UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia gasosa
acoplada à espectrometria de massas para a identificação e
quantificação de anatoxina-*a* em amostras de água e florações algais**

Vania Cristina Rodríguez Salazar

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto

SÃO PAULO
2006

Vânia Cristina Rodríguez Salazar

**Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia gasosa
acoplada à espectrometria de massas para identificação e
quantificação de anatoxina-*a* em amostras de água e florações**

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto
Orientador / presidente

Prof. Dr. Renato José Reis Molica
1º examinador

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
2º examinador

São Paulo, 19 de janeiro de 2007.

*A Deus por ter sido meu refugio e fortaleza
em todos os momentos da minha vida*

Aos meus pais, Saúl e Cristina, por serem meu exemplo de amor, honestidade e perseverança. As minhas irmãs Claudia e Marina pelo suporte e carinho. Agradeço que apesar da distância e a saudade, sempre me estimularam e apoiaram neste desafio.

*Ao Professor **Ernani Pinto**, pela confiança, paciência e carinho. E principalmente pela amizade e bom humor nas horas difíceis, “no final da tudo certo”.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Mauricio Yonamine**, grande amigo e excelente profissional, pelos sábios conselhos e toda a colaboração no desenvolvimento deste projeto.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todo o **corpo docente da Toxicologia** por terem me dado à certeza de que a Toxicologia é uma paixão de vida: Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, Profa. Dra. Sandra Farsky, Profa. Dra. Tânia Marcjurakis, Profa. Regina Lúcia Moraes, Profa. Dra. Ana Paula Loureiro, Profa. Dra. Alice Chasin.

A **Prof. Dra. Ana Paula Loureiro** e ao **Prof. Dr. Eduardo Purgatto** pelas preciosas sugestões no exame de qualificação.

A “família” do **Laboratório de Toxicologia Ambiental**: Fabyana, Vanessa, Paula, Stella, Sidnei, Raphael, Meron e Humberto, por terem se convertido em mais do que colegas, amigos e “irmãos acadêmicos”.

Ao **Filmon Solomon** pela amizade e grande ajuda na culminação deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do “**Solar dos Príncipes**”: Fabriciano, Rafael, Renato, Tiago, Rodrigo e George pela amizade incondicional e todos os momentos de alegria proporcionados.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas (**LAT**): Ângelo Ballestrini, Felipe Dörr, Karla de Souza, Roseli Ramos, Carmen Antunes, Dalva Moura, Luzia Valderrama, Helena de S. Francisco, Mônica Sampaio por todo o carinho que sempre me demonstraram.

Aos meus entranháveis amigos “toxicologistas” do curso de pós-graduação, em especial: Alexandre, Sandra, Daniela Mendes, Igo, Raphael, Kaline, Renata,

Verónica, Suellen, Daniela Maia, Cristina, Willian, Carol, Marly, Virginia, Julita, Leandro e Cecília pela amizade conquistada.

Ao pessoal do Laboratório do **Prof. Dr. Pio Colepicolo**: Karina, Ângela, Sara, Anderson, Moacir, Marcelo, Ednailson, Vanessa, Sandrinha pela amizade.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação da Faculdade de Farmácia: Jorge e Elaine por sempre estarem prestes a esclarecer as dúvidas, pela amizade e pela ajuda inestimável.

Ao Nelson, Petra, Noemi, Roxana, Hugo, Eder, Mônica companheiros de convívio e amigos.

Aos meus tios **Hector** e **Yolanda**, que me acolheram na sua casa como uma filha.

A **Fabyana** e ao **Alexandre** pelo suporte emocional nos momentos mais difíceis.

As minhas grandes amigas e “irmãs à distância” **Marita**, **Charito** y **Patty**, pela constante torcida.

A todos os que talvez não mencionei de nome, mas que me incentivaram para continuar na luta do dia a dia.....

A toda a maravilhosa família brasileira que me acolheu com os braços abertos e me ensinou que as fronteiras somente são invenções do homem para traçar limites entre as nações...

Meus agradecimentos.

RESUMO

Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para identificação e quantificação de anatoxina-*a* em amostras de água e florações algais

Vania Cristina Rodriguez Salazar, Ernani Pinto – Mestrado

A poluição dos corpos d'água é de grande preocupação mundial, pois a maioria da população utiliza a água doce de reservatórios, represas ou rios como principal fonte de água potável. A presença no Brasil de florações de cianobactérias capazes de produzir anatoxina-*a*, revela a necessidade de métodos simples e rápidos que permitam sua detecção e monitoramento.

Neste trabalho foram desenvolvidos, otimizados e validados dois métodos analíticos por GC/MS para identificação e quantificação de anatoxina-*a* em amostras de água e florações, respectivamente. A norcocaína foi usada como padrão interno em ambos os métodos. Os íons escolhidos para serem monitorados foram (íons quantificadores sublinhados): anatoxina-*a*: 191, 164, 293 e norcocaína: 195, 136, 168. As curvas de calibração dos métodos mostraram-se lineares nas faixas de 2.5-200 ng.mL⁻¹ e 13-250 ng.mg⁻¹. Os limites de detecção obtidos foram 2 ng.mL⁻¹ e 10 ng.mg⁻¹. Os métodos demonstraram sensibilidade e especificidade adequada para seu uso no monitoramento ambiental da anatoxina-*a*.

Palavras chave: anatoxina-*a*, SPME, SPE, GC/MS

E-mail: vaniaro@usp.br

SUMMARY

Development of analytical methods by gas chromatography/mass spectrometry for anatoxin-*a* identification and quantification in water and algae bloom samples

Vania Cristina Rodriguez Salazar, Ernani Pinto – Mestrado

The water pollution is a big concern around the world, since the most of cities use freshwater reservoirs, dams or rivers as the main drinking water suppliers. Cyanobacterial blooms capable to produce anatoxin-*a* are regularly present in Brazilian waters. Therefore, there is a necessity of simple and rapid analytical methods to monitor this cyanotoxin.

In the present work, two analytical methods by GC/MS for identification and quantification of anatoxin-*a* in water and algae bloom samples were developed, optimized and validated. Norcocaine was used as internal standard in both methods. The ions chosen to be monitored were (quantification ions underlined): anatoxin-*a* 191, 164, 293 and norcocaine: 195, 136, 168. Both method calibration curves showed linearity in the ranges of: 2.5-200 ng.mL⁻¹ and 13-250 ng.mg⁻¹. The obtained limit of detection were: 2 ng.mL⁻¹ and 10 ng.mg⁻¹. The methods showed sensitivity and specificity enough to be used routinely as a tool for anatoxin-*a* monitoring.

Keywords: anatoxin-*a*, SPME, SPE, GC/MS

E-mail: vaniaro@usp.br

ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CW – Carbowax
CV – Coeficiente de variação
CQA – Controle de qualidade alto
CQB – Controle de qualidade baixo
CQM – Controle de qualidade medio
CoAOC – Acetilcoenzima A
Da - Dalton
DVB – Divinilbenzeno
ECD – Detector de captura de elétrons
FLD – Detector de fluorescência
F_{tab} – F tabelado
F_{exp} – F experimental
GC – Cromatografia gasosa
GAC – Carvão ativado granulado
GST – Enzima glutathione transferase
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
HS-SPME – Microextração em fase sólida por *headspace*
IDA – Ingesta diária aceitável
inHg – Polegadas de mercúrio
IS – Padrão interno
K^{fw} – Constante de equilíbrio fibra água
LD₁ – Dose que pode causar morte para 1% da população tratada com um composto.
LD₅₀ – Dose capaz de provocar morte do 50% da população tratada com o toxicante.
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
LLE – Extração líquido-líquido
LC – Cromatografia líquida
mWs – miliwatts
m/z – razão massa/carga
NOAEL – Nível de um composto no qual não são observados efeitos adversos.
nAChR – Receptor nicotínico de acetilcolina
PSP – *Paralytic shellfish poisoning*
POD – Enzima peroxidase
PA – Poliacrilato
PDMS - Polidimetilsiloxano
%RE – Porcentagem de erro relativo
SPME – Microextração em fase sólida
SPE – Extração em fase sólida
SIM – Monitoramento seletivo de íons
UV – ultravioleta
µg.kg⁻¹ p.c. – micrograma. Kilograma de peso corpóreo
USEPA – Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente
WHO – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 POLUIÇÃO DAS ÁGUAS	1
1.2 EUTROFIZAÇÃO	2
1.3 CIANOBACTÉRIAS.....	2
1.4 CIANOTOXINAS.....	5
1.5 ANATOXINA-A	10
1.5.1 Características químicas da anatoxina-a.....	10
1.5.2 Biossíntese da anatoxina-a.....	11
1.5.3 Toxicologia da anatoxina-a.....	12
1.5.4 Toxicidade aguda da anatoxina-a.....	13
1.5.5 Toxicidade subaguda e crônica da anatoxina-a	16
1.5.6 Diretrizes para cianotoxinas.....	17
1.5.7 Processos de remoção e eliminação da anatoxina-a.....	18
1.6 DETERMINAÇÃO DE ANATOXINA-A	19
1.7 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	22
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 MATERIAIS.....	29
3.1.1 Soluções-padrão.....	29
3.1.2 Reagentes	29
3.1.3 Equipamentos e Acessórios	29
3.1.4 Amostras de referência	30
3.1.4.1 Amostras de referência negativa	30
3.1.4.2 Amostras de referência positiva	31
3.1.4.3 Amostras ambientais analisadas.....	31
3.2 MÉTODOS.....	32
3.2.1. Coleta das amostras.....	32
3.2.2. Desenvolvimento do método para determinação de anatoxina-a em água por SPME e GC/MS.....	32
3.2.2.1. Preparação da amostra.....	32
3.2.2.2 Condições cromatográficas	34
3.2.2.3 Escolha do agente derivatizante.....	35
3.2.2.4 Escolha do IS	36
3.2.2.5 Otimização do método por SPME-GC/MS	36
3.2.3 Desenvolvimento do método para determinação de anatoxina-a em florações por SPE- GC/MS.....	37
3.2.3.1 Preparo da amostra	37
3.2.3.2 Otimização do método por SPE-GC/MS	40

3.2.4 Validação dos métodos.....	41
3.2.4.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	42
3.2.4.2 Linearidade	42
3.2.4.3 Repetibilidade	44
3.2.4.4 Recuperação	44
3.2.4.5 Seletividade.....	45
3.2.5 Testes usando extração líquido-líquido (LLE).....	45
3.2.5.1 Procedimento I	45
3.2.5.2 Procedimento II	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ESCOLHA DO AGENTE DE DERIVATIZAÇÃO.....	49
4.1.1 Derivatização com alquilcloroformatos	49
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ESCOLHA DO IS.....	53
4.2.1 Testes realizados com norcoína.....	54
4.2.2 Testes realizados com a bupivacaína.....	60
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR SPME-GC/MS.....	62
4.3.1. Estudo do efeito salting out.....	62
4.3.1. Estudo da concentração de agente derivatizante	63
4.3.1. Estudo do tempo de extração de anatoxina-a.....	65
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR SPME-GC/MS.....	66
4.4.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	66
4.4.2 Linearidade	67
4.4.3 Repetibilidade	70
4.4.4 Seletividade.....	70
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR SPE-GC/MS	72
4.4.1 Resultados com o cartucho Supelclean LC-Si	72
4.4.2 Resultados com o cartucho Sep- Pak C ₁₈	73
4.4.3. Resultados com o cartucho Bond Elut Certify.....	75
4.4.4 Resultados e discussão da otimização do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.....	78
4.4.4.1 Resultados do estudo da influência do volume de acetonitrila	78
4.4.4.2 Resultados do estudo da concentração de hexilcloroformato	78
4.4.4.3 Resultados da influência do tempo de sonicação.....	78
4.4.4.4 Resultados da influência do pH.....	79
4.5 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR SPE(BOND ELUT CERTIFY)GC/MS.....	80
4.5.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	80
4.5.2 Linearidade	81
4.5.3 Repetibilidade	82

4.5.4 Recuperação	83
4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS TESTES COM LLE.....	83
4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE DE AMOSTRAS AMBIENTAIS	84
4.7.1 Resultados obtidos por microscopia óptica	84
4.7.2 Resultados obtidos por SPME-GC/MS.....	85
4.7.3 Resultados obtidos por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.....	86
5. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8. ANEXOS	

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência documentada de cianobactérias em água doce e marinha.....	4
Tabela 2: Estrutura química das principais cianotoxinas.....	7
Tabela 3. Doses letais da anatoxina-a usando diferentes vias de administração.	14
Tabela 4. Métodos analíticos para determinação de anatoxina-a publicados nas últimas duas décadas.	22
Tabela 5: Teste de homocedasticidade da curva de calibração do método para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS	69
Tabela 6: Porcentagens de Erro Relativo (%RE) obtidos da análise por regressão linear ponderada do método para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS.....	69
Tabela 7: Teste de homocedasticidade da curva de calibração do método para determinação de anatoxina-a florações por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição das águas

A água é a molécula de maior importância para todas as formas de vida na Terra. Entretanto, os problemas ambientais referentes à preservação das águas superficiais e subterrâneas têm-se agravado muito nas últimas décadas, principalmente, em razão do crescimento populacional e do conseqüente aumento da atividade industrial. Por estes motivos, a legislação referente à poluição das águas vem sendo cada vez mais restritiva e com maior fiscalização (TIBURTIUS, 2004).

O termo poluição da água pode ser entendido como uma alteração de suas características por quaisquer ações ou interferências, sejam elas, naturais ou provocadas pelo homem. Existem vários tipos de poluição, os principais são:

- (i) Poluição natural - É o tipo de poluição não associada à atividade humana, causada por chuva, escoamento superficial, salinização, decomposição de vegetais e animais mortos;
- (ii) Poluição industrial - Referem-se aos resíduos gerados nos processos industriais de uma maneira geral;
- (iii) Poluição urbana - É aquela proveniente da população urbana, que gera esgoto doméstico lançado direta ou indiretamente nos corpos d'água. O esgoto doméstico contém, além de matéria orgânica, sabões e detergentes, sendo considerado um dos principais fatores de poluição de águas em regiões densamente povoadas;
- (iv) Poluição agrícola - Decorrente de atividades ligadas à agricultura e pecuária por meio de defensivos agrícolas, fertilizantes, excrementos de animais e erosão (BRAGA *et al.*, 2002).

