) Adopted on 25 March 2009. The EFSA Journal 1019, 1-76.
- Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., Nogueira, J.M.F., 2004. Novas Perspectivas na Preparação de Amostras para Análise Cromatográfica. Química (Boletim da Sociedade Portuguesa de Química) 95, 67-77.
- Altmann Analytik (2015) GracePure SPE C18-Aq 2000mg/12mL 30/PAK. <http://www.analytics-shop.com/gb/5141482-gb.html> [Acedida em: 05/08/15 9:53].
- Anderson, P.D., 2012. Bioterrorism: toxins as weapons. Journal of pharmacy practice 25, 121-129.
- Bakke, M.J., Horsberg, T.E., 2010. Kinetic properties of saxitoxin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP 152, 444-450.
- Bakke, M.J., Hustoft, H.K., Horsberg, T.E., 2010. Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behaviour and monoaminergic turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic toxicology 99, 1-9.
- Bláhová, L., Oravec, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., Šimek, Z., Bláha, L., 2009. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology 53, 519-524.
- Bownik, A., 2010. Harmful algae: effects of alkaloid cyanotoxins on animal and human health. Toxin Reviews 29, 99-114.
- Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J., 2009. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. Environmental toxicology 24, 415-420.
- Bruker Daltonics, 2006. Enabling Life Science Tools Based on Mass Spectrometry, in: GmbH, B.D. (Ed.).
- Camel, V., 2003. Solid phase extraction of trace elements. Spectrochimica Acta Part B 58, 1177-1233.
- Campbell, K., Rawn, D.F., Niedzwiedek, B., Elliott, C.T., 2011. Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 28, 711-725.
- Campos, A., Araújo, P., Pinheiro, C., Azevedo, J., Osório, H., Vasconcelos, V., 2013. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. Ecotoxicology and environmental safety 94, 45-53.
- Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. International journal of molecular sciences 11, 268-287.
- Carneiro, R.L., Pacheco, A.B., de Oliveira e Azevedo, S.M., 2013. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. Marine drugs 11, 2949-2963.
- Cassiano, N.M., Barreiro, J.C., Martins, L.R.R., Oliveira, R.V., Cass, Q.B., 2009. Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. Química Nova 32, 1021-1030.
- Cech, N.B., Enke, C.G., 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass spectrometry reviews 20, 362-387.

- Chasin, A.A.M., Nascimento, E.S., Ribeiro-Neto, L.M., de Siqueira, M.E.P.B., Andraus, M.H., Salvadori, M.C., de Fernícola, N.A.G., Gorni, R., Salcedo, S., 1998. Method validation in toxicological analysis: a general approach. *Revista Brasileira de Toxicologia* 11, 1-6.
- Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1-15.
- Cusick, K.D., Saylor, G.S., 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine drugs* 11, 991-1018.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3 ed.
- Degani, A.L.G., Cass, Q.B., Vieira, P.C., 1998. *Cromatografia: um breve ensaio*. *Química Nova na Escola* 7, 21-25.
- Dell'Aversano, C., Eaglesham, G.K., Quilliam, M.A., 2004. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* 1028, 155-164.
- Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., Duarte, J.A., Remião, F., Marques, A., Santos, A., Magalhães, T., 2010. Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicol Mech Methods* 20, 363-414.
- Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS microbiology reviews* 37, 23-43.
- Dörr, F.A., Tomaz, J.C., Lopes, N.P., Pinto, E., 2008. Comparative analysis of the gas-phase reactions of cylindrospermopsin and the difference in the alkali metal cation mobility. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* 22, 2015-2020.
- Etheridge, S.M., 2010. Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 56, 108-122.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International journal of environmental research and public health* 2, 43-50.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental toxicology* 21, 299-304.
- Fang, X., Fan, X., Tang, Y., Chen, J., Lu, J., 2004. Liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish. *Journal of Chromatography A* 1036, 233-237.
- Fitzgerald, D.J., Cunliffe, D.A., Burch, M.D., 1999. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environmental toxicology* 14, 203-209.
- Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F., 2007. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of chromatography. A* 1152, 14-31.
- Foss, A.J., Aubel, M.T., 2013. The extraction and analysis of cylindrospermopsin from human serum and urine. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 70, 54-61.
- García, C., Barriga, A., Díaz, J.C., Lagos, M., Lagos, N., 2010. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 55, 135-144.
- García, C., del Carmen Bravo, M., Lagos, M., Lagos, N., 2004. Paralytic shellfish poisoning: *post-mortem* analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 43, 149-158.
- Gessner, B.D., Bell, P., Doucette, G.J., Moczydlowski, E., Poli, M.A., Van Dolah, F., Hall, S., 1997. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 35, 711-722.
- Gkelis, S., Zaoutsos, N., 2014. Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: a multi-disciplinary approach. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 78, 1-9.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Cameán, A.M., 2013. Influence of the exposure way and the time of sacrifice on the effects induced by a single dose of pure Cylindrospermopsin on the activity and transcription of glutathione peroxidase and

- glutathione-S-transferase enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 90, 986-992.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto, A.I., Vasconcelos, V.M., Cameán, A.M., 2013. Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 90, 1184-1194.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto Ortega, A.I., Moreno, I., González, G., Soria-Díaz, M.E., Vasconcelos, V., Cameán, A.M., 2012. Development and optimization of a method for the determination of Cylindrospermopsin from strains of *Aphanizomenon* cultures: intra-laboratory assessment of its accuracy by using validation standards. *Talanta* 100, 356-363.
- Halme, M., Rapinoja, M.L., Karjalainen, M., Vanninen, P., 2012. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 880, 50-57.
- Harris, D.C., 2005. Análise química quantitativa. LTC.
- Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., Luckas, B., 2007. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42, 1238-1250.
- Hoff-Risseti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D., Pinto, E., Werner, V.R., Fiore, M.F., 2013. Cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PloS one* 8, e74238.
- Humpage, A.R., Magalhães, V.F., Froscio, S.M., 2010. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397, 1655-1671.
- Indrasena, W.M., Gill, T.A., 2000. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins. *Food chemistry* 71, 71-77.
- Ingendoh, A., Schubert, M., Jertz, R., Baykut, G., Speir, P., Kruppa, G., 1997. Performance and Limitations of Quadrupolar and FTICR Ion Traps. *J mass spectrom* 45, 247-264.
- Johnson, R.C., Zhou, Y., Statler, K., Thomas, J., Cox, F., Hall, S., Barr, J.R., 2009. Quantification of saxitoxin and neosaxitoxin in human urine utilizing isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology* 33, 8-14.
- Jung, J.-M., Lee, Y.-J., Park, H.-K., Jung, E.-Y., Joo, G.-J., 2003. The Analysis of Cyanobacterial Neurotoxins by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Algae* 18, 233-238.
- Kaplan, D., Brekenfeld, A., Hartmer, R., Ledertheil, T., Gebhardt, C., Schubert, M., 2008. Technical Note # TN-24: Extending the Capacity in Modern Spherical High Capacity Ion Traps (HCT). Bruker Daltonics.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology* 74, 4044-4053.
- Kinnear, S., 2010. Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Marine drugs* 8, 542-564.
- Klitzke, S., Fastner, J., 2012. Cylindrospermopsin degradation in sediments – the role of temperature, redox conditions, and dissolved organic carbon. *Water research* 46, 1549-1555.
- Kokociński, M., Mankiewicz-Boczek, J., Jurczak, T., Spoof, L., Meriluoto, J., Rejmonczyk, E., Hautala, H., Vehniäinen, M., Pawelczyk, J., Soininen, J., 2013. *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environmental science and pollution research international* 20, 5243-5264.
- Kwong, R.W., Wang, W.X., Lam, P.K., Yu, P.K., 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquatic toxicology* 80, 82-91.
- Lake Improvement Association (2014) How Indiana Tests For Algal Blooms. <http://indianapublicmedia.org/news/indiana-test-algal-blooms-70413/> [Acedida em 17/10/14 14:25].
- Lamond Laboratory (2014) Electrospray Ionisation – How do we ionise peptides in LC-MS? <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php> [Acedida em: 08/11/14 16:48].

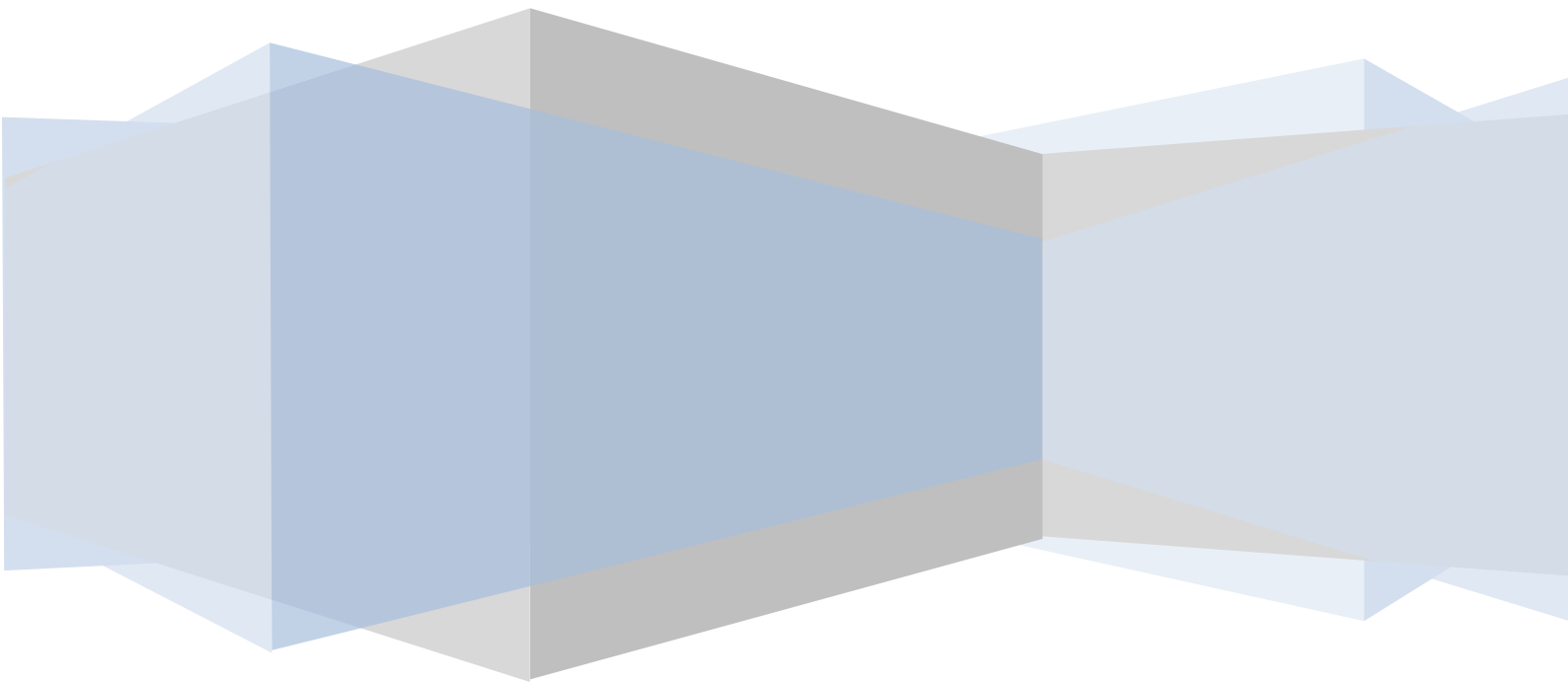
- Liu, D.Q., Xia, Y.-Q., Bakhtiar, R., 2002. Rapid Communications in Mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 1330-1336.
- Llewellyn, L.E., Dodd, M.J., Robertson, A., Ericson, G., de Koning, C., Negri, A.P., 2002. *Post-mortem* analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 40, 1463-1469.
- Lucci, P., Pacetti, D., Núñez, O., Frega, N.G., 2012. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, in: Calderon, L.d.A. (Ed.), *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. InTech, pp. 127-164.
- Macherey-Nagel (2015a) CHROMABOND® C18 ec / C18 ec f (f = fast flow). <http://www.mn-net.com/SPEStart/SPEphases/SPERPphases/CHROMABOND C18ec C18ecf/tabid/4521/language/en-US/Default.aspx> [Acedida em: 05/08/15 9:41].
- Macherey-Nagel (2015b) CHROMABOND® Easy. <http://www.mn-net.com/SPEStart/SPEphases/SPERPphases/CHROMABONDEasy/tabid/4400/language/en-US/Default.aspx> [Acedida em: 05/08/15 9:47].
- March, R.E., 1997. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J mass spectrom* 32, 351-369.
- Marquet, P., Lachâtre, G., 1999. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 733, 93-118.
- Martins, R., Pereira, P., Welker, M., Fastner, J., Vasconcelos, V.M., 2005. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 46, 454-464.
- Maurer, H.H., 2006. Hyphenated mass spectrometric techniques – indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. *J Mass Spectrom* 41, 1399-1413.
- McGregor, G.B., Sendall, B.C., Hunt, L.T., Eaglesham, G.K., 2011. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). *Harmful Algae* 10, 402-410.
- Merel, S., Clément, M., Mourot, A., Fessard, V., Thomas, O., 2010. Characterization of cylindrospermopsin chlorination. *The Science of the total environment* 408, 3433-3442.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international* 59, 303-327.
- Meyer, V.R., 2004. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4 ed.
- Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A., Vasconcelos, V., 2013. Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *Journal of applied microbiology* 114, 605-620.
- Moreira, C., Martins, A., Azevedo, J., Freitas, M., Regueiras, A., Vale, M., Antunes, A., Vasconcelos, V., 2011. Application of real-time PCR in the assessment of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* abundance and toxicological potential. *Applied microbiology and biotechnology* 92, 189-197.
- Msagati, T.A., Siame, B.A., Shushu, D.D., 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic toxicology* 78, 382-397.
- Munday, R., Reeve, J., 2013. Risk assessment of shellfish toxins. *Toxins* 5, 2109-2137.
- Murray, S.A., Mihali, T.K., Neilan, B.A., 2011. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Molecular biology and evolution* 28, 1173-1182.
- Nováková, L., 2013. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of chromatography. A* 1292, 25-37.
- Nováková, L., Vičková, H., 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica chimica acta* 656, 8-35.
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C.P., Lucci, P., Busquets, R., 2013. State-of-the-art in fast liquid chromatography-mass spectrometry for bio-analytical applications. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 927, 3-21.
- Paredes, I., Rietjens, I.M., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2011. Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 58, 336-354.

- Pearson Education (2014) Gated channel proteins. <http://pixgood.com/gated-channel-proteins.html> [Acedida em: 22/10/14 10:11].
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine drugs* 8, 1650-1680.
- Peters, F.T., 2011. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clinical biochemistry* 44, 54-65.
- Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M.J., Font, G., 2007. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of biochemical and biophysical methods* 70, 117-131.
- Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S., Vasconcelos, V., 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia* 705, 27-42.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A., 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150, 455-461.
- Poniedziałek, B., Rzymiski, P., Kokociński, M., 2012. Cylindrospermopsin: water-linked potential threat to human health in Europe. *Environmental toxicology and pharmacology* 34, 651-660.
- Poole, C.F., 2003. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 362-373.
- Pucci, M. (2014) Blue-green algae – check the water before you swim. <http://www.eea.europa.eu/highlights/blue-green-algae-check-the> [Acedida em: 17/10/14 14:17].
- Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkoma, K., Lahti, K., Hoppu, K., Lepistö, L., 2005. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environmental toxicology* 20, 331-340.
- RELACRE, 2013. Guia RELACRE 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química, Fevereiro 2000 ed.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova* 27, 771-780.
- Rodrigues, M.A., Reis, M.P., Mateus, M.C., 2013. Liquid chromatography/negative electrospray ionization ion trap MS² mass spectrometry application for the determination of microcystins occurrence in Southern Portugal water reservoirs. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 74, 8-18.
- Rouessac, F., Rouessac, A., 2007. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, 2 ed.
- Runnegar, M.T., Xie, C., Snider, B.B., Wallace, G.A., Weinreb, S.M., Kuhlenkamp, J., 2002. *In Vitro* Hepatotoxicity of the Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin and Related Synthetic Analogues. *Toxicological Sciences* 67, 81-87.
- Saker, M.L., Nogueira, I.C., Vasconcelos, V.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G.K., Pereira, P., 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and environmental safety* 55, 243-250.
- Scott, R.P.W., 2003. *Principles and Practice of Chromatography*, 1 ed. Chrom-Ed Series.
- Seger, C., 2012. Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wiener medizinische Wochenschrift* 162, 499-504.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V., 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280, 5-20.
- Sobel, J., Painter, J., 2005. Illnesses caused by marine toxins. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41, 1290-1296.
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A., Vásquez, M., 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 56, 1350-1361.
- Štraser, A., Filipič, M., Gorenc, I., Žegura, B., 2013. The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells. *Chemosphere* 92, 24-30.

- Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B., 2011. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Archives of toxicology* 85, 1617-1626.
- Tian, L., Cheng, J., Chen, X., Cheng, S.H., Mak, Y.L., Lam, P.K., Chan, L.L., Wang, M., 2014. Early developmental toxicity of saxitoxin on medaka (*Oryzias melastigma*) embryos. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 77, 16-25.
- Törökné, A., Asztalos, M., Bánkiné, M., Bickel, H., Borbély, G., Carmeli, S., Codd, G.A., Fastner, J., Huang, Q., Humpage, A., Metcalf, J.S., Rábai, E., Sukenik, A., Surányi, G., Vasas, G., Weiszfeiler, V., 2004. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. *Analytical biochemistry* 332, 280-284.
- Vale, P., 2010. Metabolites of saxitoxin analogues in bivalves contaminated by *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 55, 162-165.
- Vale, P., Taleb, H., 2005. Assessment of the quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins by pre-column derivatization and elimination of interfering compounds by solid-phase extraction. *Food additives and contaminants* 22, 838-846.
- Valério, E., Chaves, S., Tenreiro, R., 2010. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review. *Toxins* 2, 2359-2410.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J., Bakker, G.J., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research* 51, 7-60.
- van den Ouweland, J.M., Kema, I.P., 2012. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 883-884, 18-32.
- Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y., 2009. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 877, 2198-2207.
- Vogeser, M., Seger, C., 2008. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory – goals for further developments. *Clinical biochemistry* 41, 649-662.
- Waters Corporation, 2002. Micromass Quattro micro API Mass Spectrometer – Operator's Guide, in: Corporation, W. (Ed.), p. 230.
- WHO, 1998. Guidelines for Drinking Water Quality (Addendum to), Health Criteria and Other Supporting Information, 2 ed, Geneva.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine drugs* 8, 2185-2211.
- Wood, M., Laloup, M., Samyn, N., del Mar Ramirez Fernandez, M., de Bruijn, E.A., Maes, R.A., De Boeck, G., 2006. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. *Journal of chromatography. A* 1130, 3-15.
- Wormer, L., Carrasco, D., Cirés, S., Quesada, A., 2009. Advances in solid phase extraction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Limnol. Oceanogr.* 7, 568-575.
- Wu, A.H., French, D., 2013. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 420, 4-10.
- Young, F.M., Micklem, J., Humpage, A.R., 2008. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reproductive toxicology* 25, 374-380.
- Žegura, B., Štraser, A., Filipič, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutation research* 727, 16-41.
- Zhuo, L., Yin, Y., Fu, W., Qiu, B., Lin, Z., Yang, Y., Zheng, L., Li, J., Chen, G., 2013. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. *Food chemistry* 137, 115-121.

Capítulo 8

Anexos



8.1. ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DAS CIANOTOXINAS EM ESTUDO

Tabela 8.1. Espécies de cianobactérias produtoras das PST.

Gêneros	Espécies	Localidade	Referências
Anabaena	<i>A. circinalis</i>	Austrália	(Rapala <i>et al.</i> , 2005)
	<i>A. lemmermannii</i>	Dinamarca; Finlândia	
Aphanizomenon	<i>A. flos-aquae</i>	Canadá; Coreia do Sul; EUA; Grécia; Portugal	(Gkelis <i>and</i> Zaoutsos, 2014; Jung <i>et al.</i> , 2003; Kellmann <i>et al.</i> , 2008; Rapala <i>et al.</i> , 2005; Wiese <i>et al.</i> , 2010)
	<i>A. gracile</i>	Alemanha	
	<i>A. issatschenkoi</i>	N.R.	
	<i>A. ovalisporum</i>	N.R.	
Cylindrospermopsis	<i>C. raciborskii</i>	Brasil; Grécia; Portugal	(Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Gkelis <i>and</i> Zaoutsos, 2014; Kellmann <i>et al.</i> , 2008; Rapala <i>et al.</i> , 2005)
Lyngbia	<i>L. wollei</i>	EUA	(Rapala <i>et al.</i> , 2005)
Planktothrix	<i>Planktothrix spp.</i>	Itália	(Rapala <i>et al.</i> , 2005)
Raphidiopsis	<i>R. brookii</i>	N.R.	(Murray <i>et al.</i> , 2011)

N.R. – Não relatado

Tabela 8.2. Espécies de cianobactérias produtoras da CYN.