1.2 Eutrofização

A poluição dos corpos d'água piora a sua qualidade, principalmente no que diz respeito à utilização para consumo humano. A poluição acarreta sérios problemas para a saúde pública e ao meio ambiente (KUJBIDA, 2005). Uma das conseqüências da poluição das águas é o fenômeno de eutrofização, com o decorrente aparecimento de florações de algas, algumas tóxicas em águas doce e marinha (SVERCK *et al.*, 2004).

A eutrofização pode ser definida como um aumento da concentração de nutrientes e matéria orgânica num ecossistema aquático, entre eles os fosfatos e nitratos. A eutrofização pode ser de origem natural ou artificial. Na eutrofização natural os nutrientes são trazidos, por exemplo, pelas chuvas que erodem e lavam a superfície terrestre, ocasionando a lenta e gradual eutrofização dos corpos d'água. Na eutrofização artificial, também chamada de eutrofização antrópica, há um aceleração do processo, com interrupção dos ciclos biológicos e químicos. O aumento da concentração de nitratos e fosfatos em corpos d'água, pode levar a uma proliferação excessiva de algas e cianobactérias, fenômeno conhecido como floração. A utilização da água contaminada com florações de espécies produtoras de toxinas sem um tratamento eficaz, pode trazer efeitos nocivos à saúde. (BRAGA *et al.*, 2002; CARVALHO, 2005).

1.3 Cianobactérias

As cianobactérias (também chamadas algas verde-azuis) são microorganismos de origem extremamente remota que pertencem ao reino Monera (Procariontes), Divisão Cyanobacteria, Classe Cyanophyceae. São organismos muito estudados, tanto pela capacidade de alguns gêneros de converter N_2 em NH_3 , como por terem sido, provavelmente, um dos primeiros organismos responsáveis pelo lançamento de O_2 na atmosfera terrestre. Elas são bactérias unicelulares filamentosas ou coloniais, que podem habitar vários ambientes em função da sua grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes (energia luminosa, CO_2 , N_2 , água e alguns minerais), sendo encontradas tanto em água doce como salobra e marinha; bem como fontes

termais, geleiras, solos de desertos, etc. (SVERCK *et al.*, 2004; VIDOTTI *et al.*, 2004).

As florações de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradáveis na água, em razão da presença de geosmina e 2-metilisoborneol. Entretanto, o fato mais preocupante é que muitas espécies podem biossintetizar toxinas potentes com diversos mecanismos de ação, o que pode ocasionar riscos à população (ZAGATO *et al.* 1997, CARMICHAEL, 1994). O problema das florações de cianobactérias não se restringe a locais específicos, prova disso é a diversidade de países nos quais sua presença tem sido documentada (ver Tabela 1). Os incidentes toxicológicos relacionados com as cianotoxinas incluem intoxicações de seres humanos e animais, trazendo como consequência morte de gado, animais selvagens, domésticos e até seres humanos (CODD *et al.*, 1999; HUMPAGE *et al.*, 1994; TURNER *et al.*, 1990, JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Informações referentes ao Brasil relatam a presença de florações de cianobactérias pelo aumento de nutrientes nas águas em vários estados (DOMINGOS *et al.*, 1999; SANT'ANNA *et al.*, 2000; KOMARCK *et al.*, 2002).

Tabela 1. Ocorrência documentada de cianobactérias em água doce e marinha.

Continente	País
Asia	Bangladesh
	Índia
	Israel
	Japão
	Coréia do Norte e do Sul
	República da China
	Rússia
	Taiwan
	Tailândia
Africa	Egito
	Marrocos
	África do Sul
Europa	República Checa
	Dinamarca
	Finlândia
	França
	Alemanha
	Grécia
	Hungria
	Itália
	Latávia
	Holanda
	Noruega
	Polônia
	Portugal
	Suécia
	Ucrânia
	Reino Unido
América do Sul	Argentina
	Brasil
	Chile
América do Norte	Bermuda
	Canadá (Alberta, Colômbia britânica, Manitoba, Ontário, Saskatchewan)
	USA [Califórnia, Colorado, Flórida, Hawai (somente no mar), Idaho, Illinois, Indiana, Iowa, Michigan, Minnesota, Mississippi, Montana, Nebraska, Nevada, Nova Hampshire, Novo México, Nova Iorque, Dakota do Norte, Ohio, Oklahoma, Oregon, Pensilvania, Dakota do Sul, Texas, Washington, Wisconsin, Wyoming].
Oceania	Austrália

Fonte: Adaptado de SVERCK *et al.*, 2004.

1.4 Cianotoxinas

As cianotoxinas são consideradas produtos do metabolismo secundário das cianobactérias e podem causar efeito deletério em tecidos, células ou organismos. Sua função na natureza não é clara, existe uma hipótese de que seriam produzidas com a função biológica de defesa, já que elas inibiriam a predação das cianobactérias pelo zooplâncton. As cianotoxinas podem permanecer no interior da célula ou serem liberadas para o meio (LEE, 1991; CARMICHAEL, 1992, CHORUS *et al.*, 2003).

Seus mecanismos de ação são diversos, podendo ser hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas, promotoras de inibição da síntese de proteínas ou produtoras de alteração no sistema imune (QUILLIAM, 1999; KUJBIDA *et al.*, 2006).

As hepatotoxinas consistem em peptídeos cíclicos, cujo órgão alvo é o fígado. As mais estudadas são as microcistinas (produzidas principalmente pelo gênero *Microcystis sp.*, entre outros gêneros), heptapeptídeos cíclicos, responsáveis pelo primeiro relato toxicológico relacionado com cianotoxinas envolvendo humanos. Este acidente aconteceu na cidade de Caruaru (Açude Tabocas), Estado de Pernambuco, onde aproximadamente 150 pacientes que realizavam hemodiálise no hospital da cidade foram expostos a microcistinas, levando à morte quase 50% destes pacientes (POURIA *et al.*, 1998; JOCHIMSEN *et al.*, 1998, CARMICHAEL *et al.* 2001). Outras hepatotoxinas de importância são as nodularinas, pentapeptídeos cíclicos, que da mesma forma que as microcistinas são reconhecidas como potentes inibidores de fosfatases do tipo 1 e 2A (MACKINTOSH *et al.*, 1990) e indutoras de tumor (UENO *et al.*, 1996). A cilindrospermopsina, estruturalmente diferente das hepatotoxinas mencionadas, é um alcalóide guanidínico citotóxico que na sua forma livre é predominantemente hepatotóxica, além de induzir sintomas patológicos em outros órgãos como rins, baço, intestino, timo, coração e olhos (SVERCK *et al.*, 2004).

No grupo das neurotoxinas estão:

- (i) saxitoxinas e seus análogos chamados *paralytic shellfish poisoning* (PSP) que bloqueiam os canais de sódio na membrana dos neurônios;
- (ii) anatoxina-a(s) (“s” de salivação) que age como inibidor irreversível da acetilcolinesterase e
- (iii) anatoxina-a, um potente agonista nicotínico da acetilcolina, e seu análogo metilênico homoanatoxina-a

(SVERCK *et al.*, 2004)

As dermatotoxinas são produzidas basicamente por cianobactérias marinhas, dentre elas estão as aplisiatoxinas e debromoapliasiatoxinas que causam inflamação, e a lingbiatoxina-a que produz dermatite e severa inflamação gastrintestinal (SVERCK *et al.*, 2004). As estruturas químicas e o mecanismo de ação das principais cianotoxinas são apresentadas na tabela 2.

Dentre os gêneros de cianobactérias produtores de toxinas estão: *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL *et al.*, 1989, BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Embora existam várias vias de exposição às cianotoxinas, tais como ingestão de água contaminada, suplementos dietéticos, inalação, contato com a pele e hemodiálise, a maneira mais comum destas toxinas ingressarem no corpo é através do consumo de água contaminada. Por esta razão, há grande interesse na regulamentação das cianotoxinas na água para o consumo humano (SVERCK *et al.*, 2004).

Tabela 2: Estrutura química das principais cianotoxinas.

NOME	ESTRUTURA QUIMICA	FONTES	MECANISMO DE AÇÃO	LD ₅₀ (µg.kg ⁻¹ p.c.) via i.p. (camundongo)
HEPATOTOXINAS				
Microcistina-LR		<i>Microcystis, Nostoc, Anabaena, Oscillatoria</i>	Hepatotóxico, promotor de tumor, inibidor de fosfatases	50
Nodularina-R		<i>Nodularia</i>	Hepatotóxico, promotor de tumor, inibidor de fosfatases	50
Cilindrospermopsina		<i>Aphanizomenon, Cylindrospermopsis</i>	Hepatotóxico, inibidora de síntese proteica	2.10 ³
...continuação Tabela 2				

 NEUROTOXINAS

Saxitoxina

Aphanizomenon

Neurotóxico, bloqueador de canais de sódio

10

Anatoxina-a(s)

Anabaena flos-aquae

Neurotóxico, inibidor de colinesterase

20

Anatoxina-a

Anabaena,
Aphanizomenon,
Planktothrix
(Oscillatoria)

Neurotóxico, despolarizador e bloqueador de junção neuromuscular

375

...continuação Tabela 2

DERMATOTOXINAS

Debromoaplesiatoxina

*Lyngbya, Schizothrix,
Planktothrix*

Inflamação na pele,
promotor de tumor

Não definida

Lingbiatoxina

Lyngbya

Inflamação na pele e no
trato
gastrointestinal

Não definida

1.5 Anatoxina-A

1.5.1 Características químicas da anatoxina-a

A anatoxina-a (2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno) foi a primeira cianotoxina a ser elucidada quimicamente (DEVLIN *et al.*, 1977). Ela é um alcalóide que estruturalmente apresenta um anel heterocíclico nitrogenado de baixa massa molecular, com 165 Da e pK_a 9,4 (KOSKINEN *et al.*, 1985; CHORUS & BARTRAM, 2003).

Sabe-se que a anatoxina-a é produzida por mais de uma espécie de cianobactéria como: *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria sp.*, *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis sp.* e *Microcystis aeruginosa* (RAPALA *et al.*, 1994, DITTMANN *et al.*, 2006).

Vários estudos têm examinado os níveis de anatoxina-a em reservatórios de água doce seguido da aparição de florações (JAMES *et al.*, 1997a). Até o momento, todos os casos de incidentes toxicológicos relacionados com a anatoxina-a levaram à morte de animais em poucos minutos. Por exemplo, alguns destes relatos incluem morte de gado na Finlândia, cachorros na Escócia, Irlanda e França e flamingos no Quênia (SIVONEN *et al.*, 1990; EDWARDS *et al.*, 1992; JAMES *et al.*, 1997b; KRIENITZ *et al.*, 2003; GUGGER *et al.*, 2005).

De acordo com Dittmann *et al.* (2006), a anatoxina-a age como um potente agonista nicotínico, pois se liga irreversivelmente ao receptor nicotínico da acetilcolina (nAChR) na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular, impedindo a despolarização destes receptores no músculo esquelético estriado de mamíferos.

Foi sugerido que a ativação do nAChR pós-sináptico pela anatoxina-a resulta em um fluxo de sódio para o interior da célula, produzindo despolarização local suficiente para abrir os canais desse cátion e também os canais de cálcio dependentes de voltagem. A célula posterior pode amplificar a resposta, ativando mais canais de cálcio (SOLIAKOV *et al.*, 1975). Desta maneira, o neurônio chega a um estado de esgotamento e produz um bloqueio da transmissão elétrica decorrente desta despolarização. Conseqüentemente, a

musculatura é super estimulada, podendo chegar à fadiga. Se os músculos respiratórios são comprometidos pela ação da anatoxina-a, o abastecimento de oxigênio é interrompido e são afetadas principalmente as funções cerebrais causando convulsões seguidas de sufocação (CARMICHEL, 1997, DITTMANN *et al.*, 2006).

Os sintomas observados poucos minutos após alguns animais terem sido expostos à anatoxina-a por via oral (ingestão de água doce contaminada) foram: fasciculação muscular, convulsões e morte por parada respiratória (CARMICHAEL *et al.*, 1989).

1.5.2 Biossíntese da anatoxina-a

São poucos os trabalhos encontrados na literatura referentes à biossíntese da anatoxina-a por cianobactérias. Dessa forma, este processo ainda não foi completamente elucidado. Estruturalmente, a anatoxina-a está relacionada com os alcalóides de plantas superiores que têm um anel tropano. Gallon *et al.* (1994) sugeriram uma analogia entre a biossíntese da anatoxina-a e dos alcalóides tropânicos. Eles propõem que anatoxina-a seria formada a partir dos aminoácidos ornitina e arginina via putrescina, e essa, por sua vez, se oxidaria formando a pirrolina, um possível precursor da anatoxina-a (Figura 1).

Figura 1. Rota de biossíntese da anatoxina-a proposta por Gallon *et al.* (1994).

Entretanto, os resultados obtidos em outro estudo que usou compostos marcados com ^{13}C , demonstraram que o esqueleto dessa molécula seria

originado do acetato e do glutamato. O C-1 do ácido glutâmico ficaria retido durante a formação da anatoxina-*a*. Conseqüentemente, este carbono seria mantido após a descarboxilação, fato incompatível com a rota de síntese proposta por Gallon *et al.* (GALLON *et al.*, 1994, HEIMSCHEIDT *et al.*, 1995). A figura 2 mostra a rota de biossíntese da anatoxina-*a* proposta por Heimscheidt *et al.* (1995), posteriormente adotada por Namikoshi *et al.* (2004) no estudo da rota de síntese da homoanatoxina-*a* (análogo metilênico da anatoxina-*a*) com uma única variante. Nesse caso, a síntese da homoanatoxina-*a* teria uma etapa a mais que estaria relacionada à formação da cadeia lateral (substituinte etila proveniente da *L*-metionina).

Figura 2. Rota de biosíntese da anatoxina-*a* proposta por Namikoshi *et al.* (2004).

1.5.3 Toxicologia da anatoxina-*a*

A avaliação de risco de um toxicante é um processo sistemático pelo qual o perigo, a exposição e o risco de um composto são identificados e quantificados. A evidência dos efeitos adversos à saúde humana produzidos por toxicantes como as cianotoxinas deriva principalmente de estudos epidemiológicos referentes à intoxicação de humanos, animais e outros estudos toxicológicos. A exposição às cianotoxinas é raramente quantificada e não pode

ser diretamente extrapolada à população humana. Este fato é mais evidente no caso da anatoxina-a e outros alcalóides neurotóxicos como anatoxina-a(s), por somente terem sido descritos casos de morte de animais por intoxicação aguda (CHORUS *et al.*, 2003).

A informação disponível para estabelecer a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) da maioria das cianotoxinas é insuficiente. Idealmente, este valor deriva de estudos em humanos, entretanto, por razões óbvias este tipo de estudo não existe para a maioria dos compostos. Geralmente são usados ensaios em animais, porém, eles têm pouca chance de prever a toxicidade por administração oral. A tentativa de propor a dose de $120 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia, como valor de nível de efeito adverso não observado (NOAEL) para o hidrocloreto de anatoxina-a foi considerada inadequada pois era baseada em dados toxicológicos insuficientes (CHORUS *et al.*, 2003).

Em razão de limitações como a indisponibilidade de amostra para os ensaios, variabilidade de cepas produtoras de uma mesma cianotoxina, poucos estudos referentes à sua biotransformação no organismo, entre outros, os processos envolvidos na toxicocinética e toxicodinâmica das cianotoxinas não estão completamente esclarecidos, exceto alguns aspectos referentes à microcistina-LR. Com relação à anatoxina-a, atualmente, existem alguns estudos experimentais de toxicidade aguda, sub-aguda e crônica, teratogenicidade e principalmente, estudos farmacológicos referentes ao seu potencial como agonista nicotínico.

1.5.4 Toxicidade aguda da anatoxina-a

A Tabela 3 apresenta os valores da LD₁ (dose que pode causar a morte em 1% da população tratada com anatoxina-a) e LD₅₀ (dose capaz de provocar a morte em 50% da população tratada com anatoxina-a) obtidos a partir de estudos sobre avaliação da toxicidade aguda da anatoxina-a administrada por diferentes vias em animais de experimentação.

Tabela 3. Doses letais da anatoxina-a usando diferentes vias de administração.

LD	Via	Dose ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ peso corpóreo)	Animal	Referência
LD ₁	i.p.*	250	camundongo	STEVENS <i>et al.</i> , 1989
LD ₅₀	i.p.*	375	camundongo	FITZGEORGE <i>et al.</i> , 1994
LD ₅₀	i.p.*	200	rato	CARMICHAEL, 1992
LD ₅₀	i.v.**	<100	camundongo	FAWELL <i>et al.</i> , 1994
LD ₅₀	Oral	>5000	camundongo	FAWELL <i>et al.</i> , 1994
LD ₅₀	i.n.***	2000	camundongo	FAWELL <i>et al.</i> , 1994

*i.p.= intraperitoneal; **i.v.= intravenosa; *** i.n.= intranasal.

A partir dos primeiros estudos sobre a atividade farmacológica e toxicológica da anatoxina-a foram realizados vários trabalhos referentes à potência desta toxina sobre os diferentes tipos de nAChRs, tanto pré como pós-sináptico. Alguns autores sugerem que uma pequena taxa de anatoxina-a se ligaria a receptores muscarínicos colinérgicos pois ela teria um efeito estimulante nos gânglios de músculo liso de porco, levando a um leve aumento da pressão sanguínea. (CARMICHAEL *et al.*, 1979; CARMICHAEL, 1997; MARCHI, M. *et al.* 2002; CAO, Y. *et al.* 2004, BARIK *et al.*, 2006).

Swanson *et al.* (1986) foram os primeiros a propôr que o estereoisômero (+) da anatoxina-a teria maior atividade do que o estereoisômero (-), pois a forma (+) apresentou maior afinidade pelo receptor nicotínico. Dez anos mais tarde, Alkondon *et al.* (1995) realizaram uma análise comparativa do grau de potência de isômeros de alguns agonistas nicotínicos na geração de corrente tipo IA e IIA em neurônios do hipocampo de rato. Neste experimento, os

isômeros ópticos de anatoxina-*a* foram os mais estereoseletivos, comparados com os isômeros da nicotina, epibatidina e outros agonistas nicotínicos, já que (+) anatoxina-*a* demonstrou ser mais potente do que o isômero (-). No entanto, cabe salientar que as correntes de tipo I parecem ser produzidas pelo subtipo de receptor nicotínico α_7 e as de tipo II ao subtipo $\alpha_4\beta_2$. Portanto, sugere-se que a anatoxina-*a* poderia preferencialmente se ligar a estes dois subtipos de receptores.

Com respeito à influência da anatoxina-*a* sobre outros sistemas neurológicos, existem trabalhos interessantes que relatam a possível atividade da anatoxina-*a* na complexa interligação entre os sistemas neurológicos (colinérgico, dopaminérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e GABAérgico). Alguns deles descrevem a atividade da anatoxina-*a* na liberação de neurotransmissores, principalmente pela sua afinidade aos subtipo de nAChR α_7 e $\alpha_4\beta_2$ que estão estreitamente ligados as funções cerebrais cognitivas e de memória (MARCHI, M. *et al.* 2002; CAO, Y. *et al.* 2004, BARIK *et al.* 2006). Um estudo *in vivo* realizado em ratos por Dube *et al.* (1996) mostrou que a anatoxina-*a* estimula o sistema simpático por meio da liberação de catecolaminas nos terminais nervosos. Esta propriedade da anatoxina-*a* foi corroborada por estudos *in vitro*, que verificaram que tanto a mistura racêmica de ($\pm$) anatoxina-*a* quanto a (+) anatoxina-*a* têm igual ou maior potência do que a nicotina, pois ambas estimularam a secreção de catecolaminas endógenas a partir de células cromafins de tecido adrenal bovino e de terminais do nervo estriado do hipocampo de rato (DALIT *et al.*, 1998; MOLLOY *et al.*, 1995).

Atualmente, são escassos os estudos referentes ao efeito da anatoxina-*a* em células não-neuronais. Um deles foi o realizado por Lakshmana *et al.* (2002) o qual relata a apoptose celular provocada pela anatoxina-*a* em timócitos de rato e citotoxicidade em células renais de macaco (células Vero). A citotoxicidade foi caracterizada pela perda de viabilidade celular, liberação da enzima lactato-desidrogenase, perda da função mitocondrial e fragmentação de DNA. Os resultados sugeriram que a morte celular observada teria sido mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio e ativação da via das caspases (família de cisteína-proteases que controlam a cascata proteolítica do processo apoptótico).

Referente ao efeito da anatoxina-a em plantas, alguns testes de laboratório com a planta aquática *Lemna minor* e a macroalga filamentosa *Cladophora fracta* mostraram que houve um aumento significativo na atividade enzimática da peroxidase (POD) em ambos os organismos estudados. Depois de quatro dias de exposição a uma concentração de anatoxina-a de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($P < 0,05$), observou-se aumento da atividade da enzima glutathione-transferase (GST) e uma redução na produção de oxigênio fotossintético da planta *L. minor* (MITROVIC *et al.*, 2004).

Resultados experimentais obtidos por Smith (1996) utilizando outros organismos aquáticos num criadouro australiano sugeriram que a primeira causa de morte de camarões durante quatro episódios foi a presença de neurotoxinas produzidas pela cepa *Oscillatoria corakiana*. Nestes episódios foram evidenciados danos histopatológicos no trato digestivo dos camarões, da mesma forma que ensaios com cistos de *Artemia* mostraram toxicidade. Embora não tenha sido identificada a presença de cianotoxinas nesta cepa de cianobactéria, foi proposto que níveis sub-letais de neurotoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a e PSP) teriam enfraquecido os camarões, levando-os ao menor consumo de alimento e imunossupressão, tornando-os mais propensos à infecção bacteriana.

Ainda que não haja casos de morte em humanos relacionados à anatoxina-a, o risco não deve ser descartado. Outros sintomas que também estão relacionados aos gêneros de cianobactérias produtoras de anatoxina-a envolvem doenças gastrintestinais agudas, dermatite alérgica e mal-estar geral, atribuídos aos extratos de *Anabaena flos-aquae* (HARADA *et al.*, 1989).

1.5.5 Toxicidade subaguda e crônica da anatoxina-a

Os estudos sobre a toxicidade subaguda e crônica da anatoxina-a são escassos, pois a maioria das neurotoxinas produzidas por algas leva à morte por tratamento agudo. Os poucos trabalhos existentes não evidenciaram sinais clínicos ou histopatológicos de toxicidade subaguda (mortes em razão da administração da toxina, mudanças importantes no peso, parâmetros hematológicos ou bioquímicos) nos animais tratados com diferentes doses de anatoxina-a (FAWELL *et al.* 1994; ASTRACHAN *et al.*, 1980). Entretanto, o fato

da anatoxina-a ter demonstrado alguma influência no aumento da atividade de enzimas importantes em plantas (GST e POD) pode indicar a possibilidade desse composto exercer um efeito indireto a médio ou longo prazo em proteínas com funções semelhantes em humanos. Por essas razões, os estudos com a anatoxina-a poderiam ser estendidos a outros sistemas enzimáticos e/ou vias bioquímicas em mamíferos para se compreender melhor o seu mecanismo de ação (RODRÍGUEZ, *et al.*, 2006a).

Embora existam vários grupos de pesquisa estudando as toxinas produzidas por cianobactérias, não há dados publicados de ocorrência de anatoxina-a ou análogos no Brasil. Somente a anatoxina-a(s) foi identificada no estado de Pernambuco, utilizando testes de inibição da enzima acetilcolinesterase e confirmada por LC/MS (MOLICA *et al.*, 2005).

1.5.6 Diretrizes para cianotoxinas

Dentre todas as cianotoxinas, a microcistina-LR (a variante mais estudada das microcistinas) é a única cujo valor de concentração máxima permitida em água potável ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (KUJBIDA, 2005). No caso da anatoxina-a, algumas entidades ambientais têm sugerido $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ como concentração máxima permitida em água potável (SVRCEK *et al.* 2004).

No Brasil, através da Portaria nº 1469/00 de janeiro de 2001 a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), passou a exigir o controle da microcistina-LR, sugerindo o monitoramento da cilindroespermopsina e saxitoxinas por parte dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água. O Ministério da Saúde em 2004, reformulou e revogou a Portaria nº 1469/00 por meio da Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, passando a exigir procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, obrigando o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

1.5.7 Processos de remoção e eliminação da anatoxina-a

Informações referentes à concentração das cianotoxinas nas águas superficiais são relativamente recentes. A prevenção da formação de florações de cianobactérias, através da prevenção da eutrofização dos corpos d'água, é a melhor medida de gerenciamento do controle de cianobactérias a longo prazo (SVCREK *et al.*, 2004). Se isto não é possível, o próximo passo é a utilização de algumas técnicas de engenharia para alterar as condições hidrofisiológicas do corpo d'água com o objetivo de reduzir o crescimento das cianobactérias. Muitos dos trabalhos sobre a remoção de cianotoxinas têm se focalizado em tratamentos somente de uma etapa, sendo poucas as pesquisas sobre combinações de processos usados no tratamento convencional (coagulação, clarificação e filtração) (CHORUS *et al.*, 2003).

Um dos principais fatores no gerenciamento do tratamento de água que visa à remoção das cianotoxinas leva em consideração a remoção de substâncias solúveis em água, pois as principais cianotoxinas estudadas (microcistinas, nodularinas e anatoxinas) são altamente hidrossolúveis (CHORUS *et al.*, 2003).

O uso de algicidas, como sulfato e citrato de cobre entre outros, é considerado como uma medida de emergência, portanto, segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO), devem ser usados com cautela. Este cuidado é devido ao fato de que a maioria das cianotoxinas são essencialmente intracelulares e estes agentes algicidas rompem a parede celular provocando a liberação das toxinas para o meio (CHORUS *et al.*, 2003).

A coagulação, outra técnica de tratamento de água, pareceria promissora na remoção de células de cianobactérias intactas. Entretanto, existem divergências entre os trabalhos publicados. Por exemplo, Keijola *et al.* (1988) afirmam que a combinação de agentes coagulantes como sulfato de alumínio e cloreto férrico, não conseguiram remover anatoxina-a em uma concentração de 20 µg.L⁻¹. Quando a anatoxina-a foi concentrada 10 vezes, estes mesmos agentes separados removeram diferentes percentagens de anatoxina-a (14% para sulfato de alumínio e 49% para cloreto férrico). No entanto, em um trabalho semelhante realizado por Falconer *et al.* (1989) foi reportado que o

sulfato de alumínio em uma concentração de 120 mg.L^{-1} e também combinado com alguns polieletrólitos, removeu aproximadamente 20% de uma floração neurotóxica de *Anabaena circinalis*. O uso de filtros de areia foi outra técnica que permitiu a diminuição da anatoxina-a em 70% (KEIJOLA *et al.*, 1988). Posteriormente, o uso de filtros de carvão ativado em pó (filtros do tipo carvão ativado granulado-GAC) se mostrou mais efetivo na adsorção de anatoxina-a do que na remoção de microcistina-LR (CARLILE *et al.* 1994).

Dentre as técnicas químicas de remoção, a cloração tem-se demonstrado praticamente ineficaz para anatoxina-a (concentrações de anatoxina-a testadas $5\text{-}10 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$), mesmo usando altas concentrações de cloro (15 mg.L^{-1}). O ozônio tem sido mais efetivo para destruição quase completa das microcistinas, nodularinas e anatoxina-a (HART *et al.*, 1997; ROSITANO *et al.*, 1994). Com respeito ao uso de outros agentes oxidantes, como o permanganato de potássio, eles podem produzir lise celular, levando a maior liberação de anatoxina-a. Portanto, esses procedimentos não são recomendáveis (CHORUS *et al.*, 2003). Por outro lado, a radiação ultravioleta foi eficiente na degradação tanto de microcistina-LR quanto de anatoxina-a, mesmo em doses muito altas (20000 mWs.cm^2 , sendo que a concentração normalmente usada para desinfecção é de 30 mWs.cm^2), tornando este procedimento pouco prático para sua utilização na redução de cianotoxinas (CROLL *et al.* 1996).