Gêneros	Espécies	Localidade	Referências
Anabaena	<i>A. bergii</i>	Austrália	(Kokociński <i>et al.</i> , 2013)
	<i>A. lapónica</i>	Finlândia	
	<i>A. planctonica</i>	França	
Aphanizomenon	<i>A. flos-aquae</i>	Alemanha; França; República Checa	(Bláhová <i>et al.</i> , 2009; Kokociński <i>et al.</i> , 2013; Moreira <i>et al.</i> , 2013; Poniedzialek <i>et al.</i> , 2012; Smith <i>et al.</i> , 2008)
	<i>A. gracile</i>	Alemanha; Polónia; República Checa	
	<i>A. issatschenkoi</i>	N.R.	
	<i>A. klebahnii</i>	República Checa	
	<i>A. ovalisporum</i>	Austrália; Espanha; EUA; Israel; Itália	
Cylindrospermopsis	<i>C. raciborskii</i>	Austrália; Áustria; Brasil; Eslováquia; Espanha; EUA; França; Grécia; Hungria; Japão; Nova Zelândia; Polónia; Portugal; República Checa; Tailândia	(Bláhová <i>et al.</i> , 2009; Brient <i>et al.</i> , 2009; Hoff-Risetti <i>et al.</i> , 2013; Kokociński <i>et al.</i> , 2013; Poniedzialek <i>et al.</i> , 2012; Saker <i>et al.</i> , 2003; Törökné <i>et al.</i> , 2004)
Lyngbya	<i>L. wollei</i>	Austrália	(Kokociński <i>et al.</i> , 2013)
Raphidiopsis	<i>R. brookii</i>	Brasil	(Kokociński <i>et al.</i> , 2013; Soto-Liebe <i>et al.</i> , 2010)
	<i>R. curvata</i>	China	
	<i>R. mediterranea</i>	Austrália	
Umezakia	<i>U. natans</i>	Japão	(Kokociński <i>et al.</i> , 2013)

N.R. – Não relatado

8.2. RELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabela 8.3. Vantagens e desvantagens dos métodos analíticos atualmente aplicados para a detecção das cianotoxinas (Alexander *et al.*, 2009; Cusick and Saylor, 2013; Etheridge, 2010; Humpage *et al.*, 2010).

	VANTAGENS	DESVANTAGENS
MÉTODOS QUÍMICOS		
HPLC/MS	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muito específico, sensível, robusto e flexível; ✓ Permite a análise de uma ampla gama de compostos, não requerendo uma etapa prévia de derivatização; ✓ Fornece informações sobre o perfil das cianotoxinas; ✓ Pode ser automatizado. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Equipamento dispendioso tanto na aquisição como na manutenção; ✗ Requer pessoal especializado; ✗ Tempo de vida relativamente curto (cerca de dez anos); ✗ Procedimentos de extração podem ser necessários para melhorar a sensibilidade.
MÉTODOS <i>IN VIVO</i> EM ANIMAIS		
Bioensaios em ratinhos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muito rápidos; ✓ A toxicidade total pode ser determinada com base na resposta biológica dos ratinhos para as cianotoxinas; ✓ Não requerem equipamento analítico complexo. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Pouco específicos e sensíveis; ✗ Não podem ser automatizados; ✗ Requerem pessoal especializado; ✗ Exigem instalações apropriadas para os ratinhos; ✗ Os resultados variam entre os laboratórios devido, por exemplo, a características específicas dos ratinhos; ✗ Propensos a interferências que conduzem a subestimação da toxicidade; ✗ Indesejáveis por razões éticas.
MÉTODOS BIOMOLECULARES		
Ensaio baseado em recetores	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Muito específicos; ✓ Adequados para análises de elevado rendimento. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Necessitam de usar isótopos radioativos; ✗ Não fornecem informações sobre o perfil das cianotoxinas.
Ensaio imunológico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rápidos e sensíveis; ✓ Fácil manuseio; ✓ Geralmente aplicados para análises de confirmação. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Não são seletivos devido à reatividade cruzada; ✗ Não aplicados para análises quantitativas; ✗ Não fornecem informações sobre o perfil das cianotoxinas.
Ensaio citotóxico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rápidos e sensíveis. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Instalações necessárias para a manutenção e o manuseio de culturas de células; ✗ Não fornecem informações sobre o perfil das cianotoxinas.

8.3. CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO ANALÍTICO

8.3.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

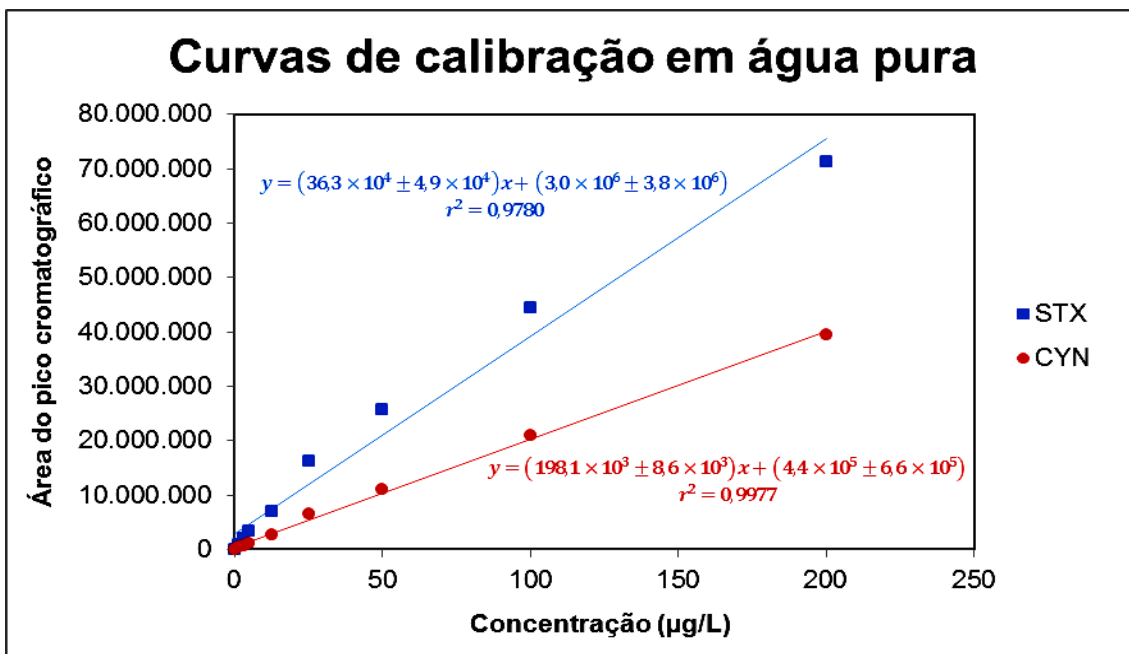


Figura 8.1. Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.

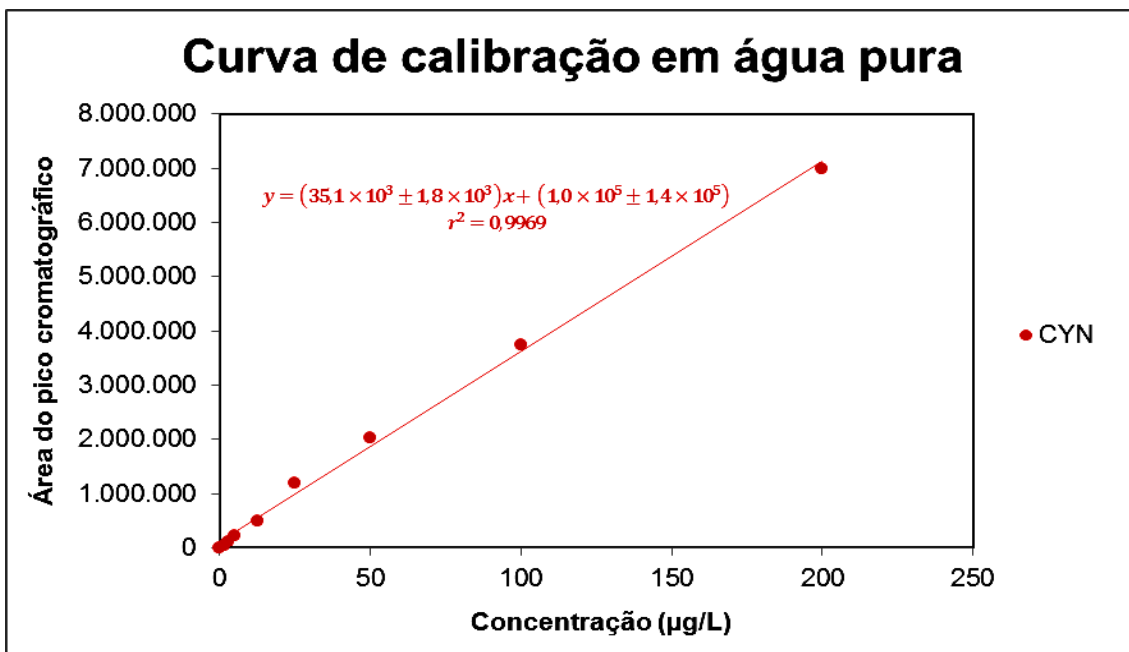


Figura 8.2. Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água Milli-Q acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.

Tabela 8.4. Limites instrumentais e coeficientes de determinação obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água pura.

	Polaridade	LD (µg/L)		LQ (µg/L)		r^2
		Razão $3(S_y/m)$	Razão 3(sinal/ruído)	Razão $10(S_y/m)$	Razão 10(sinal/ruído)	
STX	Positiva	32,2	0,3	107,3	1,0	0,9780
CYN	Positiva	10,3	0,4	34,5	1,3	0,9977
	Negativa	11,9	0,6	39,8	2,4	0,9969

S_y – Desvio-padrão absoluto dos níveis residuais; m – Declive da reta

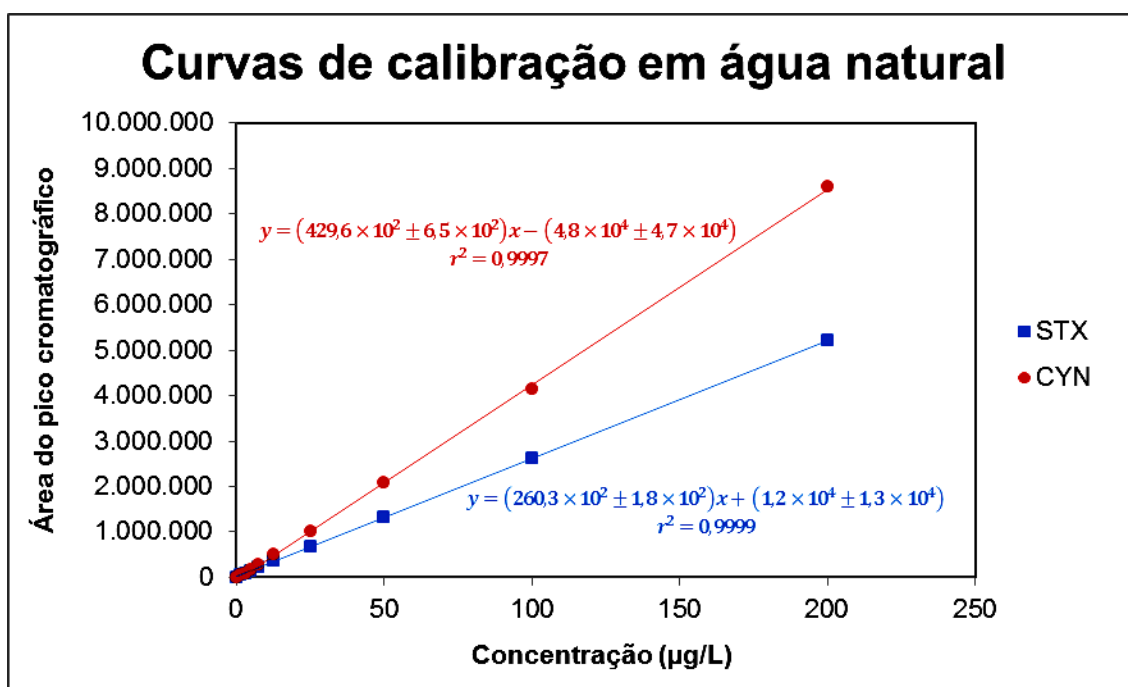


Figura 8.3. Linearidade em modo EIC com polaridade positiva para ambas as cianotoxinas em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.

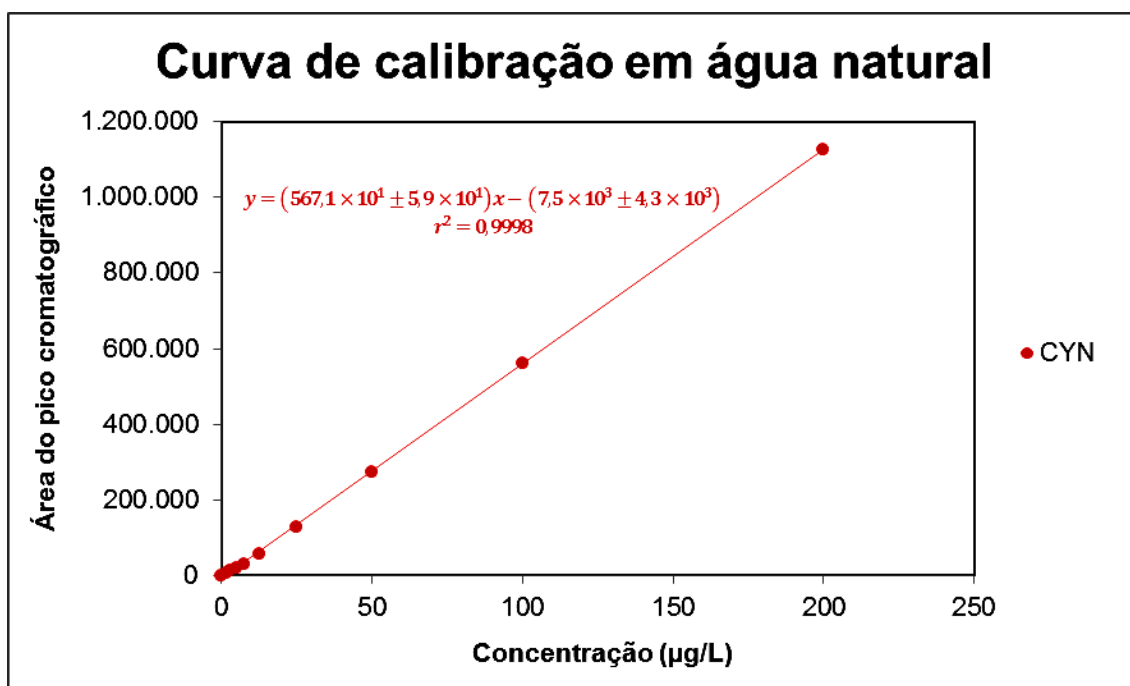


Figura 8.4. Linearidade em modo EIC com polaridade negativa para a CYN em água natural filtrada e acidificada. Foi considerada a média dos pontos obtidos para os padrões de calibração de 1,5 a 200 µg/L, incluindo a amostra branco.

Tabela 8.5. Limites instrumentais e coeficientes de determinação obtidos em modo EIC para as duas cianotoxinas para diferentes polaridades em água natural.

	Polaridade	LD (µg/L)		LQ (µg/L)		r ²
		Razão 3(S _y /m)	Razão 3(sinal/ruído)	Razão 10(S _y /m)	Razão 10(sinal/ruído)	
STX	Positiva	1,7	0,3	5,6	1,0	0,9999
CYN	Positiva	3,7	0,4	12,4	1,3	0,9997
	Negativa	2,6	0,6	8,6	2,4	0,9998

S_y – Desvio-padrão absoluto dos níveis residuais; m – Declive da reta

Tabela 8.6. Valores percentuais a 99% de confiança (nível de significância 0,01) para a distribuição F.

$\nu_2 \backslash \nu_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4052	5000	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022	6056
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39	99,40
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35	27,23
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85
11	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40	3,31
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30	3,21
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22	3,13
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15	3,06
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09	3,00
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72	2,63
120	6,85	4,79	3,95	3,48	3,17	2,96	2,79	2,66	2,56	2,47
∞	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32

ν_1 – Graus de liberdade no numerador; ν_2 – Graus de liberdade no denominador

8.3.2. ESPECIFICIDADE

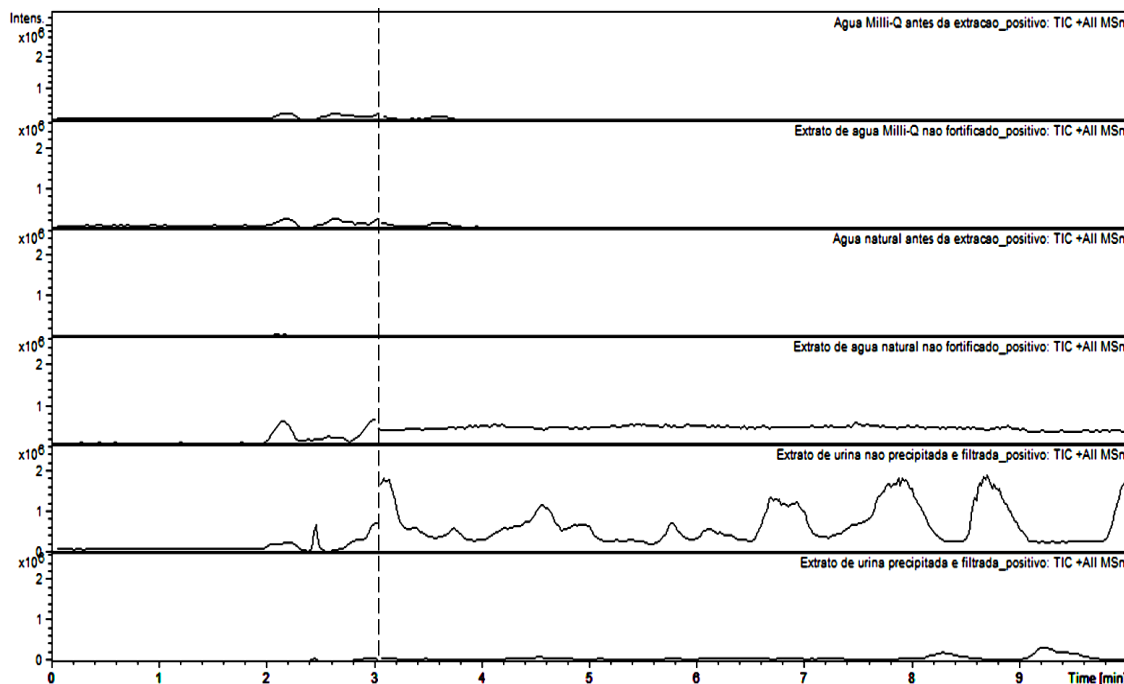


Figura 8.5. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas.

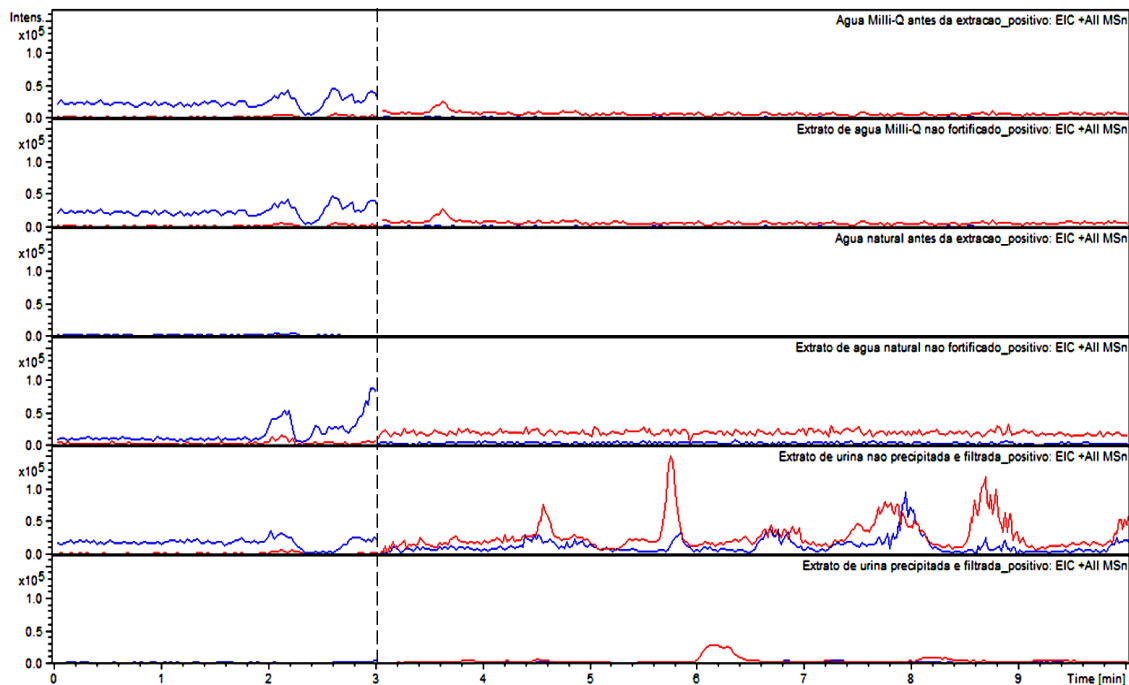


Figura 8.6. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas. O sinal da STX encontra-se a azul, enquanto o sinal da CYN está representado a vermelho.

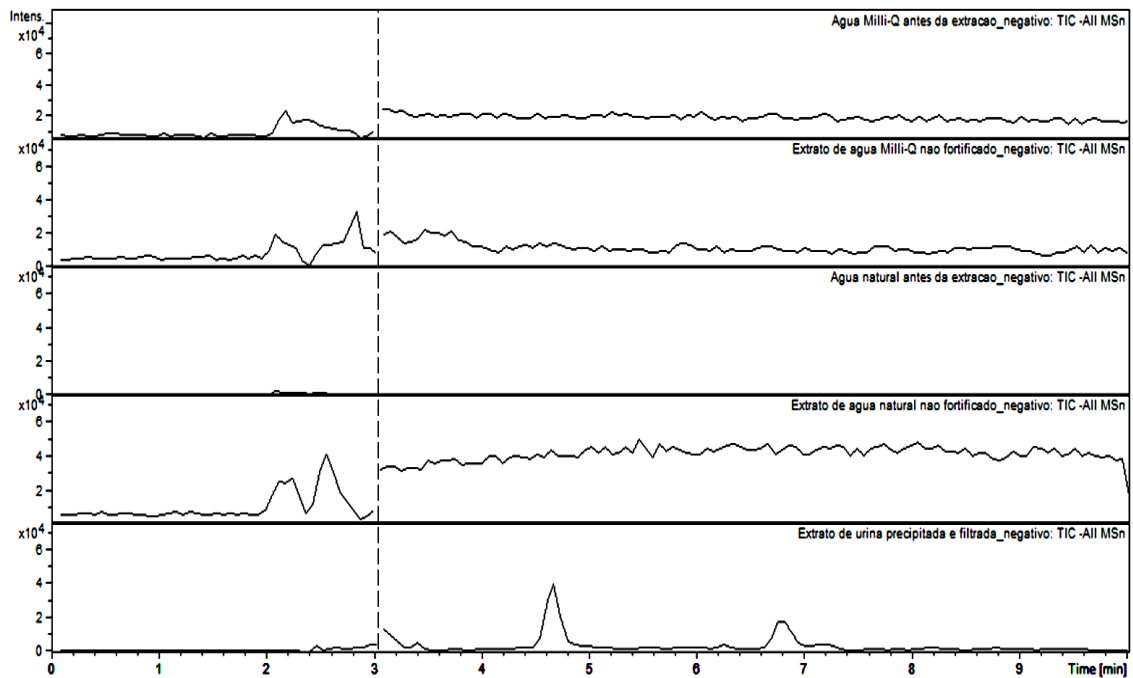


Figura 8.7. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas.

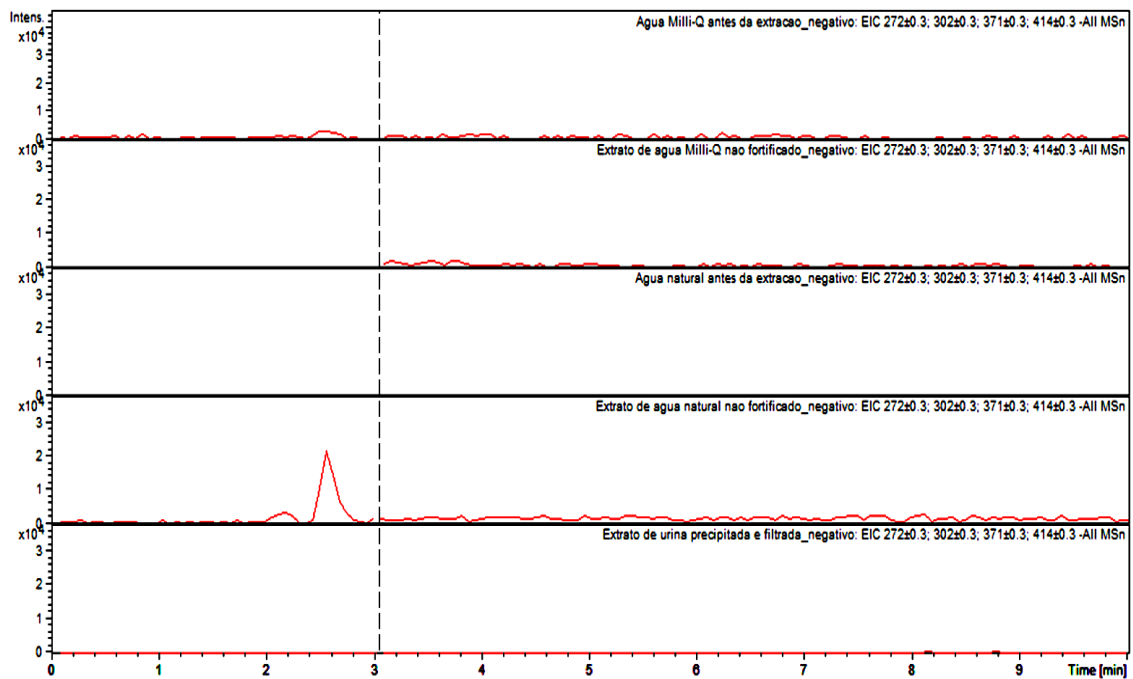


Figura 8.8. Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa relativos ao estudo da especificidade nas várias matrizes testadas. O sinal da CYN está representado a vermelho.

8.3.3. PRECISÃO

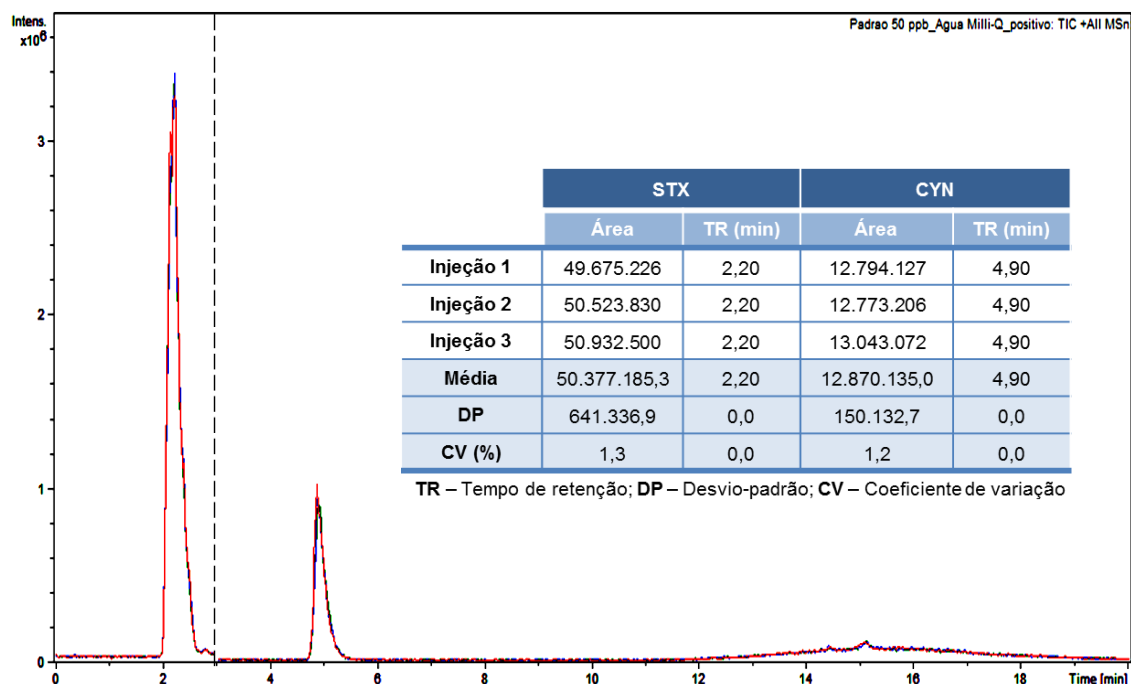


Figura 8.9a. Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

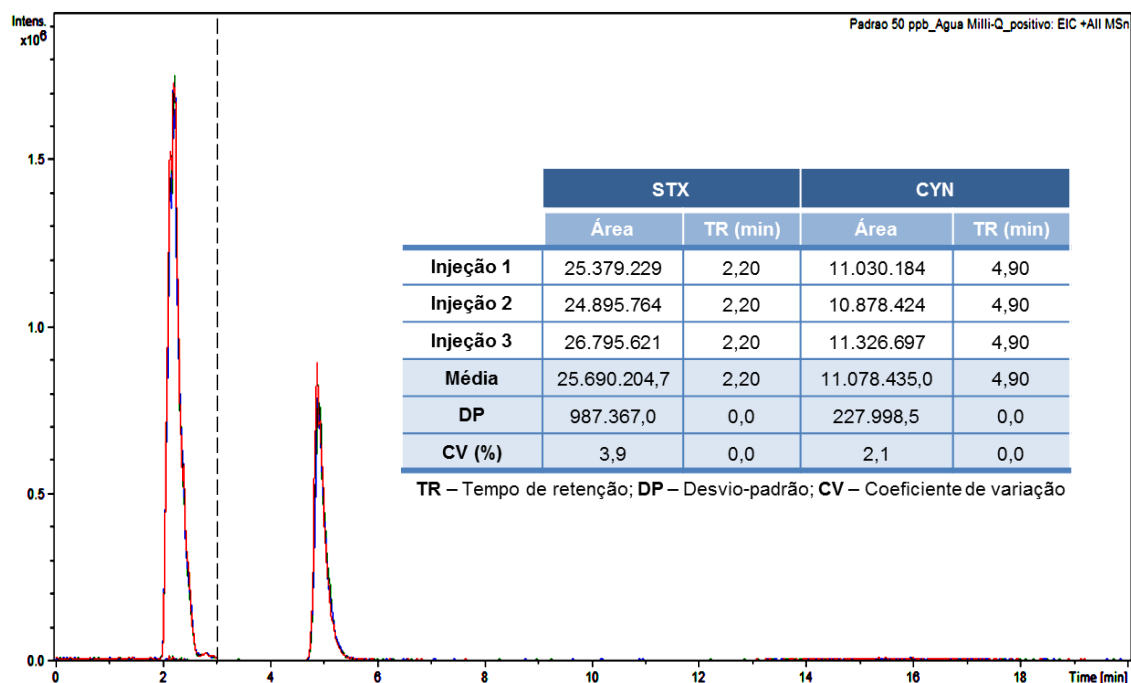


Figura 8.9b. Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

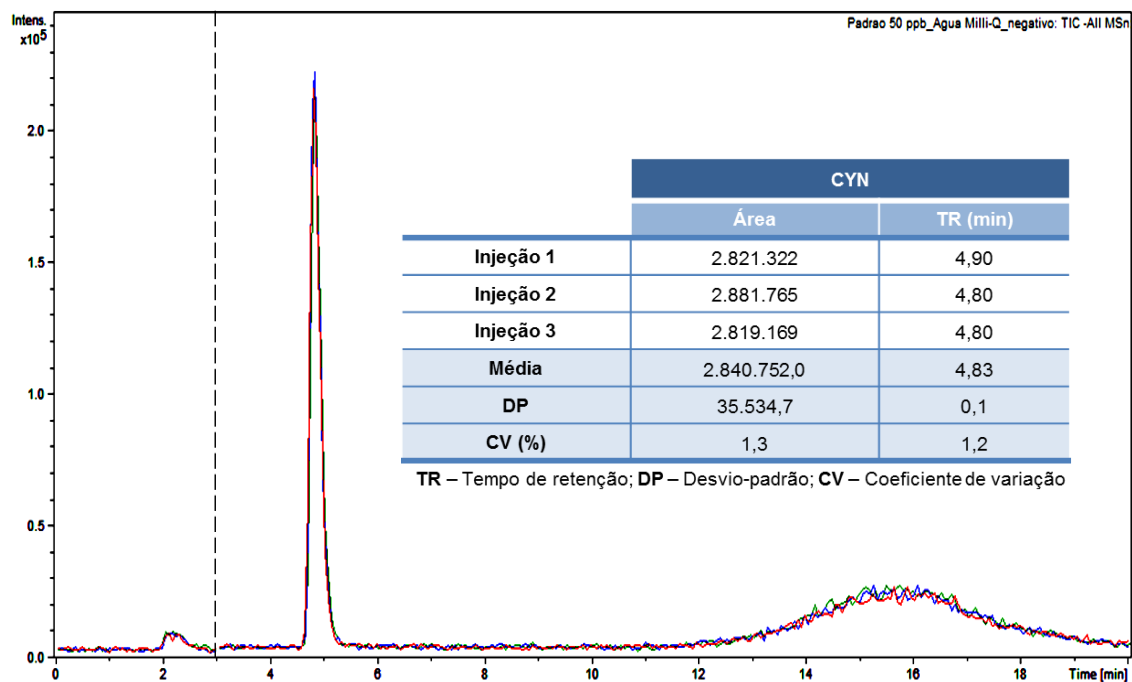


Figura 8.10a. Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

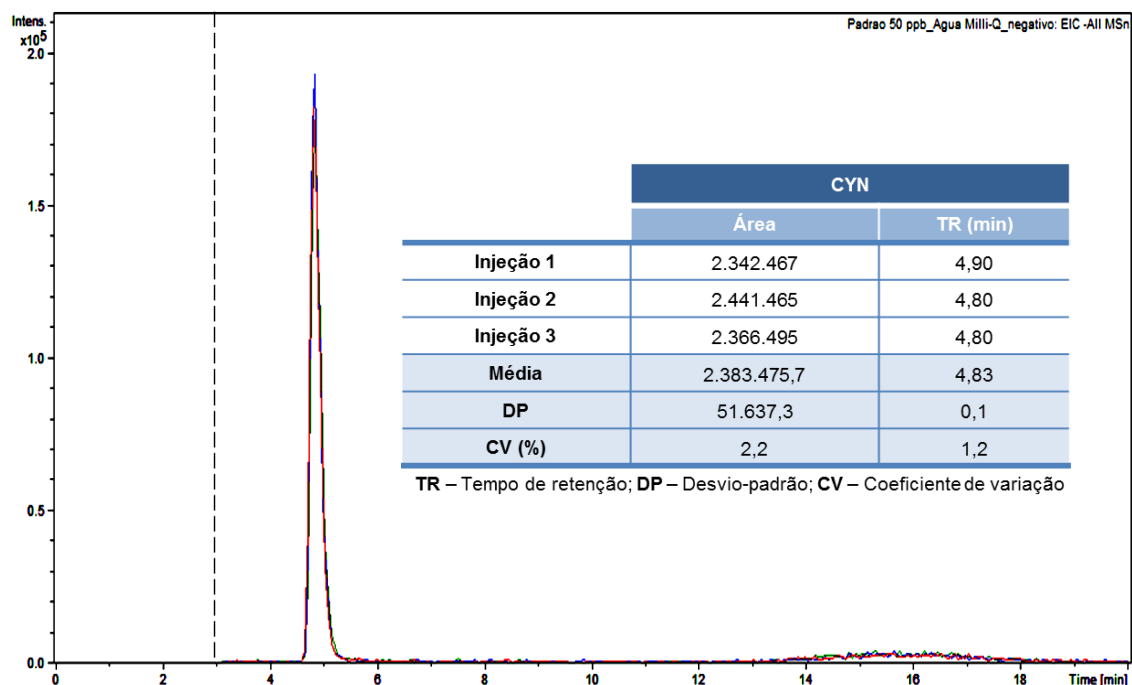


Figura 8.10b. Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água Milli-Q acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

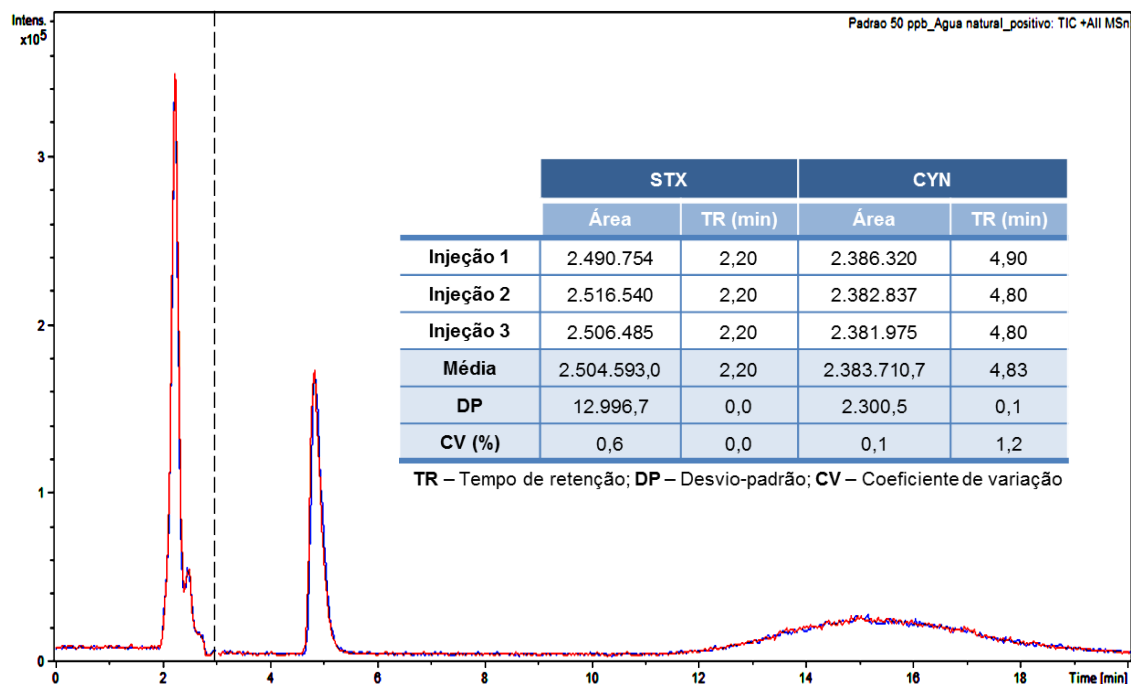


Figura 8.11a. Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

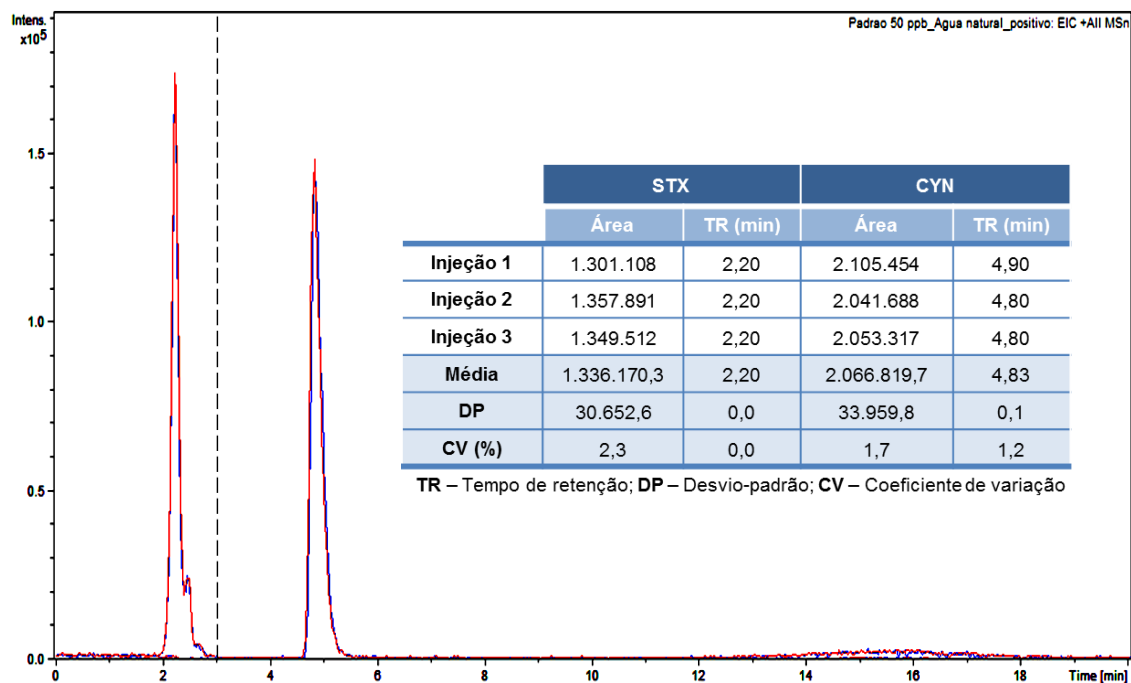


Figura 8.11b. Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade positiva relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