Recentemente, uma das técnicas mais modernas que tem apresentado bons resultados na remoção de anatoxina-a da água é a nanofiltração; no entanto não é uma técnica usada de forma rotineira e apresenta alto custo (GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE *et al.*, 2006).

1.6 DETERMINAÇÃO DE ANATOXINA-A

Aparentemente, a maioria das cianotoxinas uma vez biosintetizadas na fase de crescimento são mantidas no interior das células. De acordo com Chorus *et al.* (2003), a liberação de cianotoxinas para a água circundante pode acontecer, embora não exclusivamente, durante o período de envelhecimento celular onde ocorre morte e lise celular. Existem alguns indícios de que a anatoxina-a seria liberada da célula durante a etapa de crescimento,

especialmente em condições de baixa luminosidade (BUMKE-VOGT *et al.*, 1996).

Métodos que permitem a determinação quali e quantitativa de algumas cianotoxinas somente estiveram disponíveis a partir da década de oitenta e são várias as observações e cuidados a serem tomados, principalmente em razão da diversidade e da complexidade dos procedimentos envolvidos.

Nas primeiras tentativas de detectar anatoxina-*a* em amostras ambientais, foram propostos protocolos de bioensaios com animais. Porém, estes métodos permitiram somente determinar a toxicidade total (baseada na resposta) em poucas horas, sendo pouco sensíveis e específicos. Por outro lado, estes procedimentos não puderam monitorar níveis sub-letais nem diferenciar variantes (STEVENSON *et al.*, 1991, CHORUS *et al.*, 2003).

Em razão dos diversos tipos de matrizes passíveis de serem utilizadas na determinação de anatoxina-*a* (água, células liofilizadas, culturas de cianobactérias, etc.) dependendo das características de cada uma delas, os processos de preparação das amostras são diferentes. Procedimentos clássicos, tais como extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE), geralmente consomem muito tempo, são complexos e envolvem várias etapas (VAS *et al.*, 2004).

A LLE foi uma das primeiras técnicas de extração a ser usada nas determinações de anatoxina-*a*. No entanto a LLE, ela foi substituída pela SPE por apresentar algumas desvantagens, como por exemplo, requerer solventes orgânicos, estar sujeita a contaminação, recuperação e precisão insatisfatórias (WALKER *et al.*, 2002). Na SPE os analitos de interesse são particionados entre um sólido e um líquido, devendo apresentar uma maior afinidade pela fase sólida do que pela matriz da amostra. Com esta técnica de extração vários interferentes das amostras podem ser eliminados e os analitos retidos no sorvente sólido são desorvidos com solvente apropriado para posterior análise. Os princípios de separação envolvem forças intermoleculares, como forças dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, interações iônicas e forças de Van der Waals entre o analito, os sítios ativos do adsorvente e a fase líquida ou matriz da amostra (WALKER *et al.*, 2002). Atualmente, existe no mercado uma ampla variedade de sorventes para SPE que permitem a partição por fase reversa, fase normal, troca iônica, imunoafinidade ou exclusão de tamanho. A escolha

da fase sólida adequada deve ser guiada de acordo com a natureza do analito e da matriz aonde ele se encontra.

Os sorventes de características mistas tem tido uma grande aceitação principalmente na toxicologia forense, já que muitas das substâncias investigadas em amostras de interesse toxicológico podem ter propriedades ácidas, básicas ou neutras e não é desejável o uso de mais de um cartucho de extração. Por tanto, um cartucho de características mistas é de grande valia. Este tipo de cartucho, em um determinado pH, é capaz de reter substâncias ácidas ou neutras por interações hidrofóbicas com as cadeias alquílicas e substâncias básicas por interação com grupos de troca iônica (FRANKE *et al.*, 1998). Resumidamente, a SPE compreende as seguintes etapas: a) condicionamento da coluna (no mesmo solvente da matriz, para permitir interação entre o analito e a fase estacionária), b) retenção dos analitos na fase sólida por interação, c) lavagem para eliminação de interferentes e d) eluição, etapa na qual o analito é liberado do sorvente.

Os métodos analíticos disponíveis atualmente para determinação de anatoxina-a em florações, culturas de cianobactérias, conteúdos estomacais *post-mortem*, "pellets" intestinais, fezes e água são baseados principalmente nas suas propriedades físico-químicas e usam preferencialmente técnicas cromatográficas para sua detecção (HARADA *et al.*, 1993, KRIENITZ *et al.*, 2003; ARAOZ *et al.*, 2005). Estes métodos incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector ultravioleta ou de fluorescência (HARADA *et al.*, 1989, JAMES *et al.*, 1998), cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD) (BUMKE-VOGT *et al.*, 1996), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) (GHASSEMPOUR *et al.*, 2005) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC/MS) (MAIZELS *et al.*, 2004). A tabela 4 apresenta um resumo dos principais métodos analíticos para determinação de anatoxina-a publicados na literatura.

Tabela 4. Métodos analíticos para determinação de anatoxina-a publicados nas últimas duas décadas.

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Equipamento usado	Derivatização	Padrão Interno	Limite de detecção	Referência
Água (100 mL)	LLE (2x)	GC-MS	Sim	Não	n.i.	SMITH, 1986
Água (10 mL)	SPE (2x)	GC-ECD*	Sim	Sim	5 ng.mL ⁻¹	STEVENS <i>et al.</i> , 1988
Água (100 mL)	LLE (2x)	GC-MS	Sim	Não	n.i.	HIMBERG, 1989
Cél. liofilizadas	SPE (2x)	HPLC-UV**	Não	Não	20 ng.mg ⁻¹	HARADA <i>et al.</i> , 1989
Cél. liofilizadas	Filtração	HPLC-UV** e GC-MS	Sim	Sim	84 ng.mL ⁻¹	ZOTOU <i>et al.</i> , 1993
Cél. liofilizadas	SPE (2x)	LC-MS	Não	Sim	500 pg.g ⁻¹	HARADA <i>et al.</i> , 1993
Cél. liofilizadas	SPE	HPLC-FLD***	Sim	Não	10 ng.L ⁻¹	JAMES <i>et al.</i> , 1998
Suplemento alimentar	Filtração	LC-MS	Não	Não	200 ng.mL ⁻¹	DRAISCI <i>et al.</i> , 2001
Água (1,6 mL)	SPME	HPLC-FLD***	Sim	n.i.	20 ng.mL ⁻¹	NAMERA <i>et al.</i> , 2002
Água	SPE	HPLC-MS-MS	Não	Não	50 pg.mL ⁻¹	RUSEVA <i>et al.</i> , 2003
Água (10mL)	SPE	HPLC-FLD***	Sim	Não	500 ng.mL ⁻¹	FUREY <i>et al.</i> , 2003
Água (100 mL)	Discos de extração	LC-MS	Não	Não	10 ppm	MAIZELS <i>et al.</i> , 2004
Meio de cultura	SPE	GC-MS	Não	Não	1 ng.mL ⁻¹	ARAOZ <i>et al.</i> , 2005
Cél. liofilizadas	LLE	GC-MS	Não	Não	50 ng.mL ⁻¹	DAGNINO <i>et al.</i> , 2005
Cél. liofilizadas	SPE	MS	Não	Não	2 ng.mL ⁻¹	JAMES <i>et al.</i> , 2005
Cél. liofilizadas	SPME	GC-MS	Não	Não	11,2 ng.mL ⁻¹	GHASSEMPOUR <i>et al.</i> , 2005

* GC-ECD Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons

** HPLC-UV Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta

*** HPLC-FLD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência

n.i. não informado

Dentre as deficiências dos métodos publicados podem se citar a complexidade de alguns procedimentos, pouca sensibilidade e especificidade.

1.7 Microextração em fase sólida (SPME)

O tempo gasto no preparo da amostra (separação da matriz, concentração, fracionamento e derivatização), às vezes supera 80% do tempo total da análise. Por outro lado, tanto na LLE, quanto na SPE, o uso de solventes gera um custo adicional ao procedimento experimental em razão da preocupação com descarte, além do risco à saúde dos profissionais do laboratório (VAS *et al.*, 2004).

A microextração em fase sólida é uma técnica de preparação da amostra, introduzida por Artur e Pawliszyn na década de noventa, sendo inicialmente usada para análises de amostras ambientais (VAS *et al.*, 2004). Ela integra amostragem, extração e concentração numa única etapa praticamente livre de solventes. Algumas vantagens da SPME são: simplicidade, bom desempenho analítico, custo relativamente baixo e pouca manipulação da amostra (ARTHUR *et al.*, 1990; O'REILLY *et al.*, 2005). A técnica utiliza uma pequena fibra de sílica fundida, coberta com um filme polimérico adaptada em um dispositivo semelhante a uma seringa (YONAMINE, 2004). A figura 3 mostra os componentes do dispositivo de SPME.

(1) Fibra revestida com filme polimérico; (2) agulha de aço; (3) corpo do dispositivo; (4) guia do êmbolo; (5) êmbolo do dispositivo.

Figura 3. Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME).

A SPME baseia-se na partição do analito em estudo entre uma matriz e a fase estacionária que é uma microfibras de sílica fundida, coberta com polímero hidrofóbico (polidimetilsiloxano, poliacrilato, divinilbenzeno, etc.). Assim, de acordo com a afinidade entre amostra e fase sólida (polímero da fibra), o analito é absorvido ou adsorvido até atingir o equilíbrio que depende do coeficiente de distribuição do composto (AULAKH *et al.*, 2005). Em muitos casos, a quantidade absoluta extraída é muito pequena em relação à quantidade inicial presente na amostra (<1%), permitindo que outras extrações sejam realizadas no mesmo meio, caso seja necessária uma reanálise (LORD *et al.*, 2000). Dentre os fatores determinantes do desempenho analítico da SPME estão o tipo e a largura do polímero que cobre a fibra.

Existem vários tipos de polímeros, dentre eles o polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA), que extraem os analitos das amostras por absorção, dissolvendo e difundindo-os dentro de si; enquanto outras fases como divinilbenzeno e carbowax extraem compostos por adsorção dos mesmos na

superfície da fibra (VAS *et al.*, 2004). A espessura do filme polimérico que recobre a fibra de SPME é selecionada em função da eficiência desejada, tempo de extração e natureza do analito. Quanto mais delgada for a espessura do filme, mais rápido o equilíbrio pode ser alcançado. Entretanto, os maiores rendimentos de extração geralmente estão associados com a utilização de filmes mais espessos (YONAMINE, 2004). As principais fibras disponíveis comercialmente são: polidimetilsiloxano (PDMS) com diferentes espessuras do filme (7, 30, 100 μm); poliacrilato (PA) com 85 μm ; polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) com 60 e 65 μm ; carboxeno-polidimetilsiloxano com 75 μm ; carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB) com 75 μm e a carbowax-resina com 50 μm (THEODORIDIS *et al.*, 2000). Moléculas voláteis ou de baixa massa molecular geralmente são extraídas em uma fibra de 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS).

Durante a extração, a fibra é exposta à amostra, pressionando-se o êmbolo do dispositivo. Logo após um tempo de extração pré-estabelecido, a fibra é retraída e a agulha de aço do dispositivo de SPME é inserida diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso (YONAMINE, 2004). Ali, os analitos são termicamente dessorvidos e introduzidos na coluna cromatográfica.

Para uma dessorção mais rápida, geralmente é utilizado um *liner* de menor diâmetro interno. Como a fibra é reutilizada para análises posteriores, geralmente ela é mantida no injetor por um período de tempo suficiente para evitar o efeito de *carry-over*. A extração por SPME pode ser de dois tipos: por imersão direta da fibra na fase aquosa ou por *headspace* (HS-SPME). Por HS-SPME a fibra é exposta aos vapores da amostra em sistema fechado por um tempo pré-estabelecido (THEODORIDIS *et al.*, 2000).

A partição se vê favorecida pelas propriedades físico-químicas da fibra, independentemente do tipo de extração escolhido (imersão direta da fibra ou *headspace*) (YONAMINE, 2004). Na figura 4 é apresentado o esquema de extração por SPME por imersão e injeção direta no cromatógrafo gasoso. Com o intuito de fazer possível o acoplamento da SPME com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar, têm sido desenvolvidas interfaces para facilitar a dessorção dos analitos.

Mesmo assim, a cromatografia gasosa é uma das técnicas preferencialmente usadas com SPME.

(1) Preparação do dispositivo de SPME; (2) Imersão da fibra na amostra e absorção dos analitos à fibra; (3) Retração da fibra; (4) Introdução da agulha do dispositivo de SPME no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa; (5) Exposição da fibra no injetor e dessorção dos analitos e (6) Retirada do dispositivo do injetor. (Fonte: Adaptado de YONAMINE, 2004).

Figura 4. Esquema de microextração em fase sólida (SPME).

Um dos principais problemas com análises por SPME, é que a proporção extraída pode ser influenciada por fatores que alteram o coeficiente de partição. Entretanto, a análise se torna reprodutível, se estes fatores permanecem constantes (LORD *et al.* 2000).

Dentre as condições da amostra que podem ser otimizadas para melhorar o rendimento da extração estão: pH, concentração de sal, temperatura e tempo de extração. Assim como na LLE ou na SPE, a concentração de sal e o pH afetam a SPME. O pH do meio de extração é particularmente importante para substâncias que possuem um grupamento químico dissociável dependente de pH (substâncias de caráter ácido ou básico, por exemplo). Uma das estratégias para favorecer a afinidade do analito de interesse pela fibra apolar,

consiste em ajustar o pH de maneira que o analito esteja na forma neutra. Cuidado especial deve ser tomado quando se trabalha com SPME por imersão direta, já que valores extremos de pH (menores que 2 ou maiores que 10) podem danificar a fibra em curto prazo (THEODORIDIS *et al.*, 2000).

A eficiência da extração pode ser melhorada pelo fenômeno conhecido como *salting out*, que consiste na adição na amostra de um sal como NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou Na_2CO_3 (LORD *et al.*, 2000; THEODORIDIS *et al.*, 2000). Normalmente, o rendimento de extração aumenta à medida que se aumenta a concentração de sal na amostra, até certo limite, seguida da diminuição da quantidade extraída com o aumento excessivo da concentração de sal (LORD *et al.*, 2000).