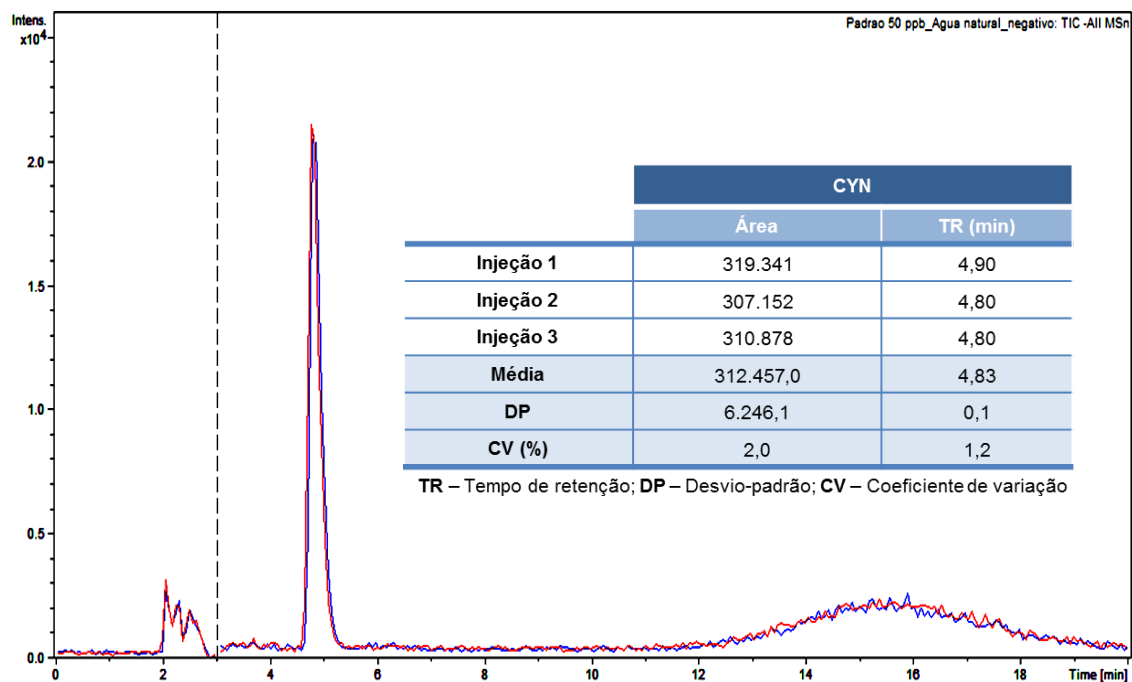


Figura 8.12a. Cromatogramas sobrepostos em modo TIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

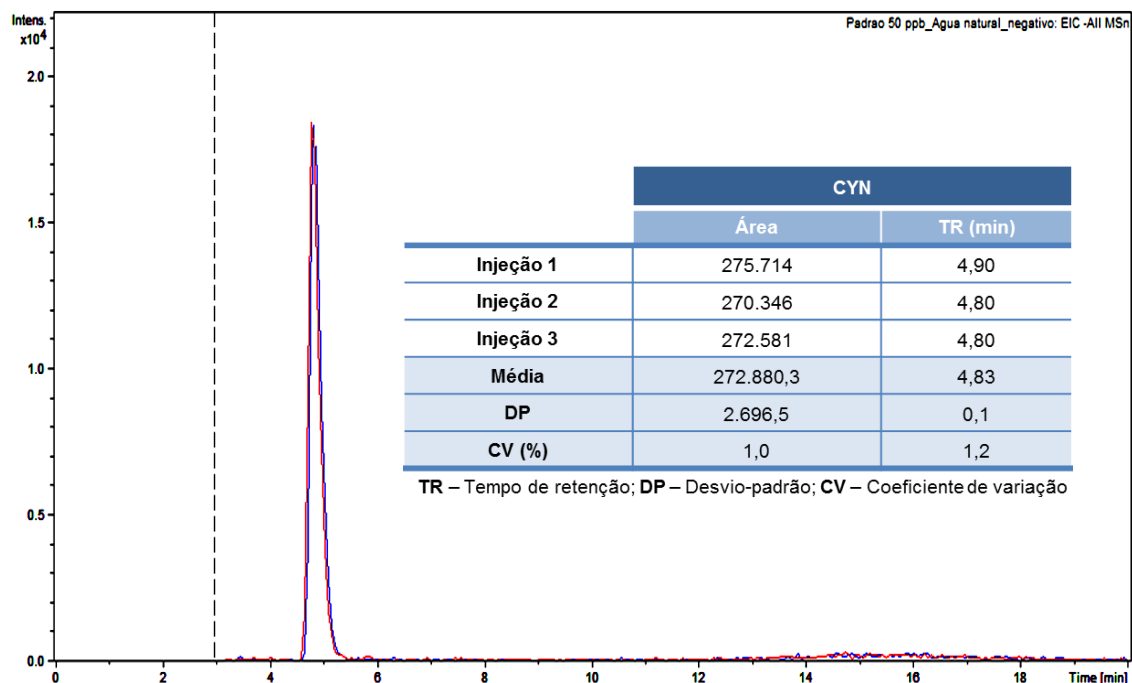


Figura 8.12b. Cromatogramas sobrepostos em modo EIC com polaridade negativa relativos ao estudo da precisão instrumental em água natural filtrada e acidificada. A média dos resultados e o erro associado encontram-se tabelados.

8.3.4. EXATIDÃO

Tabela 8.7. Cálculo das concentrações efetivas nos extratos.

	Extrato (10 µg/L)	Extrato (100 µg/L)
Volume inicial (µL)	500	500
Volume adicionado (µL)*	25	250
Volume total (µL)	525	750
Fator de diluição	$525 / 25 = 21$	$750 / 250 = 3$
Concentração efetiva (µg/L)	$200 / 21 = 9,5$	$200 / 3 = 66,7$

*A partir da solução padrão de 200 µg/L, para que as cianotoxinas estejam à concentração de 10 e de 100 µg/L nos extratos.

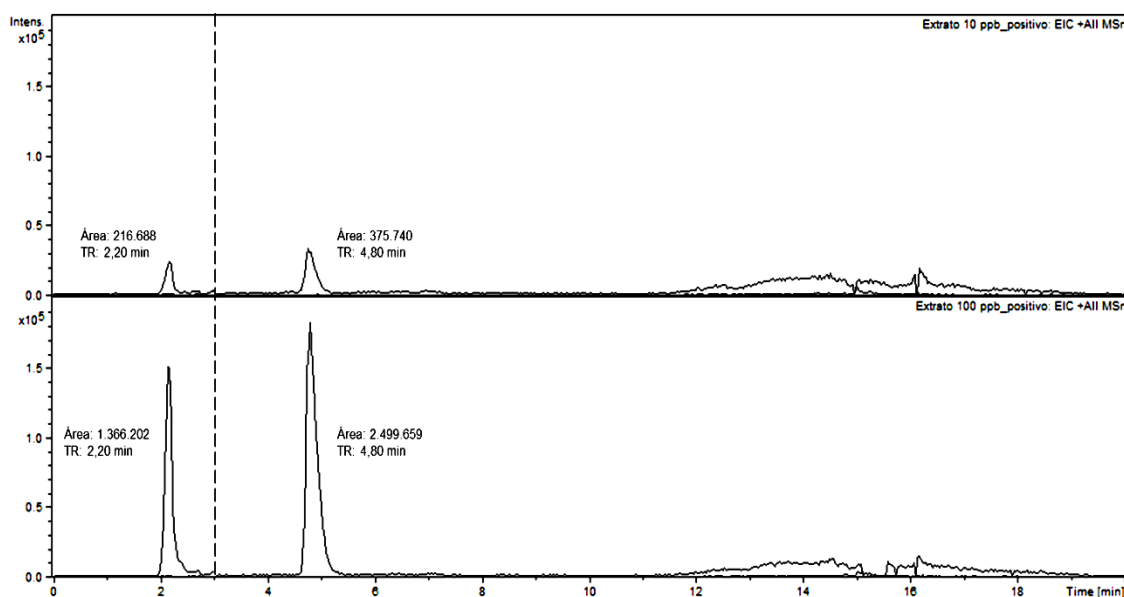


Figura 8.13. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva dos extratos fortificados de água natural filtrada.

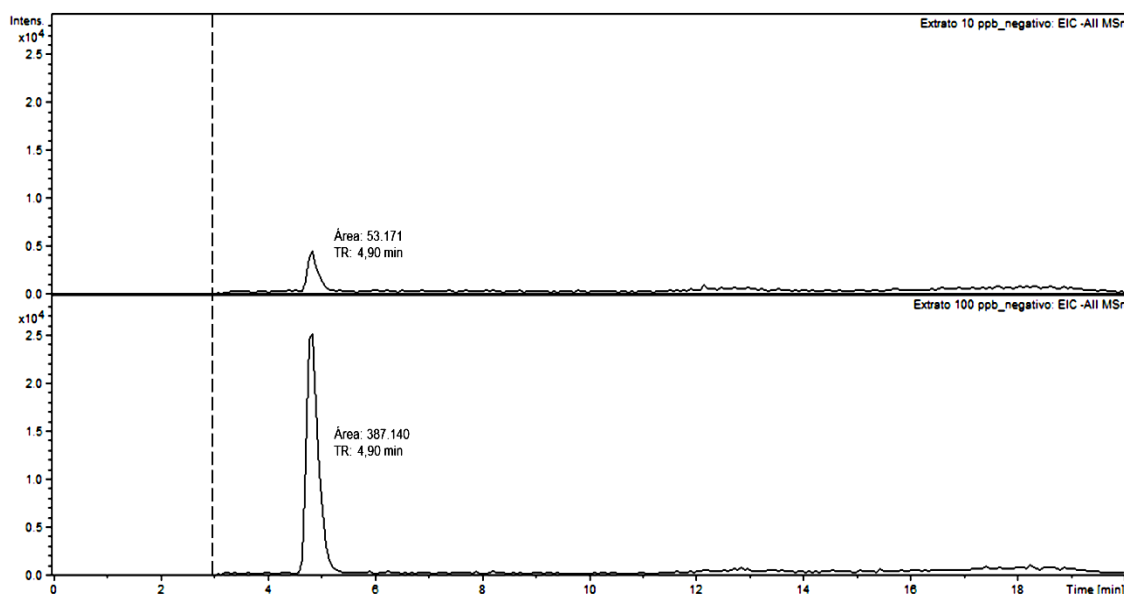


Figura 8.14. Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa dos extratos fortificados de água natural filtrada.

8.4. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

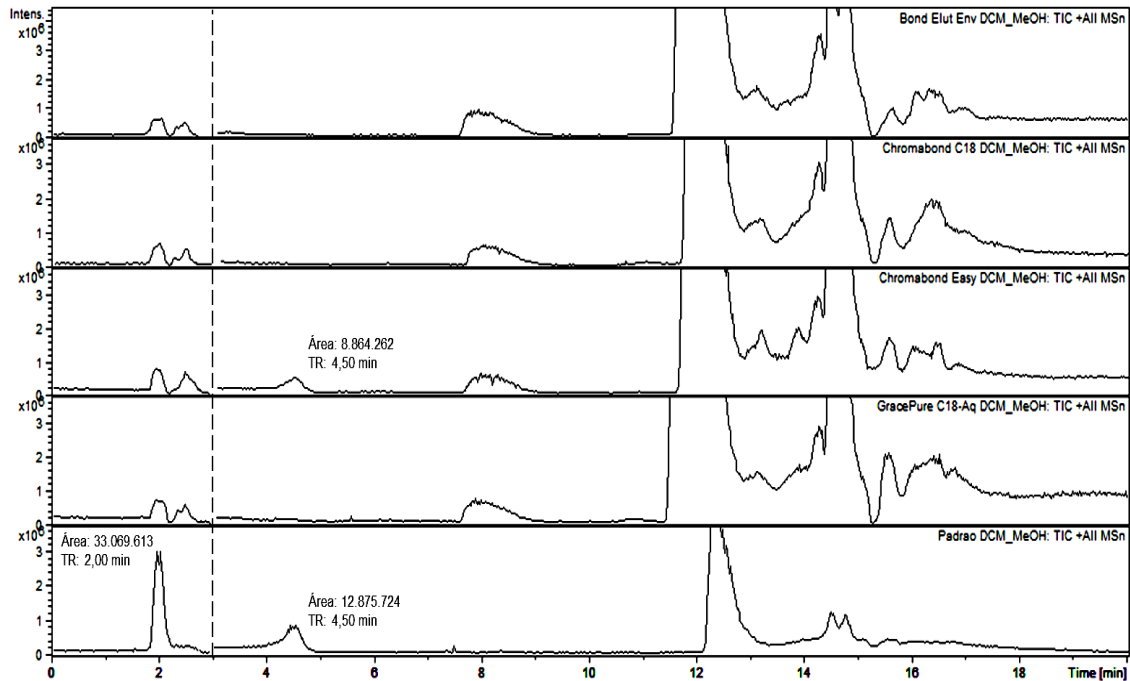


Figura 8.15. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH”.

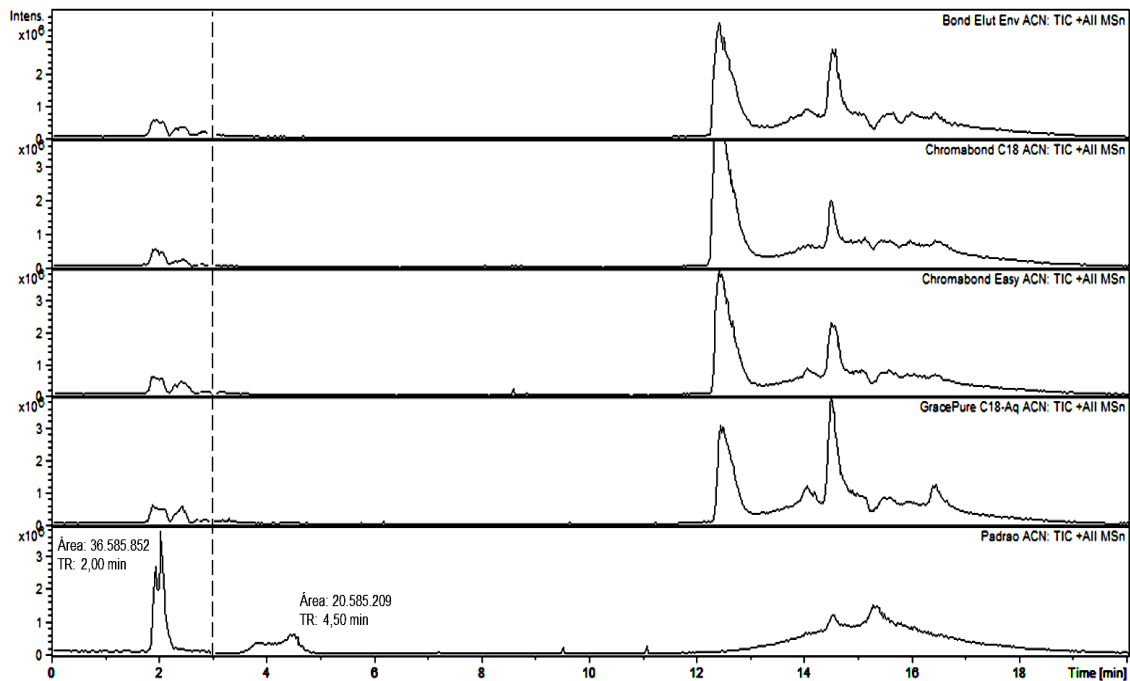


Figura 8.16a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “ACN”.

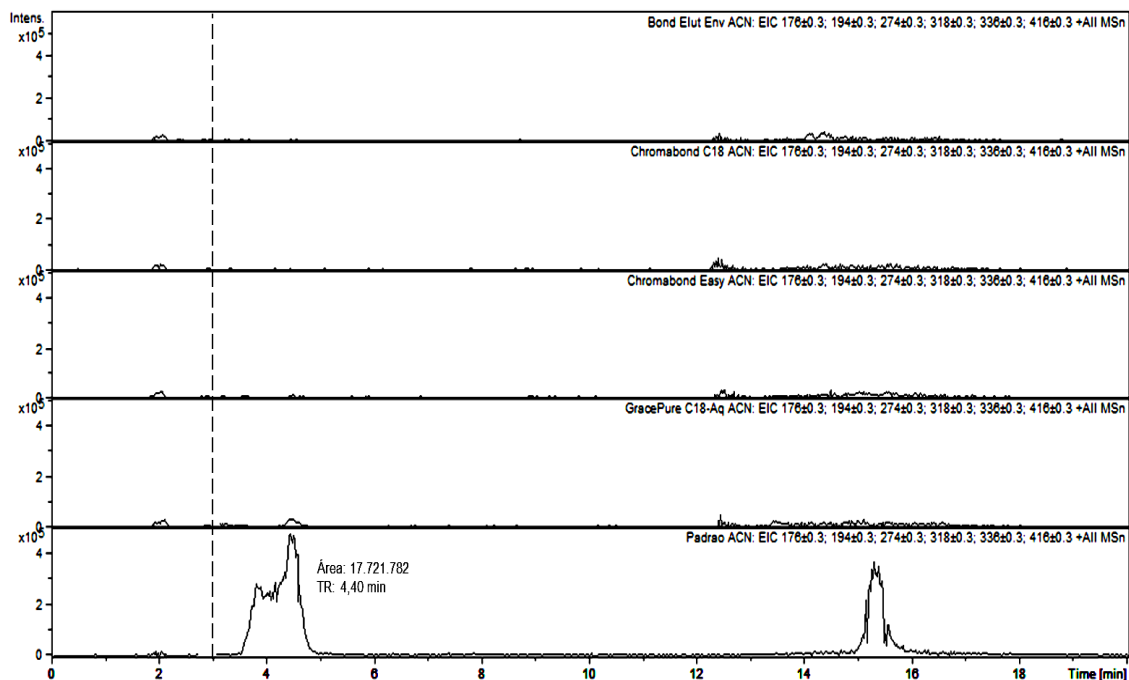


Figura 8.16b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “ACN”.

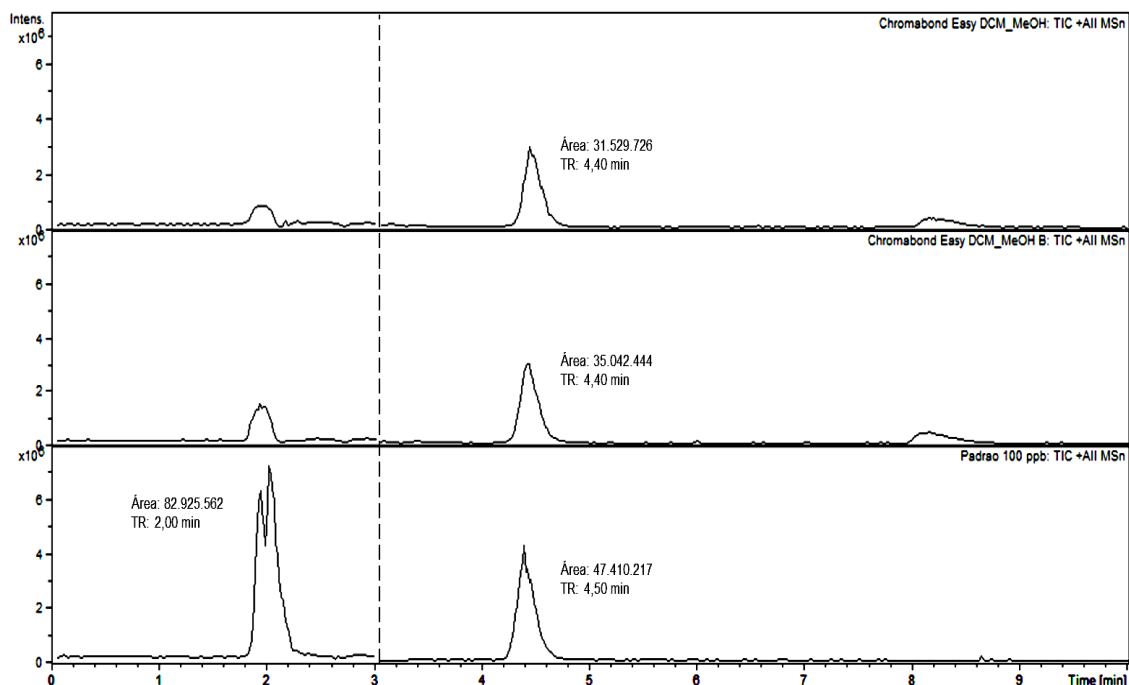


Figura 8.17. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração dos métodos de SPE “DCM-MeOH” e “DCM-MeOH B” aplicados no cartucho *Chromabond Easy*.