O tempo de permanência do contato entre a fibra e a amostra, também permite melhorar a eficiência. No entanto, na literatura são citados diversos métodos desenvolvidos por SPME, cujo tempo de extração situa-se em torno de 1 a 60 minutos, sendo este tempo pré-estabelecido antes do sistema atingir o equilíbrio, uma vez que este pode demorar horas para ser alcançado (THEODORIDIS *et al.*, 2000). Referente à temperatura, observa-se geralmente, que seu aumento causa diminuição do coeficiente de partição para a fase de extração (LORD *et al.*, 2000).

Finalmente, é recomendável a agitação da amostra, pois tende a diminuir o tempo de equilíbrio. Para isso, geralmente é utilizada a agitação magnética ou a aplicação de ultra-som. Esta última opção deve ser utilizada com cuidado, já que pode danificar a fibra, diminuindo sua vida útil (THEODORIDIS *et al.*, 2000).

Na literatura existem poucos métodos analíticos para determinação de anatoxina-a em água usando SPME (NAMERA *et al.*, 2002; GHASSEMPOUR *et al.*, 2005), e em apenas um deles, há a detecção por GC-MS.

Desta forma, o objetivo inicial do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método quali-quantitativo por SPME-GC/MS para detecção de anatoxina-a em água, e posteriormente foi desenvolvido um outro método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS para determinação de anatoxina-a em amostras de florações de cianobactérias. Além disso, aplicou-se ambos os métodos para análise de amostras de campo.

As amostras de água e florações de cianobactérias analisadas por SPME-GC/MS e SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS respectivamente, foram coletadas em algumas regiões do Brasil e da Bolívia, sendo investigada a presença de anatoxina-a.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e validar métodos analíticos práticos, sensíveis e eficientes para determinação de anatoxina-a em amostras ambientais (água e florações), usando duas técnicas de extração (SPME e SPE, respectivamente). Posteriormente, amostras de água e floração de cianobactérias oriundas de fontes naturais foram submetidas aos métodos validados com o propósito de investigar a ocorrência dessa cianotoxina em regiões do Brasil e da Bolívia.

2.2 *Objetivos específicos*

- ❖ Coleta de amostras de água e florações de diversos pontos da Represa Billings-SP, Reservatório Salto Grande - Americana-SP e Santa Cruz de la Sierra – Bolívia;
- ❖ Determinação da presença de cianobactérias por microscopia óptica em algumas das amostras coletadas;
- ❖ Otimização e validação do método analítico desenvolvido por SPME-GC/MS para análise de anatoxina-a em água;
- ❖ Otimização e validação do método analítico desenvolvido por SPE (Bond Elut Certify)-GC/MS para análise de anatoxina-a em florações;
- ❖ Análises de amostras de água e florações coletadas seguindo os protocolos desenvolvidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Soluções-padrão

1 mg do padrão de fumarato de anatoxina-*a* liofilizado (A.G. Scientific, EUA), foi dissolvido em metanol e estocado a 4 °C em *vial* âmbar. Como padrão interno (IS) foi usada uma solução padrão de hidrocloreto de norcocaína de 1 mg.mL⁻¹ em acetonitrila obtida da Radian International (Austin, EUA).

A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho utilizando o mesmo solvente de origem (metanol ou acetonitrila). As soluções foram armazenadas a 4°C.

3.1.2 Reagentes

Metanol, acetonitrila, diclorometano, isopropanol e hidróxido de amônio foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O bicarbonato de sódio anidro (NaHCO₃), fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄) e hidróxido de potássio (KOH) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Hexilcloroformato foi obtido da Aldrich (Milwaukee, EUA). Todos os reagentes usados foram grau analítico.

3.1.3 Equipamentos e Acessórios

- Espectrômetro de massas modelo 5972 associado a um equipamento de cromatografia gasosa modelo 6890 (GC/MS), ambos da Hewlett Packard (Little Falls, DF, USA) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP- 5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30 m x 0.25 mm x 0.10 µm.
- Gás hélio especial para cromatografia gasosa (Air Liquide)
- Dispositivos de microextração em fase sólida (SPME), equipados com um suporte de sílica fundida coberta de polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura do filme de 100 µm foram obtidos da Supelco (Bellefonte, EUA).

- Cartuchos de extração em fase sólida: Supelclean LC-Si da Supelco (Belafonte, EUA), Sep-Pak C18 da Waters (Milford, Massachusetts) e Bond Elut Certify da Varian (Palo Alto, CA, EUA).
- Sistema de vácuo para extração em fase sólida (Supelco[®])
- Pipetas automáticas com volume reguláveis - Eppendorf[®]
- Balança eletrônica analítica – Sartorius Modelo R200D
- Lacrador de aço
- Lacre de alumínio – Agilent[®]
- Barra magnética
- Balão volumétrico de fundo chato
- Fita de pH – Merck
- Agitador magnético – Fisatom Modelo 752^a
- Ultra-som – UNIQUE Modelo USC700
- Parafilm[®]
- Frascos de vidro âmbar de 4 mL
- Frascos de vidro âmbar de 2 mL
- Frascos para pequenas reações de 3 mL silanizados – Pier, USA
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- Tubos Falcon[®] de 15 mL de plástico.

3.1.4 Amostras de referência

3.1.4.1 Amostras de referência negativa

Para determinação de anatoxina-a em água foram usadas alíquotas de água ultrapura preparada em milli-Q (2mL) como amostras de referência negativa.

Para determinação de anatoxina-a em florações de cianobactérias, amostras de floração coletadas na Represa Billings foram liofilizadas, misturadas numa cápsula de porcelana e armazenadas na geladeira a 4°C até a análise. 30 mg deste *pool* de amostras de florações liofilizadas foram utilizadas como amostras de referência negativa.

3.1.4.2 *Amostras de referência positiva*

Para os estudos de validação dos métodos tanto por SPME-GC/MS quanto por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS, foram utilizadas como referência positiva amostras de referência negativa de água e florações, respectivamente, adicionadas dos padrões de anatoxina-a e norcocaína.

3.1.4.3 *Amostras ambientais analisadas*

Após o desenvolvimento e validação dos métodos para determinação de anatoxina-a, foram coletadas e analisadas amostras de água doce do Brasil e da Bolívia, assim como, florações dos estados de São Paulo e Rio Grande do Norte. Uma vez as amostras chegaram ao laboratório, elas foram centrifugadas e o sobrenadante aquoso foi guardado para ser analisado por SPME-GC/MS, e o *pellet* foi liofilizado e guardado para ser analisado por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.

3.1.4.4.1 *Amostras de água doce analisadas por SPME-GC/MS*

- Amostras coletadas no Brasil: (i) Lago da Faculdade de Saúde Pública USP, São Paulo-SP; (ii) Reservatório Billings, braço Taquacetuba, São Paulo-SP, (iii) Praia dos Namorados – Reservatório de Salto Grande, Americana–SP (coleta 3/10/2005), (iv) Iate Clube Americana – Reservatório de Salto Grande, Americana-SP, (coleta 3/10/2005) (v) I.C. Camp., Reservatório Americana-SP (coleta 3/10/2005), (vi) Reservatório Jucazinho, Surubim-PE, (vii) Barragem Carpina, Carpina-PE, (viii) Lagoa Peri-SC, (ix) PAT P1, Natal-RN, (x) PAT P2, Natal-RN, (xi) PAT P3, Natal-RN, (xii) GARG P3, Natal-RN , (xiii) ARG, Natal-RN, (xiv) Piracicaba 1 - SP, (xv) Paracicaba 2 - SP, (xvi) Piracicaba 3–SP, (xvii) Reservatório Billings, mancha Porto, São Paulo–SP, (xviii) Lago 70, Parque do Zoológico, São Paulo-SP;
- Amostras coletadas na Bolívia: (xix) Pozo 23, Santa Cruz de la Sierra-SC, (xx) Laguna Norte, Santa Cruz de la Sierra-SC, (xxi) Laguna Este, Santa Cruz de la Sierra-SC (descarte final de esgoto).

3.1.4.4.2 Amostras de floração analisadas por SPE (Bond Elut Certify)-GC/MS

- Amostras coletadas no Brasil: (i) Reservatório Salto Grande 1, Americana – SP (coleta 10/2006), (ii) Reservatório Salto Grande 2, Americana – SP (coleta 10/2006), (iii) CETESB 0625256, (iv) CETESB 0605082, (v) Lago 70, Parque do Zoológico, São Paulo – SP, (vi) Lago 70, Parque do Zoológico, São Paulo – SP (amostra acidificada).

3.2 Métodos

3.2.1. Coleta das amostras

A maioria das coletas foram realizadas seguindo o procedimento utilizado na rotina pela CETESB (Companhia Tecnológica de Saneamento Básico). As amostras de água foram coletadas na superfície dos corpos d'água em uma faixa entre 0 e 50 cm de profundidade em frascos plásticos de 500 mL e mantidas sob refrigeração (4°C) até sua análise. As florações foram coletadas com rede de fitoplâncton (malha 20 µm) pelo arraste da rede ao longo de uma distância limitada pelo tamanho da embarcação, de maneira que, a água que adentrava pelo bocal da rede (diâmetro entre 20 e 30 cm) fosse filtrada pela malha, ficando retida a floração no copo da extremidade da rede. Posteriormente, as amostras de floração foram liofilizadas e armazenadas a 4°C até análise.

3.2.2. Desenvolvimento do método para determinação de anatoxina-a em água por SPME e GC/MS

Inicialmente, foi desenvolvido um método para determinação de anatoxina-a em amostras de água por SPME-GC/MS (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006b, ANEXO II).

3.2.2.1. Preparação da amostra

Foram testadas duas formas de preparo de amostra:

3.2.2.1.1. Protocolo I para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS

Uma alíquota de 2 mL de amostra de água foi transferida para um frasco âmbar de 4 mL. Em seguida, 40 ng do IS, 200 mg da mistura de carbonato $K_2CO_3/NaHCO_3$ (2:1) (concentração final na amostra 100 mg.mL^{-1}) e 2 μL de agente derivatizante (concentração final $975\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram adicionados à amostra. O frasco foi selado com parafilm® e sonificado por 10 minutos. Para extração, o dispositivo de SPME contendo a fibra de PDMS (100 μm) foi exposto por imersão direta na solução aquosa por 20 minutos sob agitação magnética constante. A seguir, os analitos retidos na fibra foram desorvidos termicamente, pela exposição da fibra no injetor do GC/MS.

3.2.2.1.2. Protocolo II para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS

A anatoxina-a e norcocaína (40 ng) foram submetidas à derivatização direta em solução aquosa (2 mL), através da adição de 200 mg de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$, concentração final 100 mg.mL^{-1}) e 4 μL de hexilcloroformato (concentração final $1950\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). O *vial* foi selado com parafilm®, sonificado por 10 minutos e mantido *overnight* (aproximadamente 8 horas) a temperatura ambiente. Posteriormente, ambos os analitos (anatoxina-a e norcocaína) derivatizados foram extraídos por SPME através da imersão da fibra de PDMS (100 μm) na solução durante 20 minutos, sob agitação magnética constante. Após o tempo de extração desejado, o dispositivo de SPME foi inserido diretamente no injetor do GC/MS, permanecendo durante 20 minutos para desorção dos analitos absorvidos na fibra (Figura 5). Este procedimento corresponde ao protocolo adotado de forma definitiva.

Figura 5. Esquema de procedimento de preparação de amostra para determinação de anatoxina-a e norcocaína em água por SPME-GC/MS.

3.2.2.2 Condições cromatográficas

Duas condições cromatográficas foram testadas para análise de anatoxina-a em água:

3.2.2.2.1 Condições cromatográficas I

- Injetor: temperatura: 280°C
modo: *splitless*;
- Coluna: fluxo de hélio constante: 0,6mL.min⁻¹
programação da temperatura do forno: temperatura inicial 100°C (1 min); rampa 10°C.min⁻¹; temperatura final 200°C (10 min);
- Interface: temperatura: 280°C;
- Gás de arraste: hélio;
- Detector: espectrômetro de massas [modo de operação: fragmentação por Impacto de Elétrons (70eV) e monitoramento seletivo de íons (SIM)];
- Tempo de duração da corrida cromatográfica: 21 min.

Íons selecionados (íons quantificadores sublinhados):

Anatoxina-a: 164, 191, 293

Norcocaína: 136, 168, 195

3.2.2.2 Condições cromatográficas II

- Injetor: temperatura: 250°C
modo: *splitless*
- Coluna: fluxo de hélio constante: 0,6 mL.min⁻¹
programação da temperatura do forno: temperatura inicial 150°C (1 min); rampa 15°C.min⁻¹; temperatura final 270°C (11 min)
- Interface: - temperatura: 280°C
- Gás de arraste: hélio
- Detector: espectrômetro de massas [modo de operação: fragmentação por Impacto de Elétrons (70eV) e monitoramento seletivo de íons (SIM)]
- Tempo de duração da corrida cromatográfica: 20 min

Íons selecionados (íons quantificadores sublinhados):

Anatoxina-a: 164, 191, 293

Norcocaína: 136, 168, 195

Estas condições correspondem às adotadas de forma definitiva.

3.2.2.3 Escolha do agente derivatizante

Em razão da baixa volatilidade da anatoxina-a para ser analisada por cromatografia gasosa, foi necessário derivatizá-la. Foram testados butil, hexil e benzilcloroformato como agentes derivatizantes, seguindo o protocolo apresentado no item **3.2.2.1.1** e as condições cromatográficas descritas no item **3.2.2.2.1**. Todos os testes foram feitos em triplicata.

3.2.2.4 Escolha do IS

Foram testados como IS a norcocaína, cocaína, lidocaína, atropina e bupivacaína seguindo o protocolo apresentado no item **3.2.2.1.1** dos materiais e métodos, usando as condições cromatográficas descritas no item **3.2.2.2.2**. Todos os testes foram analisados no GC/MS no modo *full scan* em triplicata.

3.2.2.5 Otimização do método por SPME-GC/MS

Antes de efetuar os ensaios necessários para validação do método por SPME-GC/MS, alguns testes preliminares foram feitos com o intuito de verificar a situação ótima dos parâmetros mais importantes por nós definidos (efeito *salting out*, volume do agente derivatizante e tempo de extração). Cada parâmetro analisado foi realizado em triplicata, observando a abundância absoluta obtida no GC/MS.

3.2.2.5.1 Estudo da influência da massa de sal ótima para o efeito *salting-out*

Alíquotas de 2 mL de amostra de água foram adicionadas com 100 ng de anatoxina-*a* (concentração final na amostra 50 ng.mL⁻¹). Em seguida, as amostras foram submetidas ao método descrito em **3.2.2.1.2** e **3.2.2.2.2**, variando-se a quantidade de bicarbonato de sódio: 50, 100, 200, 300 mg (concentração final do sal na amostra: 25, 50, 100 e 150 mg.mL⁻¹ respectivamente). Para cada massa de sal, as análises foram conduzidas em triplicata.

3.2.2.5.2 Estudo da influência da concentração de agente derivatizante

Alíquotas de amostra de água (2 mL) foram adicionadas com 100 ng de anatoxina-*a* (concentração final na amostra 50 ng.mL⁻¹). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao método descrito em **3.2.2.1.2** e **3.2.2.2.2**, variando-se o volume do hexilcloroformato: 2, 4, 10 e 20 µL (concentração final do agente derivatizante na amostra: 975 µg.mL⁻¹, 1950 µg.mL⁻¹, 4875 µg.mL⁻¹, 9750 µg.mL⁻¹, respectivamente). Para cada volume de agente derivatizante, as análises foram conduzidas em triplicata.

3.2.2.5.3 Estudo do tempo de absorção dos analitos

Alíquotas de 2 mL de amostra de água foram adicionadas com 100 ng de anatoxina-a (concentração final na amostra 50 ng.mL⁻¹). A seguir, as amostras foram submetidas ao método descrito em 3.2.2.1.2 e 3.2.2.2.2, variando-se o tempo de exposição da fibra para absorção dos analitos em 10, 20, 40 e 60 minutos. Para cada tempo de absorção, as análises foram conduzidas em triplicata.

3.2.3 Desenvolvimento do método para determinação de anatoxina-a em florações por SPE- GC/MS

Posteriormente, usando as mesmas condições cromatográficas descritas em 3.2.2.2.2., outro método foi desenvolvido por SPE-GC/MS para determinação de anatoxina-a em florações.

3.2.3.1 Preparo da amostra

3.2.3.1.1 Protocolo 1 para determinação de anatoxina-a em florações por SPE (Supelclean LC-SI)-SPME- GC/MS

1. Pesar 100 mg de amostra de floração liofilizada, ressuspender com 2 mL de acetato de etila num tubo falcon[®] de 15 mL e adicionar 1000 ng de anatoxina-a e norcocaína;
2. Sonicar por uma hora;
3. Centrifugar amostra a 7000 rpm por 10 minutos. Coletar o sobrenadante;
4. Condicionar o cartucho Supelclean LC-Si com 3 mL de isopropanol e acetato de etila, com o sistema de vácuo ligado;
5. Imediatamente, aplicar amostra no cartucho, com o sistema de vácuo desligado;
6. Coletar as cinco frações obtidas da aplicação no cartucho de 3 mL de acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), metanol, metanol:agu (1:1) e água;
7. Concentrar as frações, por secagem a vácuo no rotaevaporador.

8. Ressuspender os extratos com 2 mL de água;
9. Submeter cada extrato ao método desenvolvido por SPME-GC/MS.

3.2.3.1.2 Protocolo 2 para determinação de anatoxina-a em florações por SPE (Sep-Pak C₁₈) – SPME-GC/MS

1. Ressuspender 100 mg de amostra de floração liofilizada com 5 mL de água acidificada (pH 3-4) em tubo falcon[®] de 15 mL. Adicionar 1000 ng de padrão de anatoxina-a e norcocaína;
2. Sonicar por uma hora. Centrifugar 10 minutos a 7000 rpm. Coletar o sobrenadante;
3. Condicionar o cartucho Sep-Pak C₁₈ com 3 mL de metanol e 3 mL de água acidificada (pH 3), respectivamente;
4. Aplicar amostra no cartucho;
5. Coletar as frações obtidas da passagem de 3 mL de: água acidificada (pH 3), metanol:água (1:1) e metanol;
6. Concentrar a fração alcoólica e hidroalcoólica no rotaevaporador.
7. Ressuspender os extratos secos com 2 mL de água;
8. Submeter o extrato aquoso, alcoólico e hidroalcoólico a análise por SPME-GC/MS.

3.2.3.1.3 Protocolo 3 para determinação de anatoxina-a em florações por SPE (Bond Elut Certify) – GC/MS

1. Pesar 30 mg de amostra de floração de cianobactéria liofilizada e ressuspender com 2,0 mL de água + 2,0 mL de tampão fosfato (pH 6,8). Adicionar 1000 ng de padrão de anatoxina-a e norcocaína;
2. Sonicar por uma hora. Centrifugar 10 minutos a 7000 rpm. Coletar o sobrenadante;
3. Condicionar o cartucho Bond Elut Certify com 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 6,8) com o sistema de vácuo ligado. Desligar o vácuo assim que a solução tampão alcançar o topo da camada do material da coluna;
4. Aplicar imediatamente a amostra com o sistema de vácuo desligado, posteriormente submeter às colunas à secagem com vácuo ajustado em 15 inHg durante 15 minutos;

5. Eluir os analitos com 2 mL de uma solução de diclorometano/isopropanol/amônia (solução eluente) na seguinte proporção 12:3:0,6;
6. Coletar o eluato em frasco de derivação silanizado e evaporar sob fluxo de nitrogênio;
7. Ressuspender o eluato seco com 50 μ L de acetonitrila, adicionar 2 μ L de hexilcloroformato e sonicar por 10 minutos;
8. Injetar 1 μ L no GC/MS.

Preparação tampão fosfato 0,1 M pH 6,8:

- Pesar 3,4g de KH_2PO_4 ;
- Colocar em um bécker de 250 mL;
- Adicionar 150 mL de água destilada, agitar no agitador magnético;
- Ajustar o pH da solução para 6,8 com uma solução de KOH 1M;
- Transferir para um balão volumétrico de 250 mL e acertar o volume com água destilada. Armazenar em frasco âmbar e manter na geladeira. Válido por 30 dias;

A figura 6 mostra o esquema deste procedimento, que foi adotado para ser otimizado e validado.

Figura 6. Esquema de procedimento de preparação de amostra para determinação de anatoxina-a e norcocaína em florações por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.

3.2.3.2 Otimização do método por SPE-GC/MS

Novamente, assim como realizado com o método por SPME-GC/MS, antes da validação do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS foram feitos testes preliminares avaliando algumas variáveis, visando a otimização da reação de derivatização em acetonitrila. Em cada uma das condições testadas foi avaliada a abundância absoluta obtida no GC/MS.

3.2.3.2.1 Estudo da influência do volume de acetonitrila na derivatização

Alíquotas contendo 200 ng de anatoxina-a e norcocaína respectivamente, foram secas em frascos silanizados e ressuspensas com dois volumes diferentes de acetonitrila (50 e 100 µL). Em seguida, foram adicionados 2 µL hexilclorofornato e sonicadas durante 10 minutos. Posteriormente, 1 µL foi injetado no GC/MS nas condições descritas em **3.2.2.2.2**. Para cada volume de acetonitrila, as análises foram conduzidas em triplicata.

3.2.3.2.2 Estudo da influência da concentração de hexilcloroformato na derivatização

Foram preparados em *vials* silanizados dois grupos de amostras contendo 200 ng de anatoxina-a e norcocaína, respectivamente, secos sob fluxo de nitrogênio e ressuspensos com 50 µL de acetonitrila. A um dos grupos adicionou-se 2 µL de hexilcloroformato e ao outro grupo 4 µL de hexilcloroformato (concentração final do hexilcloroformato 37,5 e 75 µg.µL⁻¹, respectivamente). As amostras foram sonicadas por 10 minutos e 1 µL foi injetado no GC/MS nas condições descritas em **3.2.2.2.2**. Para cada concentração de hexilcloroformato, as análises foram conduzidas em triplicata.

3.2.3.2.3 Estudo da influência do tempo de sonicação na derivatização

Em *vials* silanizados foram preparadas amostras contendo 200 ng de anatoxina-a e norcocaína, respectivamente. Após secagem sob fluxo de nitrogênio, elas foram ressuspensas com 50 µL de acetonitrila e adicionados 2 µL de hexilcloroformato. A seguir, as amostras foram sonicadas durante 5, 10, 15 e 30 minutos e 1 µL foi injetado no GC/MS nas condições descritas em **3.2.2.2.2**. Para cada tempo de sonicação, as análises foram conduzidas em triplicata.

3.2.3.2.3 Estudo da influência do pH

Amostras foram preparadas e analisadas por GC/MS seguindo o procedimento descrito no item **3.2.3.1.3**. e as condições descritas em **3.2.2.2.2**., modificando-se o solvente usado para ressuspensão do liofilizado. Um grupo de três amostras foi ressuspensado somente com tampão fosfato (pH 6,8) e outro grupo com a mistura água:tampão fosfato (1:1).

3.2.4 Validação dos métodos

Para validação de ambos os métodos, os seguintes parâmetros foram determinados: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e interensaio. Também foi validada a recuperação do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.

3.2.4.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Tanto o limite de detecção (LOD), quanto o limite de quantificação (LOQ) de ambos os métodos, foram determinados seguindo o método empírico de Ambruster *et al.* (1994), que consiste em analisar uma série de amostras contendo quantidades decrescentes do analito. Foi considerado como LOD a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 20% e como LOQ a menor concentração do analito que apresentou um coeficiente de variação menor que 10%, para seis replicatas. Para as análises por GC/MS, o LOD e o LOQ deveriam ainda satisfazer um critério de aceitação de qualificação pré-determinado (tempos de retenção com variação menor que 1% e razão de íons com variação menor que 20%, quando comparados com os padrões dos analitos) (PEAT *et al.*, 1998).

3.2.4.2 Linearidade

O estudo da linearidade do método por SPME-GC/MS foi realizado pela análise das amostras de água submetidas ao método descrito em **3.2.2.1.2** e **3.2.2.2.2** em triplicata nas seguintes concentrações de anatoxina-a: 2,5; 10; 20; 50; 150 e 200 ng.mL⁻¹.

Assim mesmo, o estudo da linearidade do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS, foi efetuado pela análise em triplicata de amostras de liofilizado submetidas ao método descrito em **3.2.3.1.3** e as condições cromatográficas descritas em **3.2.2.2.2**, nas seguintes concentrações de anatoxina-a: 13, 50, 100, 150, 200 e 250 ng.mg⁻¹ de liofilizado. Foram construídas curvas de calibração para ambos os métodos, seguindo o modelo matemático de regressão linear dos mínimos quadrados e calculado o quadrado dos coeficientes de correlação linear (r^2) respectivos. Foram adicionados 150 ng de norcoína em todas as amostras (concentração final 5 ng.mg⁻¹ de liofilizado), como concentração fixa de IS.

Foi aplicado o teste da homocedasticidade às curvas de calibração de ambos os métodos, seguindo os critérios de Almeida *et al.* 2002. O teste da homocedasticidade foi realizado através da aplicação do teste de F, por comparação entre o valor de F-tabelado (F_{tab}) e valor do F-experimental (F_{exp}).

O valor de F_{tab} foi obtido da tabela de F a 99% de intervalo de confiança e 2 graus de liberdade. O F_{exp} foi calculado a partir da divisão da variância obtida da análise das amostras do limite superior de quantificação [200 ng.mL⁻¹ método por SPME-GC/MS e 250 ng.mg⁻¹ método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS] e entre a variância do limite inferior de quantificação [2,5 ng.mL⁻¹ método por SPME-GC/MS e 13 ng.mg⁻¹ método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS], respectivamente].

Uma vez sendo verificada a condição de heterocedasticidade ($F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$) para o método por SPME-GC/MS, foi aplicado o modelo de regressão linear dos mínimos quadrados ponderados (*Weighted Least Squares Linear Regression*). Primeiramente, foi realizada a escolha do fator de peso ou fator de ponderação (*weighting factor-w*) entre $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$, $1/y^{1/2}$, sendo x , a concentração nominal e y , a área relativa. O coeficiente angular **b** e o intercepto da reta **a** da equação da reta ponderada foram estimados usando cada fator de peso, assim como o coeficiente de correlação, **r**, seguindo as fórmulas a continuação:

$$b = \frac{\sum w \cdot \sum wxy - \sum wx \cdot \sum wy}{\sum w \cdot \sum wx^2 - (\sum wx)^2}$$

$$a = \frac{\sum wx^2 \cdot \sum wy - \sum wx \cdot \sum wxy}{\sum w \cdot \sum wx^2 - (\sum wx)^2}$$

$$r = \frac{\sum w \cdot \sum wxy - \sum wx \cdot \sum wy}{[\sum w \cdot \sum wx^2 - (\sum wx)^2]^{1/2} \cdot [\sum w \cdot \sum wy^2 - (\sum wy)^2]^{1/2}}$$

Onde:

w= fator de peso

x= concentração nominal do analito

y= área relativa do analito

A escolha do fator de peso foi baseada na soma da porcentagem de erro relativo (%RE), calculado para os seis fatores de peso estudados, segundo a fórmula descrita a continuação.

$$\%RE = \frac{C_{\text{encontrada}} - C_{\text{nominal}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100$$

Onde:

$C_{encontrada}$ – concentração que corresponde à calculada a partir de cada equação de regressão linear obtida utilizando um determinado fator de peso.

$C_{nominal}$ – concentração que corresponde ao padrão do analito.