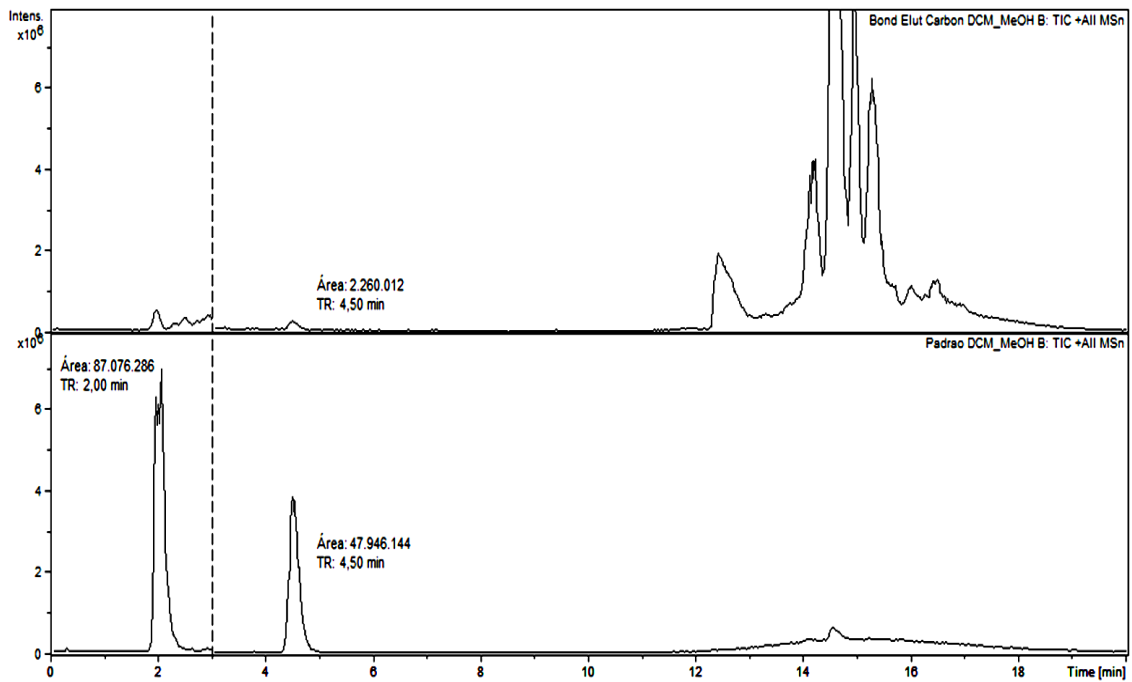


Figura 8.18a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH B” aplicado no cartucho *Bond Elut Carbon*.

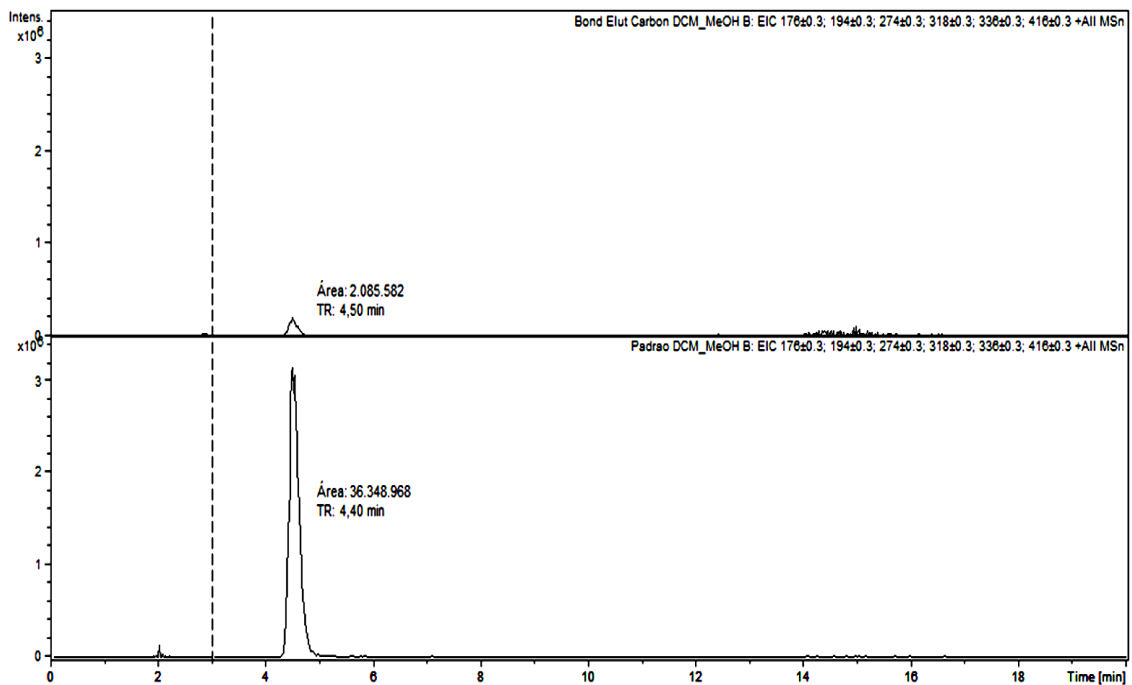


Figura 8.18b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à eficiência de extração do método de SPE “DCM-MeOH B” aplicado no cartucho *Bond Elut Carbon*.

8.5. ENSAIOS DE PRECISÃO DO MÉTODO DE SPE IMPLEMENTADO

8.5.1. ÁGUA PURA

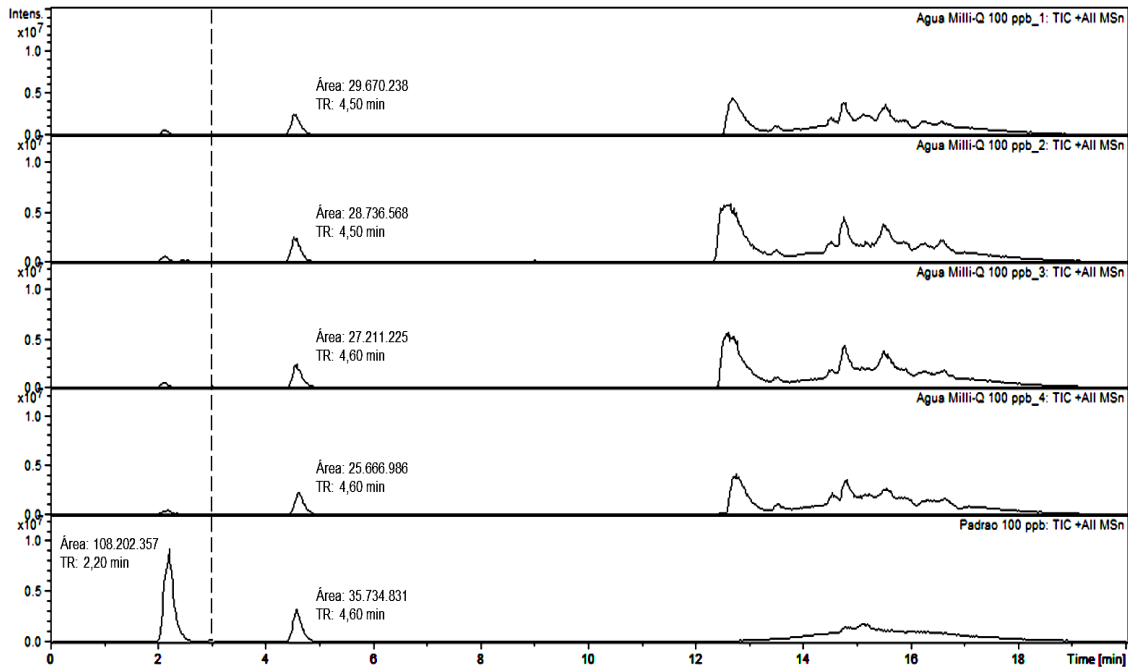


Figura 8.19a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN.

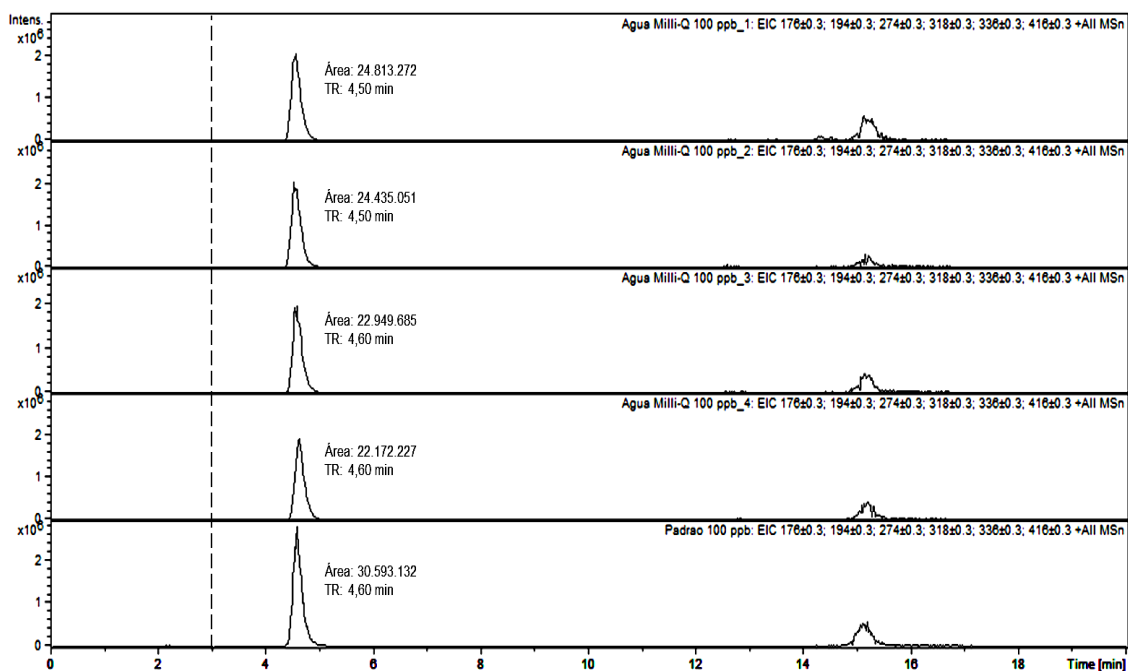


Figura 8.19b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN.

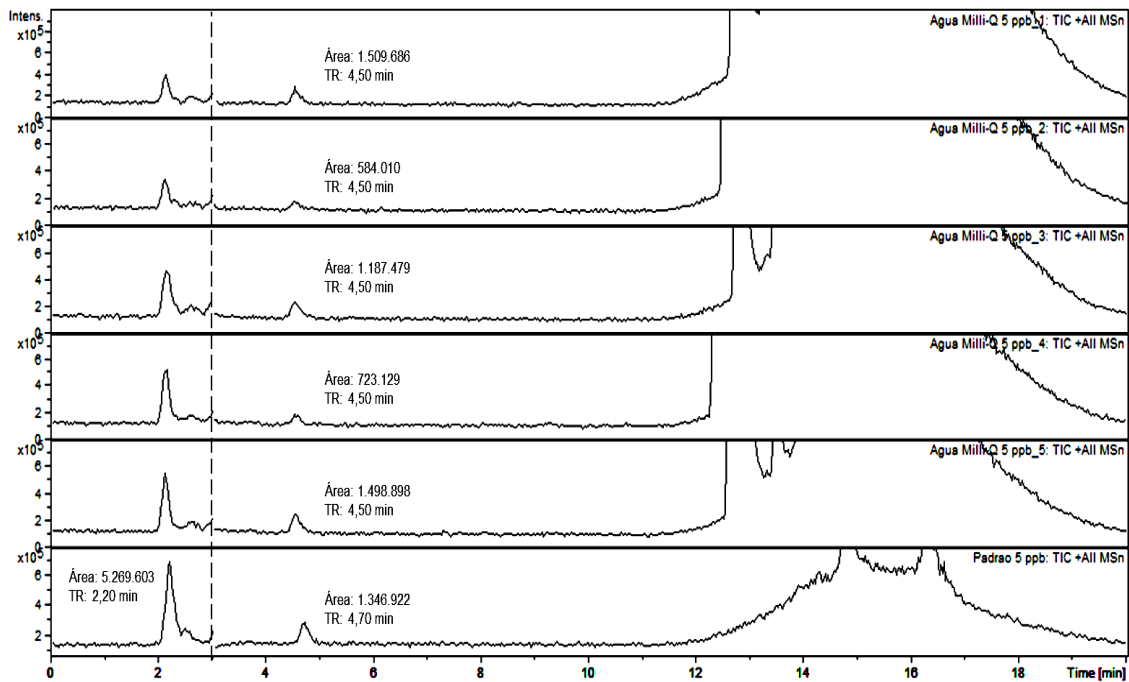


Figura 8.20a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,0125 µg da CYN.

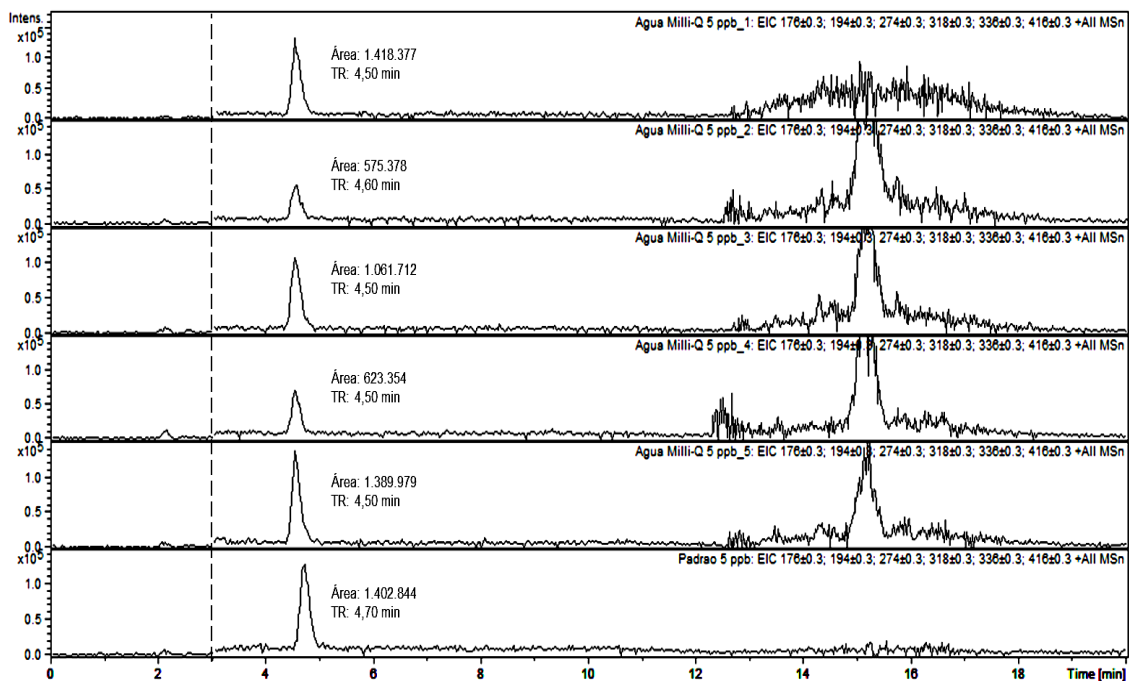


Figura 8.20b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,0125 µg da CYN.

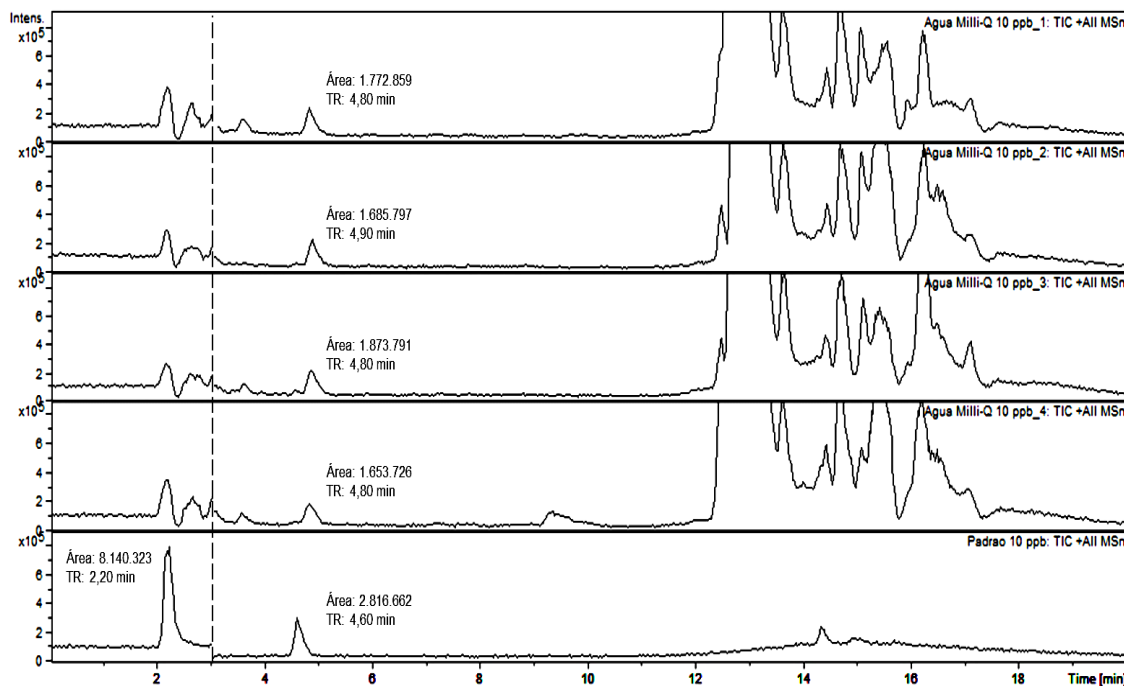


Figura 8.21a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à repetição do ensaio de precisão do método de SPE adotado para concentrações mais baixas da CYN (0,025 µg em amostras de água Milli-Q acidificadas).

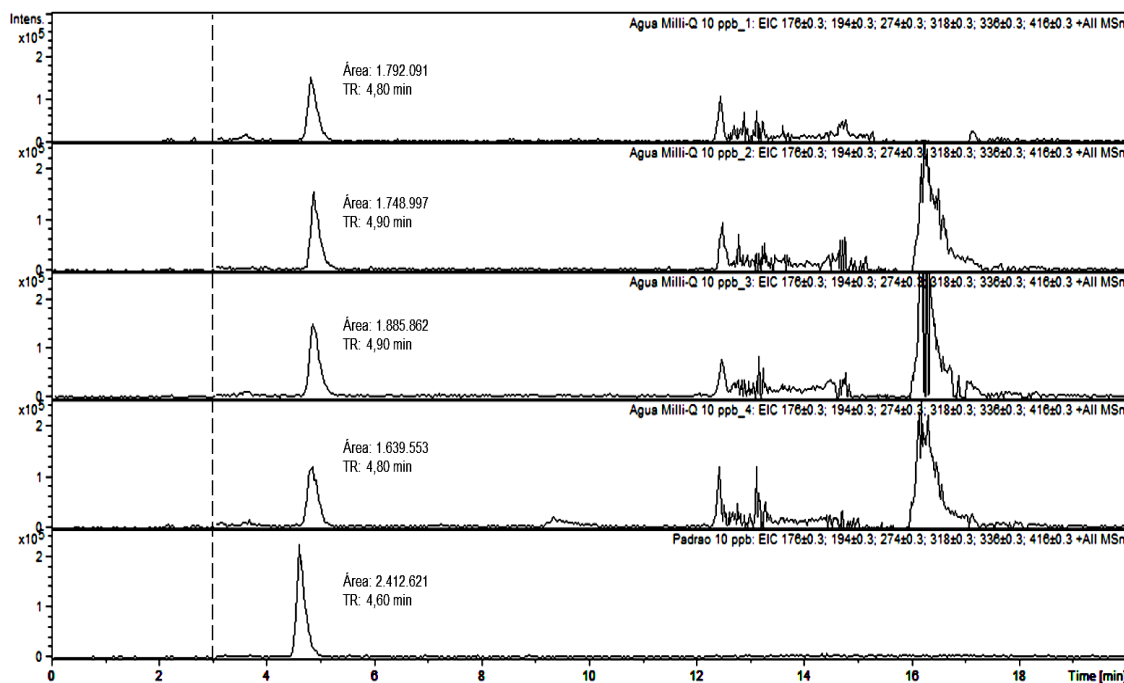


Figura 8.21b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à repetição do ensaio de precisão do método de SPE adotado para concentrações mais baixas da CYN (0,025 µg em amostras de água Milli-Q acidificadas).

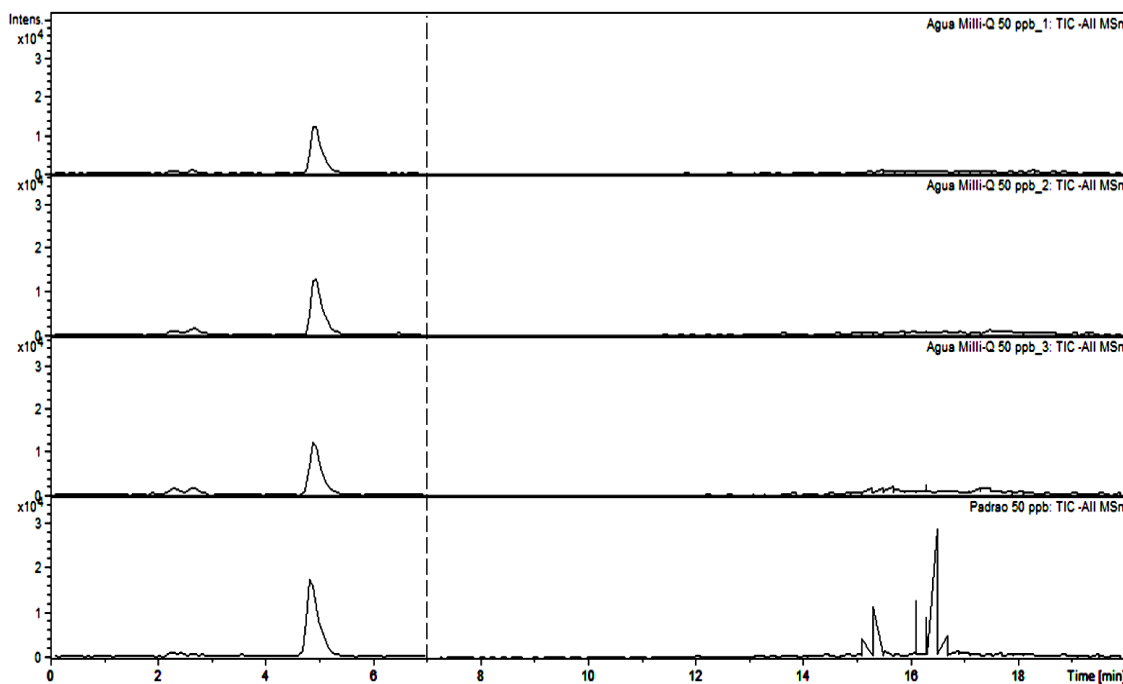


Figura 8.22. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água Milli-Q acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR.