3.2.4.3 Repetibilidade

A repetibilidade dos métodos foi determinada através do cálculo dos coeficientes de variação (CV) obtidos a partir da análise de amostras (água e liofilizado) adicionadas com padrão de anatoxina-a analisadas em um mesmo dia (precisão intra-dia). Para o método por SPME-GC/MS o estudo foi conduzido analisando-se amostras de água contendo três concentrações de anatoxina-a: baixa, média e alta ($C_{QB} = 8$, $C_{QM} = 80$ e $C_{QA} = 150 \text{ ng.mL}^{-1}$) conforme ao procedimento descrito em 3.2.2.1.2 e as condições cromatográficas descritas em 3.2.2.2.2.

Da mesma maneira, a repetibilidade do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS foi avaliada pela análise das amostras de liofilizado contendo 40, 120 e 210 ng.mg^{-1} de anatoxina-a, conforme o protocolo descrito em 3.2.3.1.3 e as condições cromatográficas descritas em 3.2.2.2.2.

Todas as análises foram realizadas em sextuplicata para cada concentração. A repetibilidade foi expressa como o coeficiente de variação percentual (CV%), estabelecendo-se como aceitáveis valores inferiores a 16%. A fórmula utilizada para o cálculo de CV% é a seguinte:

$$CV\% = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média das replicatas}} \times 100$$

3.2.4.4 Recuperação

Foi realizado o estudo de recuperação do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS levando em consideração as possíveis perdas do analito no processo de extração. Foram preparados dois conjuntos de amostras seguindo o procedimento analítico descrito em 3.2.3.1.3 e as condições cromatográficas descritas em 3.2.2.2.2. No conjunto A, as amostras de liofilizado após extração foram adicionadas com três concentrações de anatoxina-a (40, 120 e 210

ng.mg⁻¹, respectivamente). No conjunto B, as amostras foram adicionadas com o padrão de anatoxina-a nas mesmas concentrações do grupo A antes da extração. As análises foram realizadas em sextuplicatas para cada concentração de anatoxina-a, e foram adicionados 150 ng do IS em ambos conjuntos de amostras antes da extração.

Para calcular as proporções dos analitos recuperados, foram utilizadas as médias das razões entre as áreas obtidas, considerando como 100 % a média das áreas dos analitos adicionados após extração. A porcentagem de recuperação absoluta da anatoxina-a foi obtida aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{média das áreas do conjunto B}}{\text{média das áreas do conjunto A}} \times 100$$

3.2.4.5 Seletividade

Atendendo ao problema de detecção errônea apresentado por Furey *et al.* (FUREY *et al.*, 2005) amostras de água (n=3) foram adicionadas com fenilalanina (600 ng.mL⁻¹) e analisadas de acordo ao método descrito em **3.2.2.1.2** e **3.2.2.2.2**.

3.2.5 Testes usando extração líquido-líquido (LLE)

Dois procedimentos de extração LLE foram testados:

3.2.5.1 Procedimento I

Alíquotas de 2 mL de água foram adicionadas com: 160 ng de anatoxina-a (concentração final 80 ng.mL⁻¹), 40 ng de norcocaína (concentração final 20 ng.mL⁻¹), 4 µL de hexilclorofornato, 200 mg de bicarbonato de sódio. A amostra foi sonicada por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 6 mL de uma mistura de hexano:éter (8:2) e agitou-se a amostra em agitador magnético por 20 minutos. A fração orgânica foi evaporada sob fluxo de nitrogênio até *secura*. O extrato seco foi ressuspensionado com 200 µL de metanol e 1 µL do ressuspensionado foi injetado no GC/MS, nas condições descritas em **3.2.2.2.2**.

3.2.5.2 Procedimento II

Alíquotas de 2 mL de água foram adicionadas com 160 ng de anatoxina-a (concentração final 80 ng.mL⁻¹), 40 ng de norcocaína (concentração final 20

ng.mL⁻¹), 4 µL de hexilcloroformato e 200 mg de bicarbonato de sódio. A amostra foi sonicada por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 6 mL de hexano, agitou-se a amostra em agitador magnético por 20 minutos. A fração orgânica foi evaporada sob fluxo de nitrogênio até secura. O extrato seco foi ressuscendido com 200 µL de hexano e 1 µL do ressuscendido foi injetado no GC/MS, nas condições descritas em **3.2.2.2.2**.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos na escolha do agente de derivatização, IS, otimização das condições experimentais e validação dos métodos analíticos desenvolvidos para determinação de anatoxina-*a* em água e florações, além de cromatogramas e espectros de massas característicos. Finalmente, são apresentados os resultados da aplicação dos métodos em amostras coletadas no Brasil e na Bolívia.

Como mencionado nos itens anteriores, o impacto do crescimento populacional desordenado, assim como as inúmeras atividades humanas, contribuem para o desequilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos, levando-os a condições cada vez mais críticas de poluição (COELHO-BOTELHO, 2004). A eutrofização é um exemplo de processo potencializado pela ação antropogênica que altera o meio aquático e pode levar ao crescimento acelerado de cianobactérias e outras microalgas.

Entre os diversos problemas ocasionados pelas florações está o aumento no custo do tratamento da água de abastecimento e aumento na probabilidade de intoxicações humanas em razão das toxinas produzidas por cianobactérias.

De acordo com o Encontro de cientistas da Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (USEPA) realizado em 2001, a anatoxina-*a* foi considerada uma das cianotoxinas de estudo prioritário. Além disso, foi observada a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos quali e quantitativos sensíveis, confiáveis e de custo acessível para sua determinação (MAIZELS, *et al.*, 2004).

No Brasil já foram documentadas a existência de cianotoxinas em vários mananciais de água. De acordo com a Portaria 518 do Ministério da Saúde, as instituições responsáveis pelo abastecimento de água estão obrigadas ao monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Com esse intuito, os fatores que motivaram a decisão de desenvolver, otimizar e validar métodos para determinação anatoxina-*a* em água e florações está o perigo iminente ao qual a população poderia estar exposta, fornecendo

portanto, ferramentas simples e práticas que podem ser utilizadas pelos órgãos responsáveis pela fiscalização da boa qualidade da água de consumo.

Na análise dos métodos analíticos descritos na literatura para determinação de anatoxina-a em água (Tabela 4), observamos que a maioria dos trabalhos usa uma ampla faixa de volume de amostra (desde 1,6 mL a 100 mL de água). Decidiu-se testar com 2 mL de água, considerando a maior acessibilidade a quantidades menores de amostra.

De acordo com a tabela 4 as técnicas de extração mais usadas para determinação de anatoxina-a são SPE e LLE, mas em alguns casos elas são realizadas em duas etapas, tornando alguns dos métodos demorados e trabalhosos. Algumas desvantagens associadas com LLE são as perdas operacionais e formação de emulsões. Além disso, a separação baseada na solubilidade nem sempre permite obter uma eficiência de extração satisfatória (HARADA *et al.*, 1989). A SPE é uma das técnicas de extração mais usada na análise de cianotoxinas a partir de florações. Essa técnica normalmente melhora a sensibilidade dos métodos; no entanto são necessárias no mínimo 3 etapas de preparação de amostra (condicionamento do cartucho, passagem da amostra a um fluxo baixo, e eluição do analito) (YONAMINE, 2004). A aplicação da SPME na determinação de cianotoxinas está emergindo nas últimas décadas em função da simplicidade e rapidez do procedimento, além da obtenção de extratos geralmente mais “limpos” para análise.

O uso de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV) na determinação de anatoxina-a tem sido muito criticado em razão da baixa sensibilidade e presença de muitos interferentes que absorvem no mesmo comprimento de onda dessa toxina ($\lambda = 227$ nm) (JAMES *et al.* 1998). Contudo, os métodos de análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD) e por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) são mais confiáveis.

Embora a detecção de anatoxina-a em água apresente problemas analíticos, como baixas concentrações dessa toxina na água e instabilidade na presença de luz em meio alcalino, a derivatização seguida da análise por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD) ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) tem sido aplicada com relativo sucesso (JAMES *et al.*, 1998).

Por esses motivos, no presente projeto de pesquisa, optou-se em se utilizar a técnica de microextração em fase sólida (SPME) e GC/MS para determinação de anatoxina-a em água e SPE-GC/MS para determinação de anatoxina-a em florações.

Duas propriedades físico-químicas necessárias para análise de uma substância por GC são a volatilidade e a estabilidade térmica do analito. No caso de compostos polares e pouco voláteis, geralmente é necessária uma etapa de derivatização para torná-los mais hidrofóbicos e voláteis.

Além disso, vista a diferença de polaridades entre a fibra de SPME escolhida (fibra de polidimetilsiloxano) e a anatoxina-a, foi fundamental o tratamento do composto em estudo, de maneira que este se tornasse mais apolar para ser absorvido. A anatoxina-a sem ser derivatizada não é absorvida na fibra de PDMS. Este fato foi comprovado nos testes de extração da anatoxina-a sem adicionar o agente derivatizante na amostra, os quais não apresentaram nenhum sinal no GC-MS (concentrações de anatoxina-a usadas: 500 e 1000 ng.mL⁻¹).

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ESCOLHA DO AGENTE DE DERIVATIZAÇÃO

4.1.1 Derivatização com alquilcloroformatos

Dentre os compostos possíveis de serem utilizados como agentes derivatizantes, os alquilcloroformatos têm demonstrado boa capacidade de reagir com aminas à temperatura ambiente, podendo convertê-las rapidamente em carbamatos, em meio aquoso tamponado (HUSEK 1998, YONAMINE *et al.*, 2003). A figura 7 mostra a reação de derivatização da anatoxina-a com um alquilcloroformato.

Figura 7. Reação de derivatização da anatoxina-a com um alquilcloroformato.

Nas figuras 8 a 10 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas obtidos de amostras de água preparadas de acordo com o protocolo 1 apresentado no item 3.2.2.1.1 dos materiais e métodos, adicionadas com 500 ng.mL⁻¹ de anatoxina-a e 2 µL de cada alquilcloroformato testado (butil, hexil e benzilcloroformato, respectivamente). As condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.2.2. A caracterização de cada derivatizado foi realizada a partir da observação do respectivo íon molecular.

Figura 8. (A) Cromatograma obtido da análise por SPME-GC/MS de uma amostra de referência negativa adicionada com 500 ng.mL⁻¹ de padrão de anatoxina-a e 2 µL de butilcloroformato; estrutura química da anatoxina-a derivatizada. (B) Espectro de massas no modo *full scan* do pico em 12,3 min.

Figura 9. (A) Perfil cromatográfico obtido com a análise por SPME/GC-MS de uma amostra de referência negativa adicionada com 500 ng.mL⁻¹ de padrão de anatoxina-a e 2 µL de hexilcloroformato; estrutura química da anatoxina-a derivativizada. (B) Espectro de massas no modo *full scan* referente ao pico aos 13,8 min.

Figura 10. (A) Cromatograma obtido da análise por SPME-GC/MS de uma amostra de referência negativa adicionada com 500 ng.mL⁻¹ de anatoxina-a e 2 µL de benzilcloroformato; estrutura química da anatoxina-a derivatizada. (B) Espectro de massas obtido no modo *full scan* do pico em 8,4 min.

Dos três alquilcloroformatos testados (butil, hexil e benzilcloroformato) o produto de derivatização com hexilcloroformato demonstrou ser o melhor absorvido na fibra de PDMS (Figura 9), pois apresentou maior sinal no GC/MS (abundância 10⁶). Por essa razão, o hexilcloroformato foi escolhido como agente derivatizante.

Um dos problemas iniciais encontrados durante o desenvolvimento da metodologia analítica por SPME-GC/MS foi o constante descolamento da fibra de PDMS do suporte. Dentre as possíveis causas foram contempladas a

temperatura do injetor do GC e o ataque do cloro proveniente dos alquilcloroformatos. Por isso, a temperatura do injetor do GC foi diminuída de 270 °C para 250 °C, em razão da proximidade com a temperatura máxima suportada pela fibra (280 °C). No entanto, mesmo após tal modificação o resultado obtido continuava sendo insatisfatório.

Conforme o manual de instruções fornecido pela Supelco® (Bellafonte-PA, USA), há indicação de que o cloro pode diminuir a meia vida da fibra de PDMS pelo ataque ao epóxido presente no suporte de sílica. Observou-se também que mesmo usando pequenas quantidades de alquilcloroformatos (aproximadamente <1% do volume de amostra), o benzilcloroformato diminuía a vida útil da fibra mais do que o hexilcloroformato. Entretanto, com o uso do butilcloroformato, a fibra de PDMS ficava aderida ao suporte por mais tempo, porém, a sensibilidade diminuía cerca de 50% em relação ao sinal obtido com hexilcloroformato. Deste modo, o nosso problema foi resolvido deixando as amostras *overnight* (aproximadamente 8 horas) seladas com parafilm®, antes de serem extraídas.

4.2 Resultados e discussão da escolha do IS

Como é bastante recomendável o uso de IS em métodos analíticos, foram realizados testes com a norcocaína como possível IS simultaneamente aos testes de derivatização de anatoxina-a com alquilcloroformatos. O IS permite a compensação de erros gerados pelas variáveis de tempo de extração e agitação, entre outras. O uso de IS para quantificação é comum e geralmente oferece bons resultados quando utilizado com SPME. Diferentes composições da amostra podem interferir no coeficiente de partição do analito ou competir com a fase de extração (polímero da fibra), alterando a proporção extraída do composto de interesse (YONAMINE, 2004). Para minimizar esses problemas, que poderiam prejudicar, principalmente, a precisão do método, é recomendável o uso de IS quimicamente semelhantes ao analito. O ideal seria usar o próprio composto de interesse marcado com isótopo estável (anatoxina-a deuterada ou com carbono 13, por exemplo). No entanto, não há disponível no mercado padrão de anatoxina-a marcado que possa ser utilizado como IS. Assim sendo, foram iniciados testes com a norcocaína, por esta substância ser

um biciclo e ter uma amina secundária como a anatoxina-a, sendo possível a formação do carbamato correspondente ao reagir com hexilcloroformato. As estruturas da norcocaína e anatoxina-a são mostradas na figura 11 para comparação.

Figura 11. Comparação entre as estruturas químicas da anatoxina-a (A) e a norcocaína (B).