8.5.2. ÁGUA NATURAL

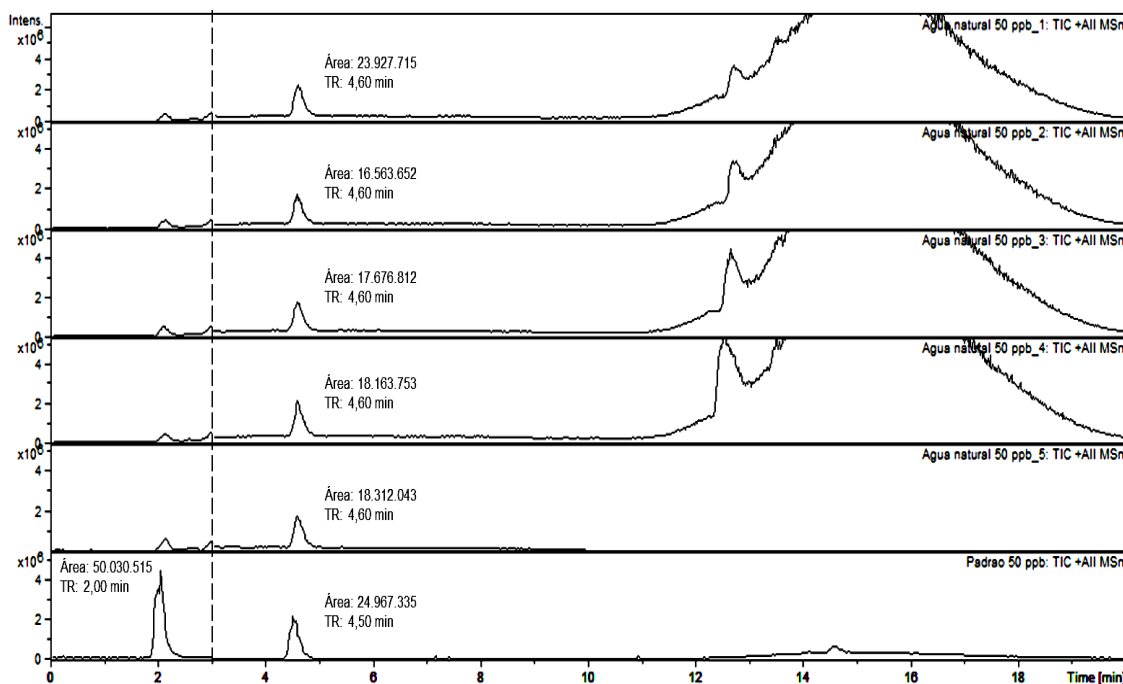


Figura 8.23a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à avaliação do sinal para volumes iniciais distintos de amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN. As amostras 1 a 4 foram preparadas com um volume inicial de 200 mL, enquanto a amostra 5 foi preparada a partir de 100 mL.

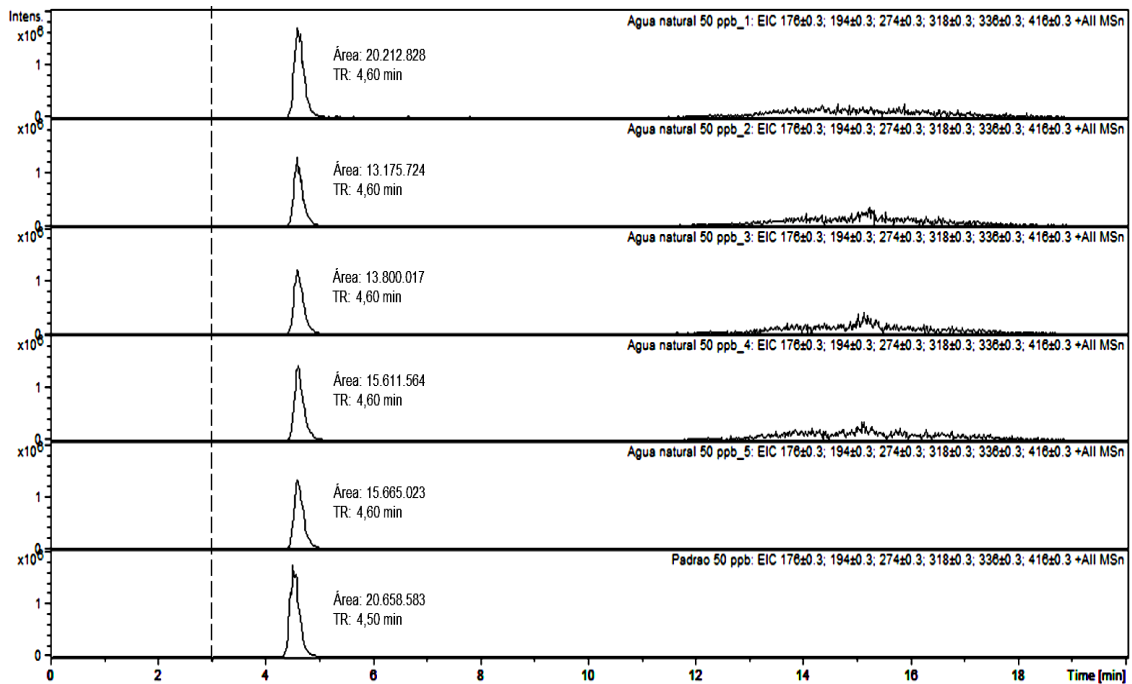


Figura 8.23b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos à avaliação do sinal para volumes iniciais distintos de amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN. As amostras 1 a 4 foram preparadas com um volume inicial de 200 mL, enquanto a amostra 5 foi preparada a partir de 100 mL.

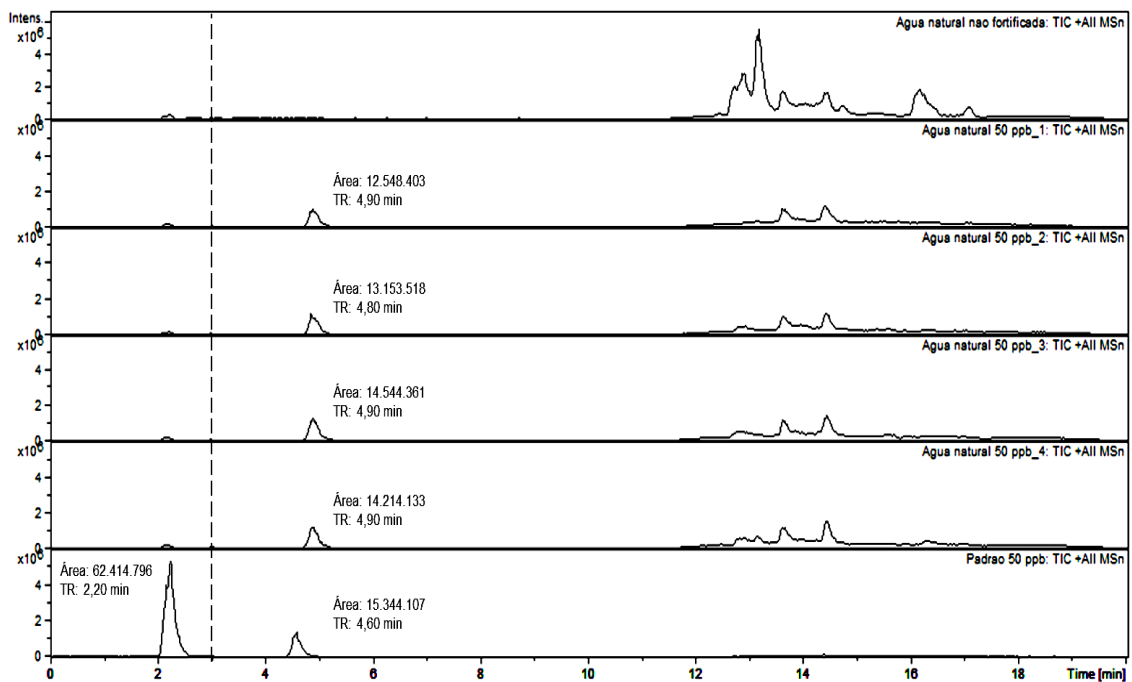


Figura 8.24a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN.

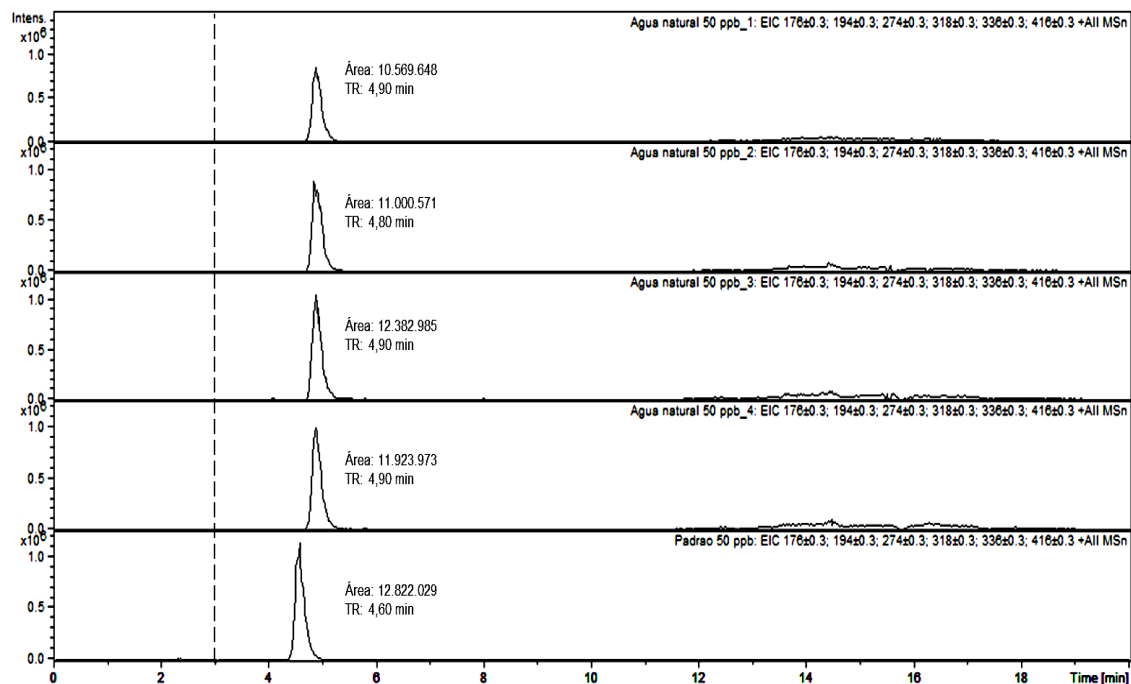


Figura 8.24b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN.

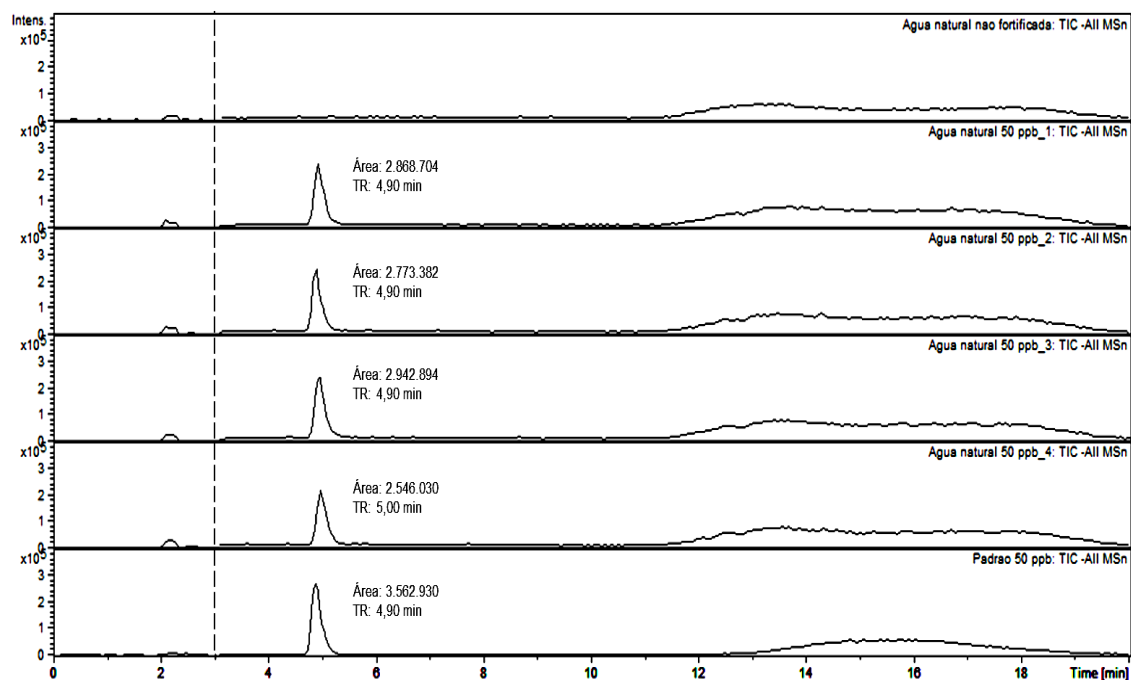


Figura 8.25a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN.

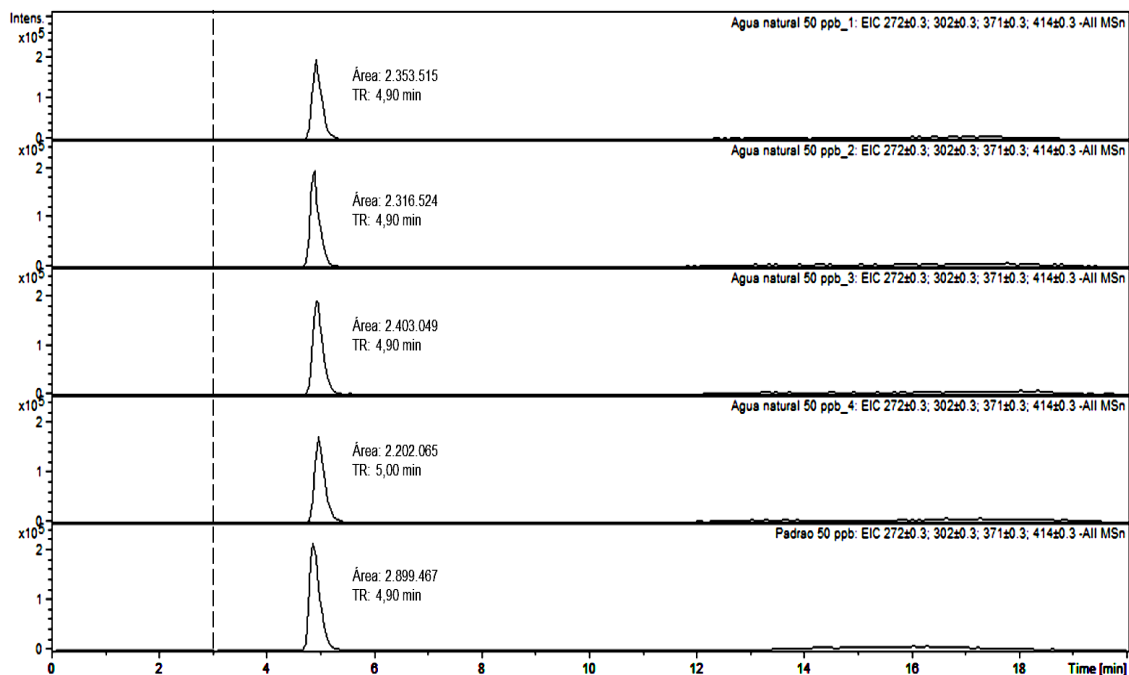


Figura 8.25b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN.

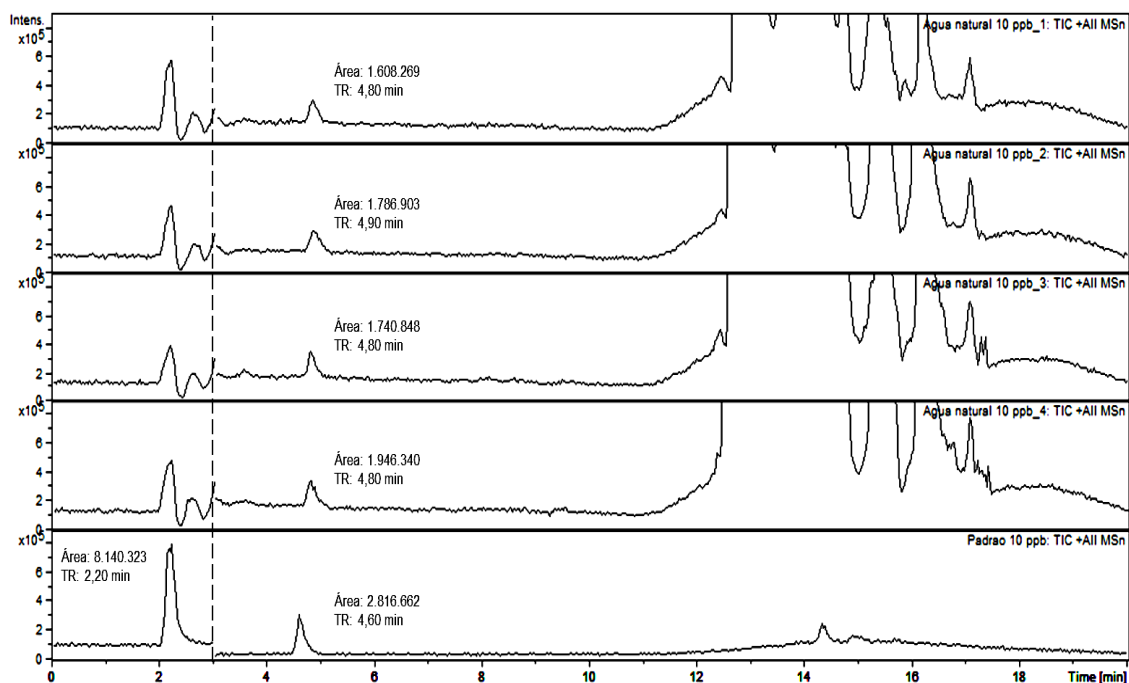


Figura 8.26a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN.

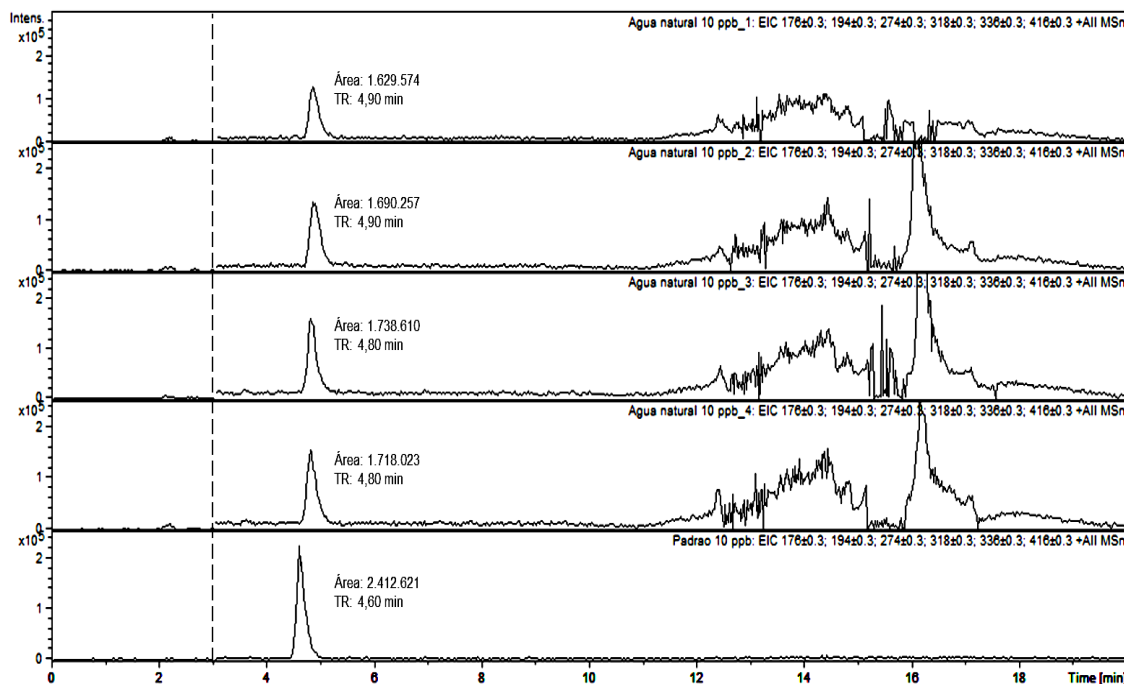


Figura 8.26b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade positiva relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN.

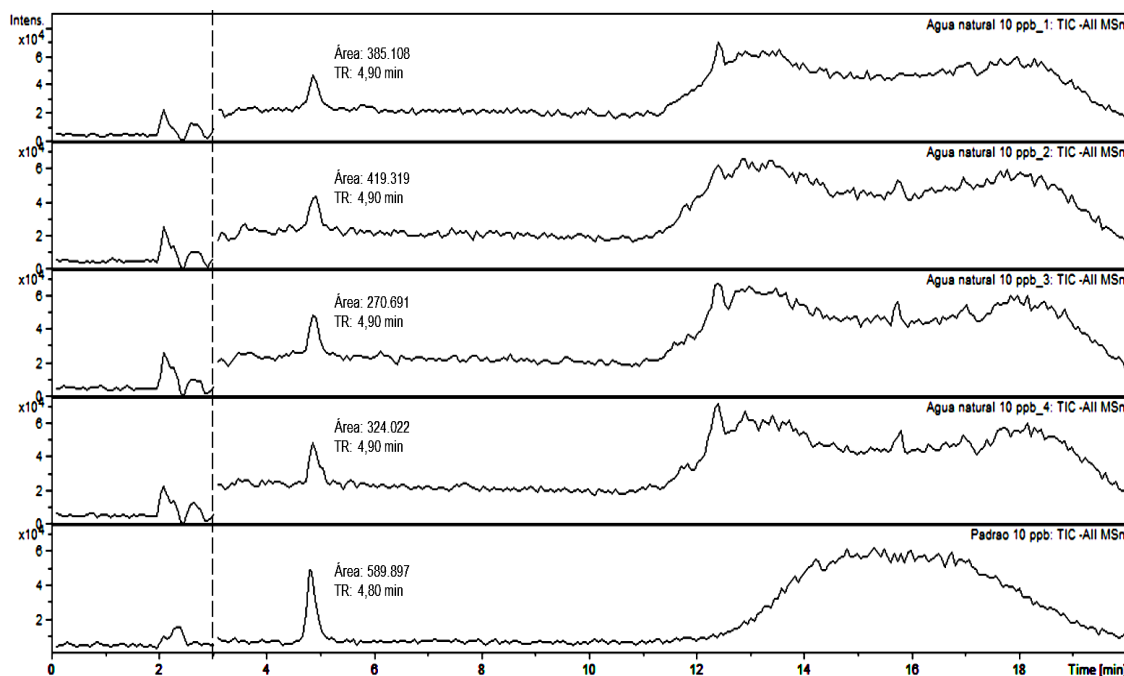


Figura 8.27a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN.

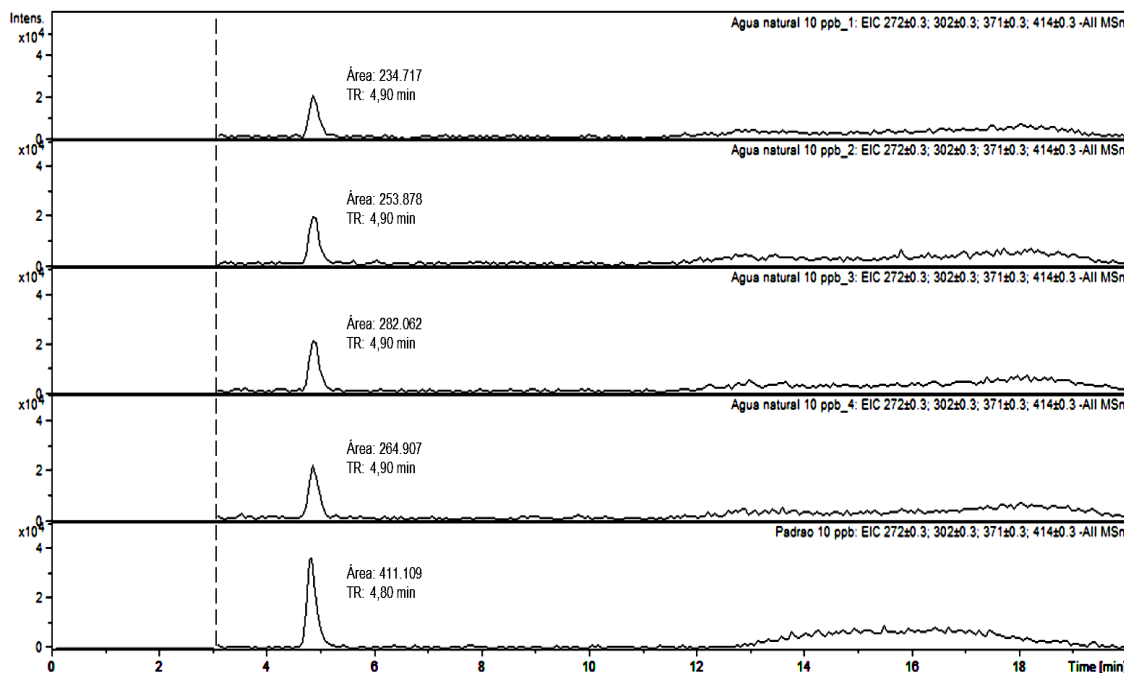


Figura 8.27b. Cromatogramas em modo EIC com polaridade negativa relativos ao ensaio de precisão e de limite de quantificação do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,025 µg da CYN.

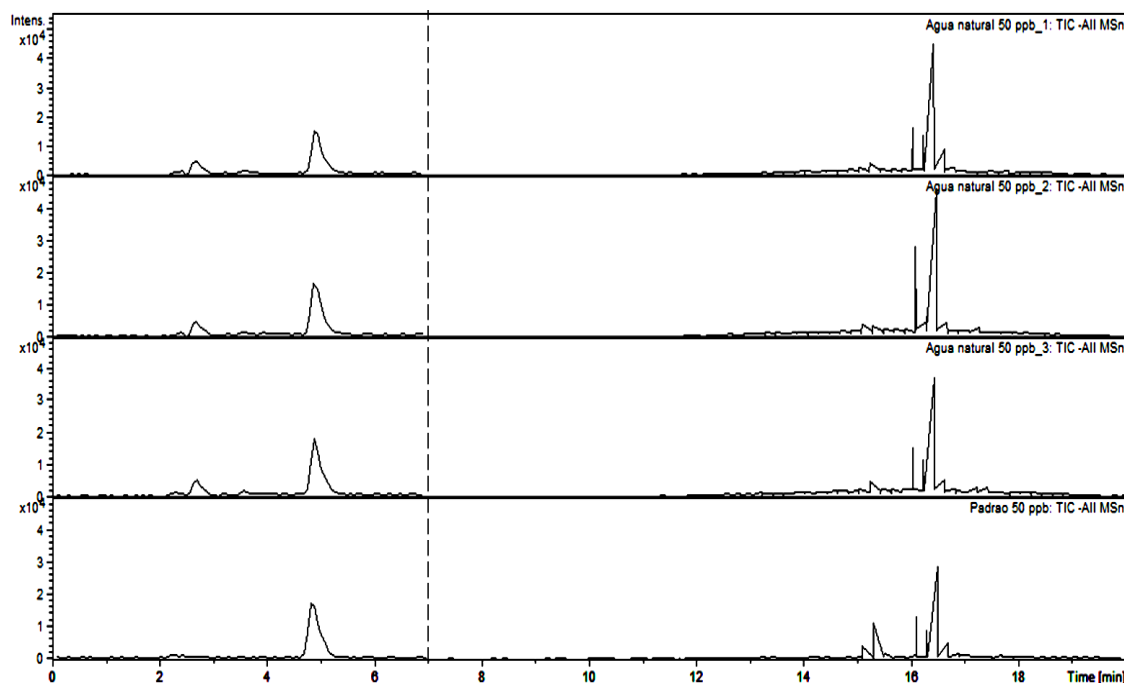


Figura 8.28. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos à avaliação da eficiência de extração e precisão do método de SPE adotado em amostras de água natural filtradas e acidificadas contendo 0,25 µg da CYN, MCT-LR, MCT-RR e MCT-YR.

8.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

8.6.1. ÁGUA NATURAL

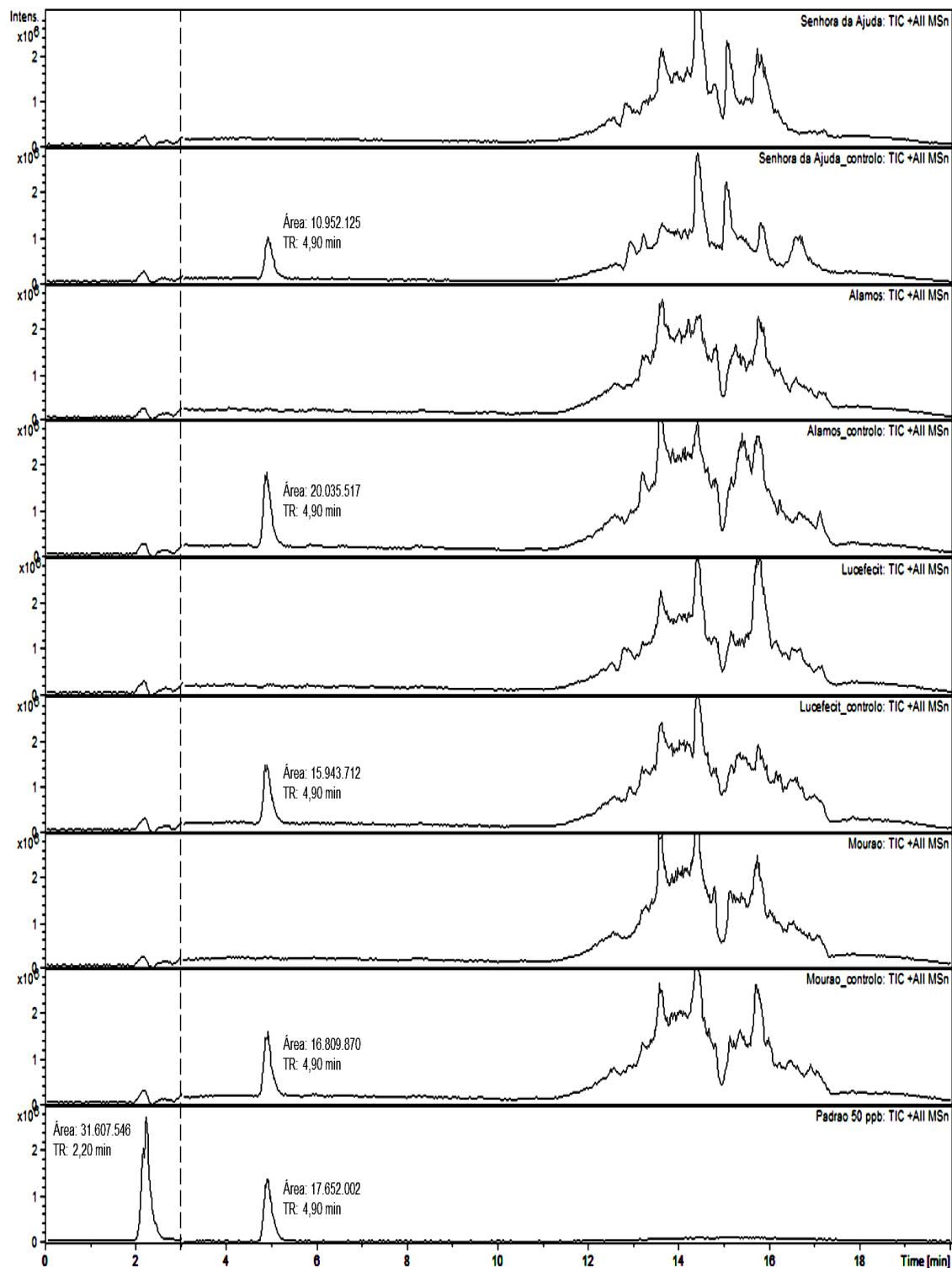


Figura 8.29. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração.

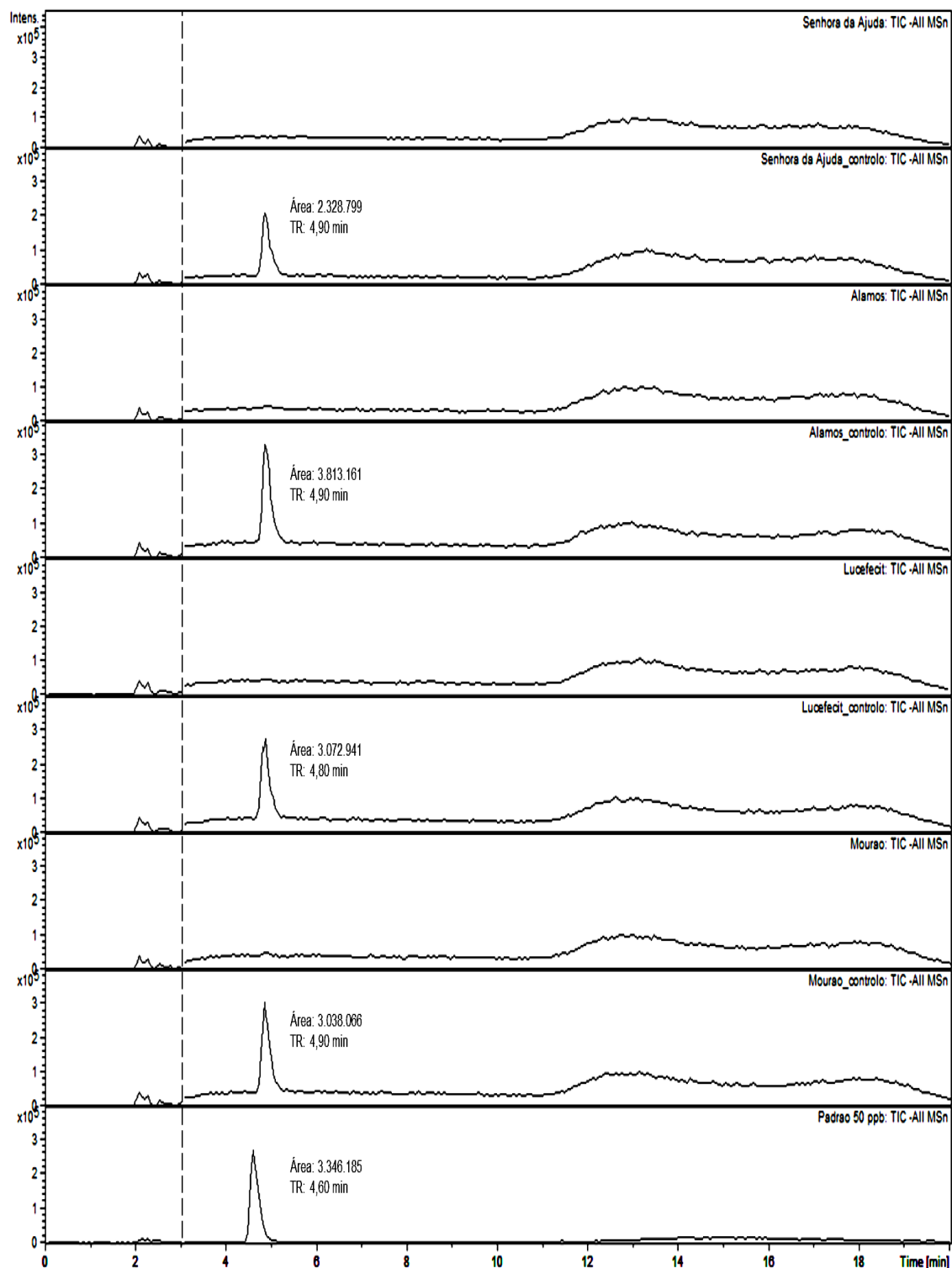


Figura 8.30a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade negativa relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração.

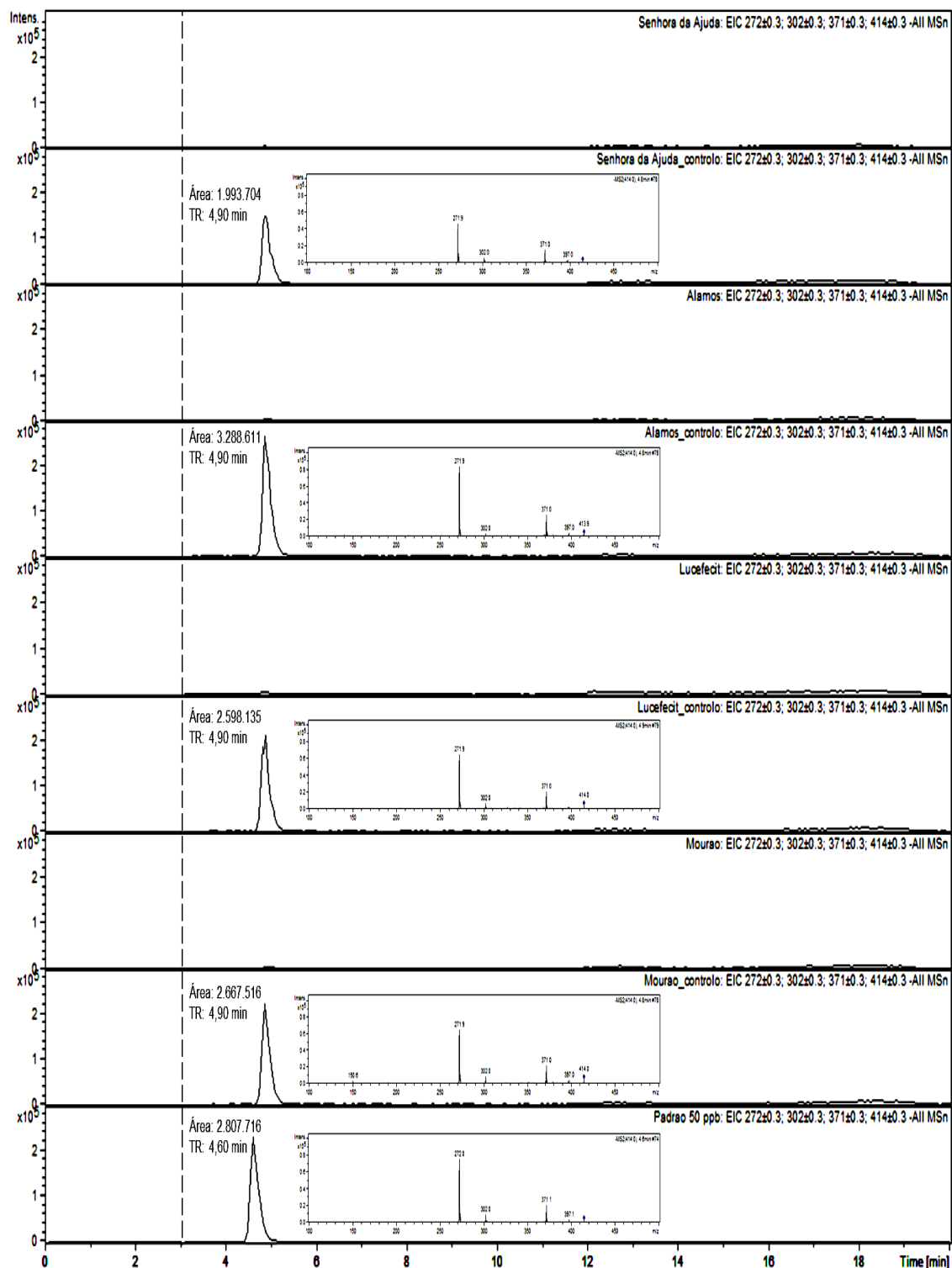


Figura 8.30b. Cromatogramas em modo EIC e espetros MS² com polaridade negativa relativos à análise pelo método analítico otimizado de amostras de água natural oriundas de diferentes localidades da barragem do Alqueva. Para cada conjunto de duas amostras respeitante a um local de amostragem, uma foi fortificada com 0,25 µg da CYN, servindo como controlo de eficiência de extração.

8.6.2. URINA

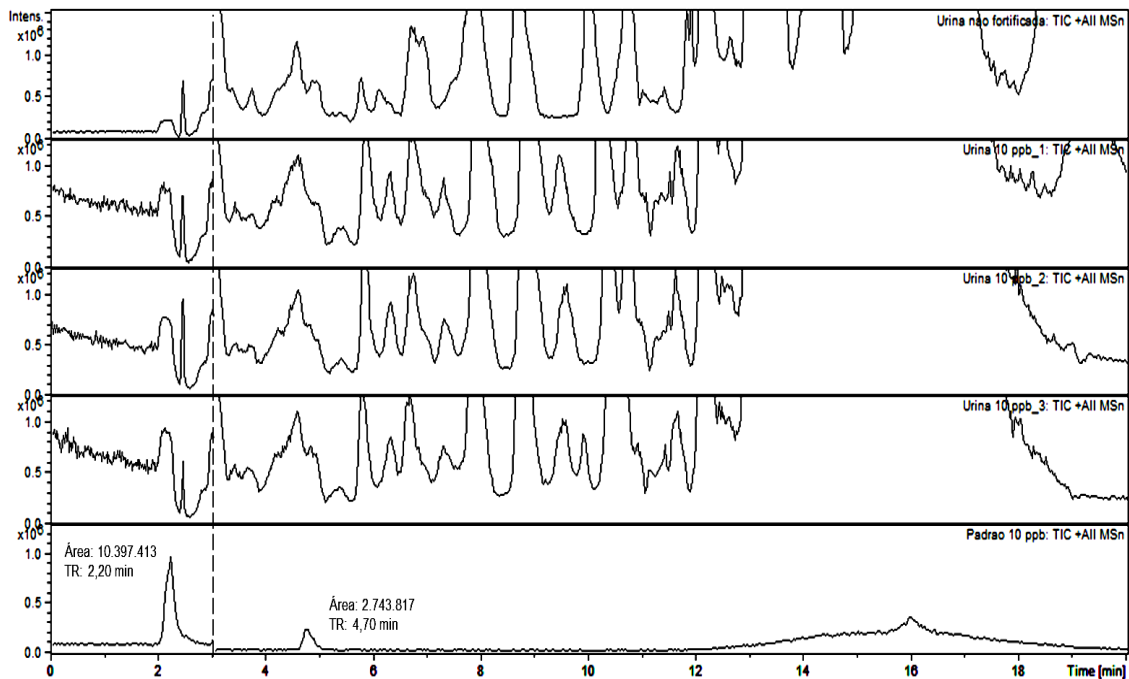


Figura 8.31. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva de quatro extratos de urina acidificada, três dos quais fortificados com 0,5 μg da CYN.

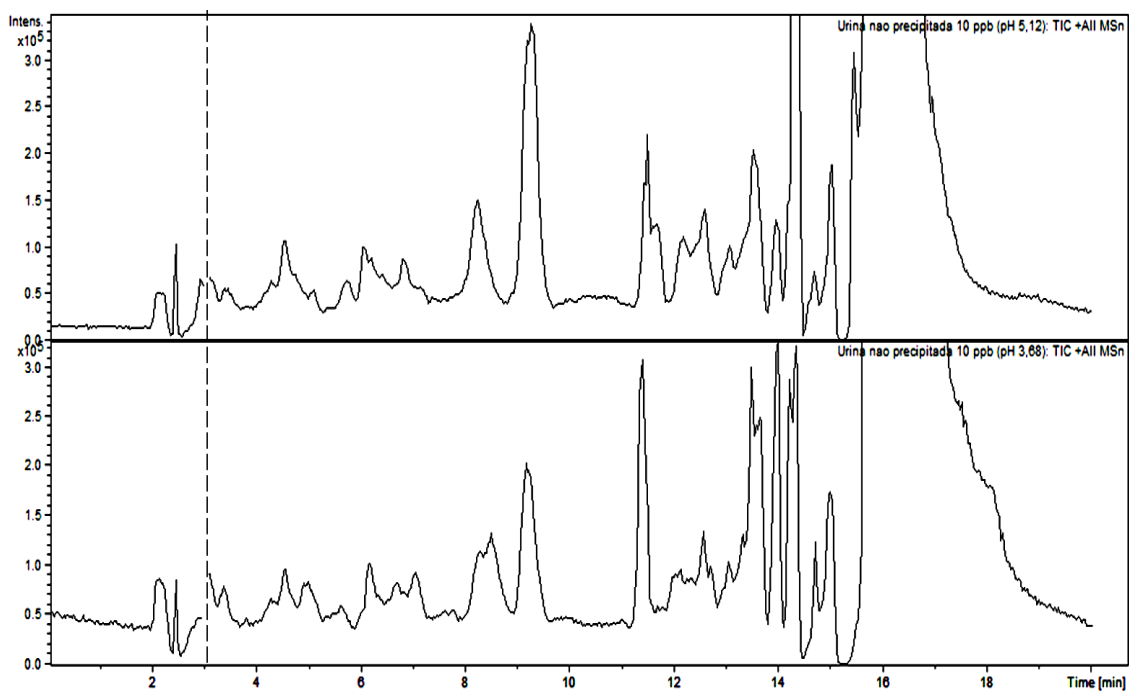


Figura 8.32a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva de duas amostras de urina não precipitada, acidificadas a valores de pH distintos e fortificadas com 1 μg da CYN.

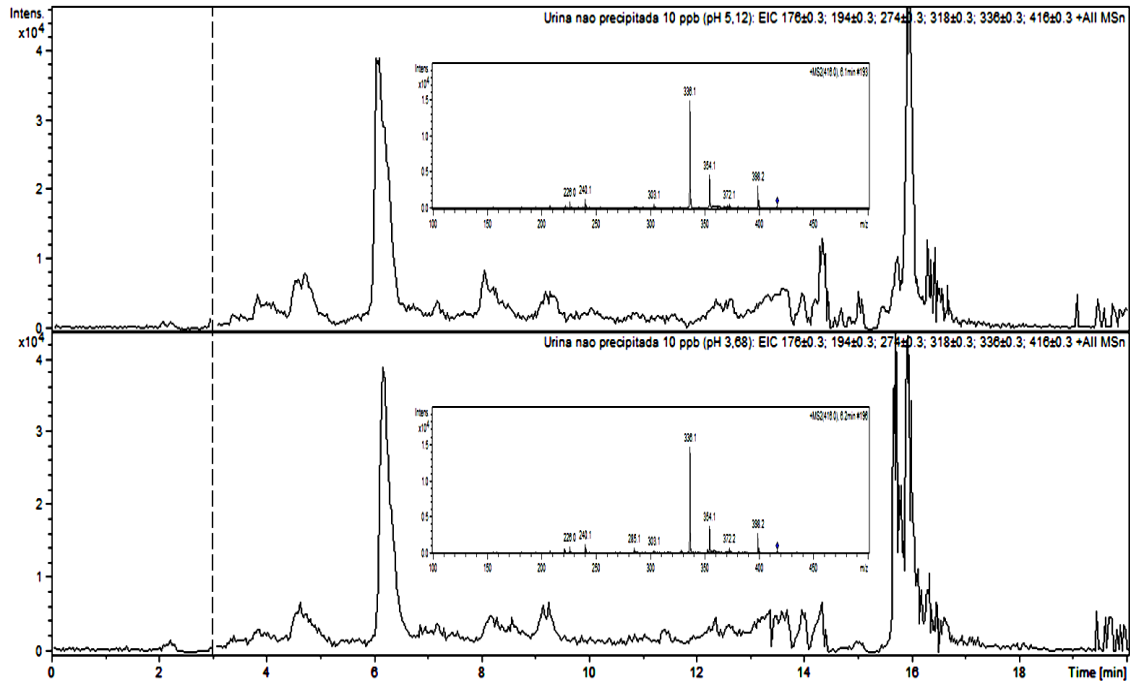


Figura 8.32b. Cromatogramas em modo EIC e espetros MS² com polaridade positiva de duas amostras de urina não precipitada, acidificadas a valores de pH distintos e fortificadas com 1 µg da CYN.

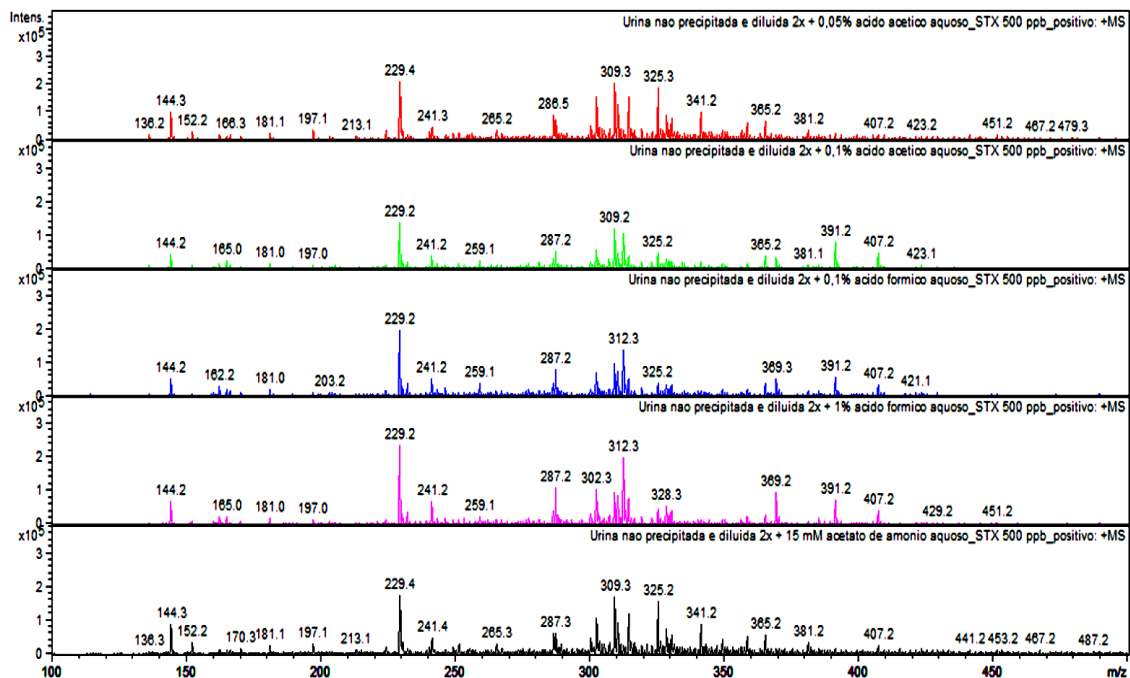


Figura 8.33. Espetros *full scan* com polaridade positiva de soluções diluídas de urina não precipitada, filtradas e fortificadas com a STX com a concentração de 500 µg/L, testando o sinal obtido do íon-parental variando o agente ionizante e a sua concentração.

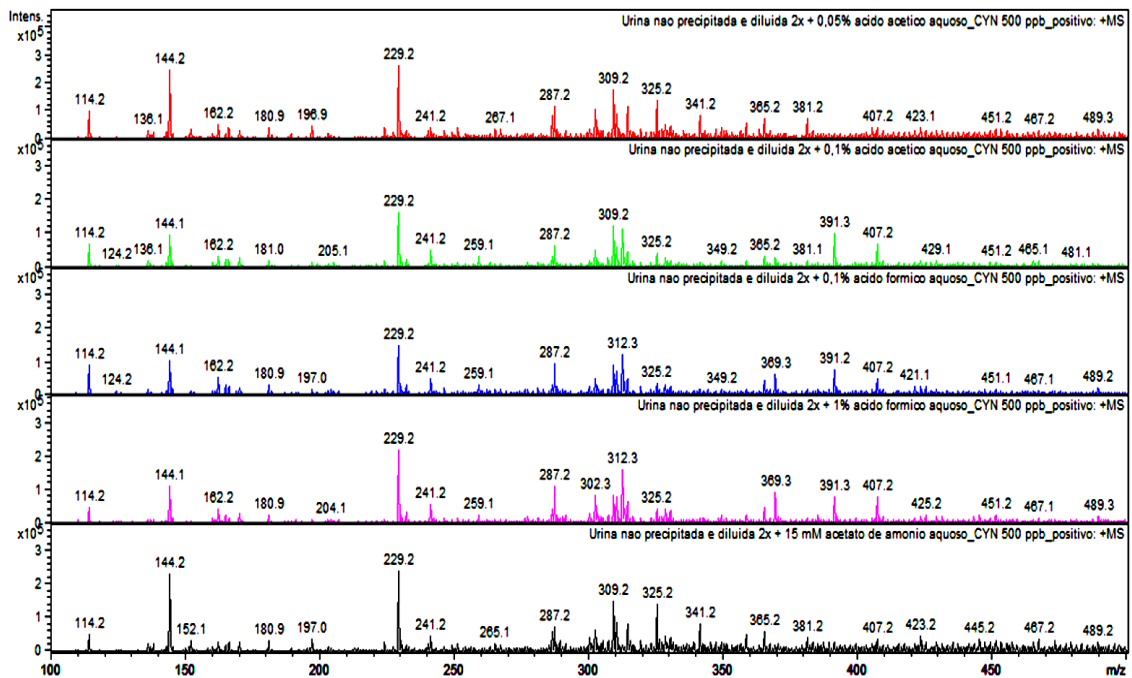


Figura 8.34. Espectros *full scan* com polaridade positiva de soluções diluídas de urina não precipitada, filtradas e fortificadas com a CYN com a concentração de 500 µg/L, testando o sinal obtido do íon-parental variando o agente ionizante e a sua concentração.

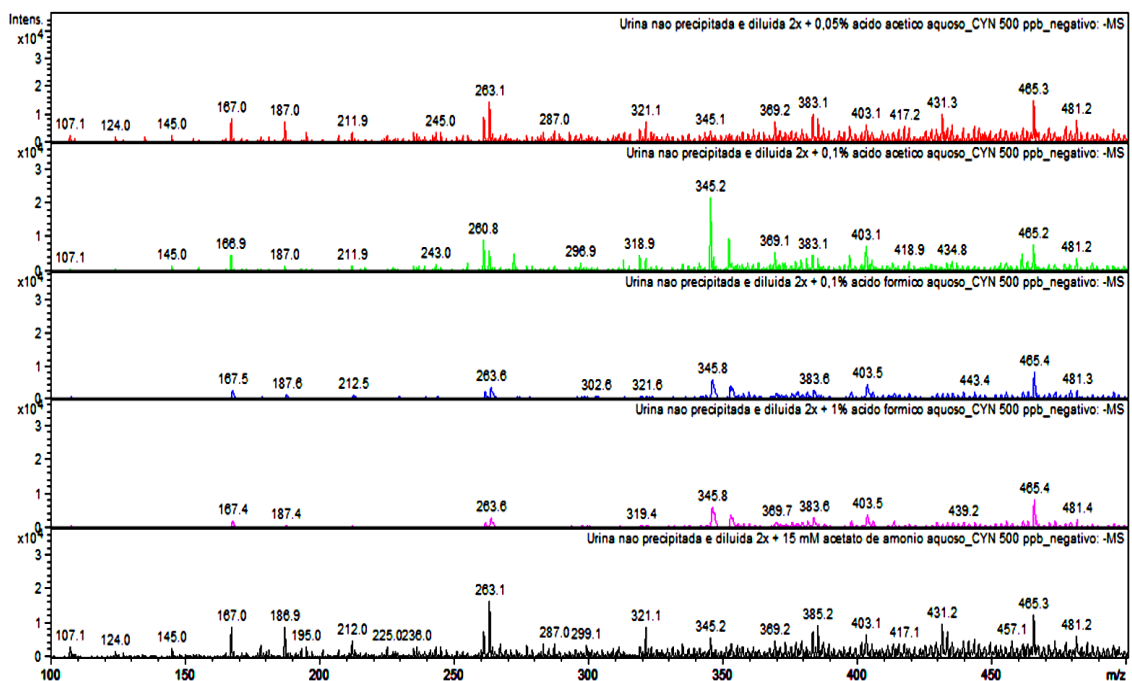


Figura 8.35. Espectros *full scan* com polaridade negativa de soluções diluídas de urina não precipitada, filtradas e fortificadas com a CYN com a concentração de 500 µg/L, testando o sinal obtido do íon-parental variando o agente ionizante e a sua concentração.

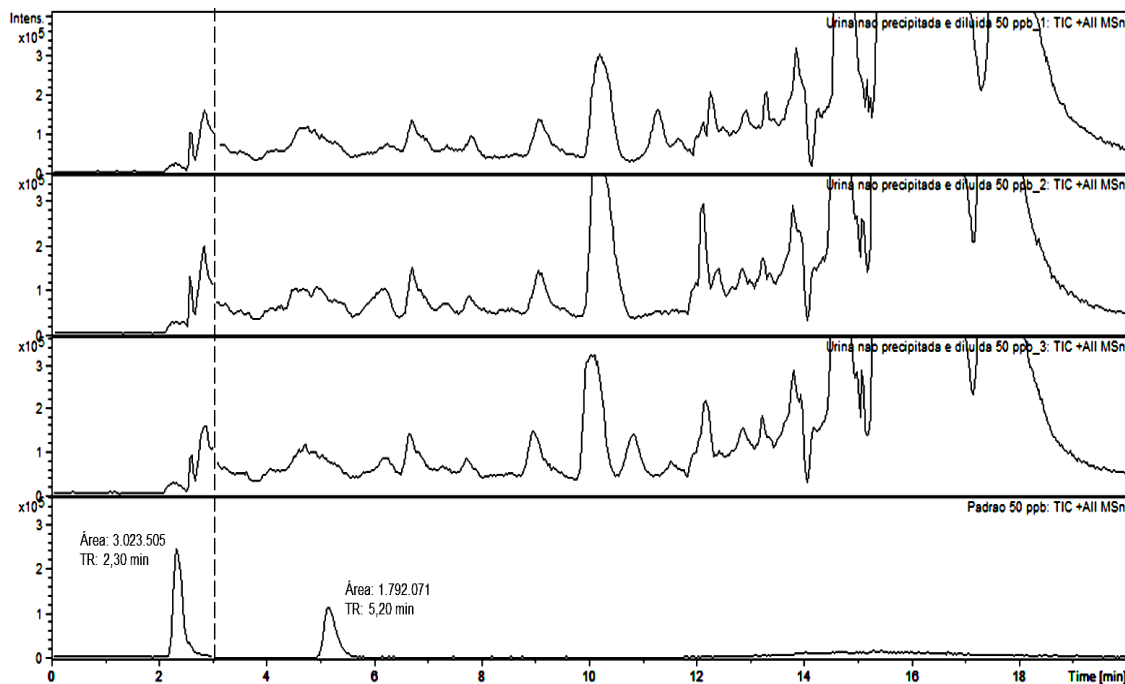


Figura 8.36a. Cromatogramas em modo TIC com polaridade positiva de amostras de urina não precipitada, diluídas de 1:10 e fortificadas com 5 µg da CYN.

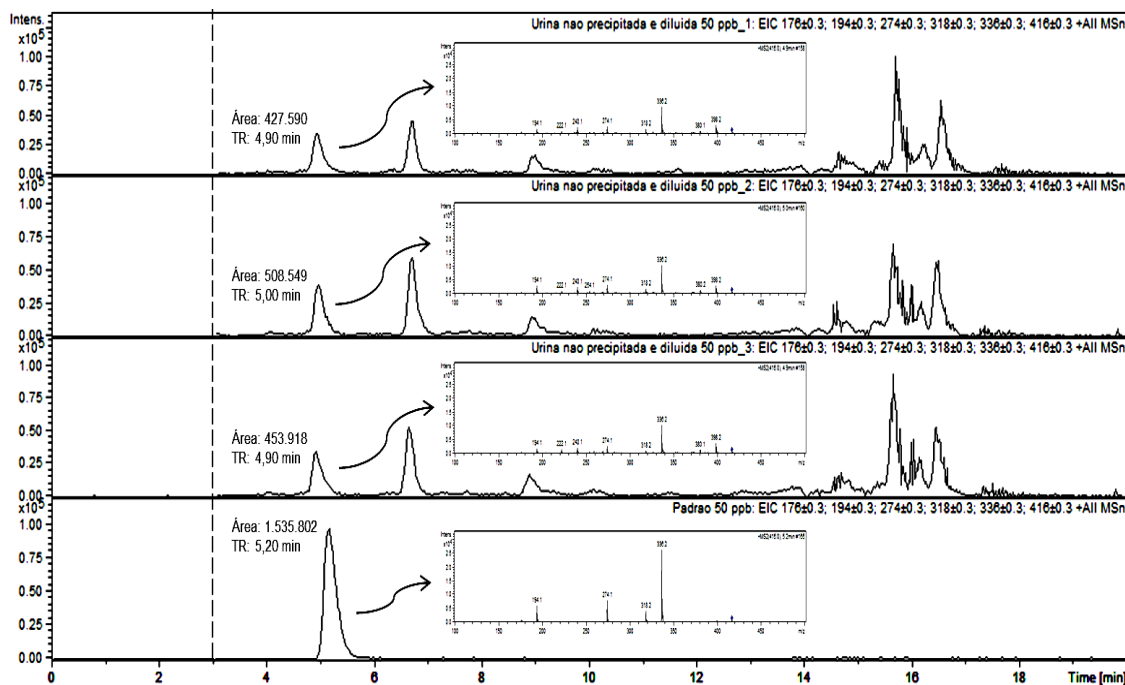


Figura 8.36b. Cromatogramas em modo EIC e espectros MS² com polaridade positiva de amostras de urina não precipitada, diluídas de 1:10 e fortificadas com 5 µg da CYN.

Notas