4.2.1 Testes realizados com norcocaína

Nas figuras 12 a 14 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas obtidos de amostras de água preparadas de acordo com o protocolo 1 apresentado no item 3.2.2.1.1 e as condições cromatográficas descritas em 3.2.2.2.2. dos materiais e métodos, adicionadas com 500 ng.mL⁻¹ de norcocaína e 2 µL de cada alquilcloroformato testado (butil, hexil e benzilcloroformato, respectivamente). A caracterização de cada derivatizado foi realizada a partir da observação do respectivo íon molecular. Na figura 15 pode ser visualizado um cromatograma obtido da análise de uma amostra de referência positiva, contendo anatoxina-a na concentração de 200 ng.mL⁻¹ e norcocaína 20 ng.mL⁻¹.

Figura 12. (A) Perfil cromatográfico obtido com a análise por SPME-GC/MS de uma amostra de referência negativa adicionada com 500 ng.mL⁻¹ de norcocaina e 2 µL de butilcloroformato; estrutura química da norcocaina derivatizada. (B) Espectro de massas obtido no modo *full scan* referente ao pico em 16,7 min.

Figura 13. (A) Cromatograma obtido da análise por SPME-GC/MS de uma amostra de referência negativa adicionada com 500 ng.mL^{-1} de norcocaina e $2 \mu\text{L}$ de hexilcloroformato; estrutura da norcocaina derivatizada (B) Espectro de massas obtido no modo *full scan* do pico em 16,4 min.

Figura 14. (A) Perfil cromatográfico obtido com a análise por SPME-GC/MS de uma amostra de referência negativa adicionada com 500 ng.mL⁻¹ de padrão de norcocaina e 2 µL de benzilcloroformato; estrutura química da norcocaina derivatizada. (B) Espectro de massas obtido no modo *full scan* referente ao pico em 16,4 min.

Figura 15. Cromatograma obtido da análise por SPME-GC/MS de uma amostra de água adicionada com anatoxina-a (200 ng.mL^{-1}) e norcocaína (20 ng.mL^{-1}). Pico 1 anatoxina-a e pico 2 norcocaína.

Cabe salientar que a diferença no tempo de retenção tanto da anatoxina-a como da norcocaína no cromatograma da figura 15 (7,9 min e 12,1 min, respectivamente), com relação aos tempos de retenção apresentados nos cromatogramas das figuras 9 e 13, é em função à mudança na rampa de temperatura do forno do cromatógrafo gasoso. Nas corridas das figuras 9 e 13 foram usadas as condições cromatográficas descritas no item **3.2.2.2.1.** e na corrida apresentada na figura 15 as condições descritas no item **3.2.2.2.2.**

Em razão de ter se observado um melhor perfil cromatográfico e boa resolução dos picos depois de alterada a rampa de temperatura do forno usada inicialmente (condições cromatográficas descritas no item **3.2.2.2.1.**). A partir dessa etapa, nos experimentos posteriores foram adotadas definitivamente as condições do GC/MS descritas no item **3.2.2.2.2.**

O passo seguinte foi escolher os íons quali e quantificadores a serem monitorados. Como dentre os objetivos perseguidos no desenvolvimento deste método está a detecção de baixas concentrações de anatoxina-a, optou-se por trabalhar no modo SIM. O GC/MS permite a escolha entre dois modos de operação: modo SIM (monitoramento seletivo de íons) e modo *full scan*. O modo SIM, possibilita ao instrumento monitorar dois, três ou mais fragmentos específicos de cada uma das substâncias analisadas. Desta maneira, é possível detectar concentrações bem menores dos analitos em estudo. Quando o espectrômetro de massas está selecionado no modo *full scan*, modo em que o equipamento gera um espectro completo da substância, ele fornece melhor

informação para sua identificação, no entanto, com perda de sensibilidade (DIZIOLI, 2005). Na seleção dos íons a serem monitorados, os íons moleculares obtidos pela ionização por impacto de elétrons geralmente são os mais específicos. Porém, em algumas ocasiões eles são de baixa intensidade, tornando-se pouco adequados para monitorização das áreas. Outros tipos de íons que não são recomendados para serem monitorados são aqueles de razão massa/carga (m/z) baixa, já que podem provir de interferentes da amostra de baixo peso molecular (YONAMINE, 2000). Na nossa escolha, foram levadas em consideração a abundância do sinal obtido no GC/MS, no caso dos íons quantificadores e a razão massa/carga (m/z) maior que 130 nos íons qualificadores. Foram escolhidos os íons com m/z 164, 191, e 293 para anatoxina-*a* e os íons m/z 136, 168, 195 para norcocaína (íons quantificadores sublinhados).

Uma vez tendo selecionado o reagente derivatizante, as condições cromatográficas e o possível IS, testou-se concentrações decrescentes de anatoxina-*a* (20, 10, 5, 3, 2 e 1 ng.mL^{-1}) para se ter uma noção de qual seria o limite de detecção do método por SPME-GC/MS. Adotou-se 20 ng.mL^{-1} de norcocaína como concentração fixa de IS a ser usada. Cada concentração foi testada no mínimo em triplicata para avaliar a reprodutibilidade do método.

Entretanto, observou-se variações importantes entre a anatoxina-*a* e norcocaína em relação à afinidade pela fibra de SPME e estabilidade em meio alcalino. Ao se considerar os coeficientes de partição octanol/água ($\log P$) da norcocaína e anatoxina-*a* derivatizadas com hexilclorofornato, 3,75 e 2,72, respectivamente ($\log P$ obtidos pelo software Chemdraw[®] 8.0), o derivatizado de norcocaína teria maior afinidade pelo polidimetilsiloxano (polímero apolar) da fibra de SPME do que o derivatizado de anatoxina-*a*. Contudo, a presença de um grupo benzil-éster na norcocaína (estrutura química apresentada na figura 11), pode influenciar em seu comportamento no meio de trabalho. A norcocaína é facilmente hidrolisada em meio alcalino, em razão do éster benzílico ser um bom grupo de saída. Portanto, como o nosso meio de trabalho é alcalino (pH 11) ela pode ser hidrolisada, mudar as propriedades físico-químicas e conseqüentemente, sua afinidade pela fibra de SPME.

A instabilidade da norcocaína em meio alcalino, afetaria a precisão do método. Com o intuito de diminuir a hidrólise da norcocaína no meio de reação,

assim como preservar as fibras de condições de pH muito próximas ao seu máximo pH suportável (pH 12); o sal usado inicialmente (tampão carbonato/bicarbonato de sódio 2:1, pH 11), foi trocado pelo bicarbonato de sódio (pH 9). Embora tenha havido uma melhora considerável na resistência da fibra com o uso do bicarbonato de sódio, observou-se que o CV obtido das replicatas era maior que 10% (n=6).

Na procura de um IS melhor que a norcocaína, foram testados outros compostos com certa semelhança estrutural com a anatoxina-a tais como: cocaína, lidocaína, atropina e bupivacaína.

Nos testes com cocaína, atropina e lidocaína observou-se pouca eficiência na extração pela fibra de PDMS. Provavelmente, pelo fato das substâncias em questão não terem sido derivatizadas ou pela presença de grupos funcionais que fazem com que suas características físico-químicas dificultem sua absorção na fibra de PDMS. Por exemplo, a atropina além de não ser derivatizada no seu grupo amino, apresenta uma hidroxila que confere à molécula polaridade, diminuindo a afinidade pelo polímero da fibra de SPME.

A seguir são apresentados os cromatogramas obtidos dos testes realizados com bupivacaína.

4.2.2 Testes realizados com a bupivacaína

Os cromatogramas (A) e (C) da figura 16 mostram o perfil da análise de uma amostra de referência negativa adicionada só com bupivacaína e de outra amostra adicionada com padrão de anatoxina-a e bupivacaína, respectivamente.

Figura 16. (A) Cromatograma obtido pela análise por SPME-GC/MS de uma amostra de água adicionada com bupivacaína (500 ng.mL^{-1}) e $2 \mu\text{L}$ de hexilcloroformato; estrutura química da bupivacaína derivativada. (B) Espectro de massas no modo *full scan* referente ao pico em 8,3 min. (C) Perfil cromatográfico de uma amostra de água adicionada com 500 ng.mL^{-1} dos padrões de anatoxina-a e bupivacaina; estruturas químicas dos compostos analisados derivativados.

Como pode ser observado nos cromatogramas A) e C) da figura acima, o produto de derivatização da bupivacaína foi absorvido na fibra de PDMS, gerando um pico intenso em 8,2 minutos. A ausência do íon molecular da bupivacaína derivatizada (m/z 416) no modo *full scan* já era esperada, pois quanto maior é a faixa de trabalho selecionada no GC/MS, menor é a sensibilidade do equipamento. Não obstante, acreditamos que o sinal saído em 8,2 minutos corresponderia à bupivacaína derivatizada, pois foram observados os fragmentos m/z 287 (provável íon proveniente da perda de um hidrogênio da bupivacaína) e íon m/z 140 íon mais abundante, fragmentos considerados importantes na identificação da bupivacaína (PFLEGER *et al.*, 1992). Assim, foram preparadas amostras nas quais foram selecionados os íons m/z 140, 287 para bupivacaína e os íons m/z 165, 191 e 293 para anatoxina-a (íons quantificadores sublinhados). O CV foi calculado usando a razão das áreas dos íons quantificadores analito/IS, e este resultou em um valor maior (CV=24%) do que aquele obtido com a norcocaína (CV<15%), para um n=6.

Como nenhum dos compostos testados como IS apresentou vantagens significativas com relação à norcocaína, decidiu-se otimizar e validar o método por SPME-GC/MS usando-a como IS.

4.3. Resultados e discussão da otimização e validação do método por SPME-GC/MS

Frente ao exposto, decidiu-se otimizar alguns parâmetros que pudessem influenciar na eficiência de extração por SPME. O primeiro parâmetro a ser otimizado foi o efeito *salting out*.

4.3.1. Estudo do efeito salting out

Este fenômeno permite a saturação do meio com um sal, possibilitando melhorar a eficiência de extração do analito de interesse, e também normalizar concentrações variáveis de sal em diferentes matrizes. Teoricamente, quanto maior a concentração de sal, maior é a constante de equilíbrio fibra/água (K^{fw}) e a quantidade de analito extraído (MULLER *et al.*, 1997).

A figura 17 mostra a influência da quantidade de bicarbonato de sódio (sal usado para produzir o efeito salting out) na extração da anatoxina-a por SPME conforme procedimento descrito no item **3.2.2.5.1**.

Figura 17. Estudo do efeito da quantidade de bicarbonato de sódio na eficiência de extração de anatoxina-a (50 ng.mL^{-1}) usando uma fibra de PDMS de $100 \text{ }\mu\text{m}$. O tempo de extração foi 20 minutos sob agitação constante, e o volume de hexilcloroformato.

Conforme mostra a figura 17, com 200 mg de bicarbonato de sódio alcançou-se a melhor eficiência de extração. O perfil de extração obtido neste experimento foi o esperado, pois se observou supersaturação da amostra quando foram testados 300 mg do sal, fato que dificultaria o contato dos analitos em estudo (anatoxina-a e norcocaína derivatizadas) com a fibra de extração.

4.3.1. Estudo da concentração de agente derivatizante

A figura 18 mostra as áreas absolutas relativas à anatoxina-a usando diferentes concentrações de hexilcloroformato, conforme descrito no item **3.2.2.5.2**.

Figura 18. Estudo do efeito da concentração de agente derivatizante na eficiência de extração da anatoxina-a (50 ng.mL^{-1}) em uma fibra de PDMS de $100 \text{ }\mu\text{m}$. O tempo de extração foi de 20 minutos e a massa do NaHCO_3 de 200 mg.

Em relação as diferentes concentrações de hexilcloroformato testados, esperava-se uma resposta linear na quantidade de derivatizado absorvido na fibra a maiores concentrações de agente derivatizante. No entanto, observou-se que a partir de $4875 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ocorria uma forte interação do agente com a fibra de PDMS. Tal comportamento baseia-se no fato mencionado anteriormente, em que o excesso de compostos alquilcloroformatos, presente no meio reacional, poderia atacar o epóxido que mantém aderido o polímero de polidimetilsiloxano ao suporte de sílica, fazendo com que a meia vida da fibra diminua.

Assim, o emprego de $4 \text{ }\mu\text{L}$ de hexilcloroformato ($1950 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) garantiu que houvesse reagente suficiente para que anatoxina-a e norcocaína fossem derivatizadas sem que o ligeiro excesso do mesmo promovesse marcante interação com a fibra de sílica.

Por fim, foi avaliada a eficiência de extração em função do tempo que a fibra de PDMS permanecia mergulhada na matriz.

4.3.1. Estudo do tempo de extração de anatoxina-a

A figura 19 mostra o comportamento apresentado pela anatoxina-a em diferentes tempos de absorção, conforme descrito no item 3.2.2.5.3.

Figura 19. Estudo do tempo de exposição para absorção da anatoxina-a na fibra de PDMS de 100 μm em amostra de água adicionada com 50 ng.mL^{-1} do padrão. A massa de NaHCO_3 foi 200 mg e o volume de hexilcloroformato 4 μL .

Como mostra a figura 19, foi observada uma melhora na resposta em mais de 120% com 20 minutos de extração comparado com o menor tempo de extração testado (10 minutos). No subsequente tempo testado (40 minutos), foi verificado um acréscimo de apenas 20%, demonstrando que o fenômeno não é linear. De fato, depois de 60 minutos de extração, houve um acréscimo de apenas 4%. Ainda que a razão LOD/LOQ possa ser ligeiramente melhorada aumentando o tempo de extração, o nosso objetivo foi desenvolver um método simples e rápido. Portanto, foi escolhido o tempo mais apropriado para que tanto a extração por SPME quanto a corrida cromatográfica tomassem o mesmo tempo (20 minutos). Assim, na rotina as amostras poderiam ser analisadas continuamente.

Uma vez estabelecidas as condições de extração, foram iniciados os estudos para validação do método por SPME-GC/MS. De acordo com a

resolução No. 899 do 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Deve-se também garantir através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando-se aplicabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

4.4 Resultados e discussão da validação do método por SPME-GC/MS

4.4.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Como a SPME não usa solventes, uma maneira recomendável de garantir a transferência completa do analito e aumentar a sensibilidade do método é que as injeções sejam efetuadas no modo *splitless* (MILLS, *et al.*, 2000). Tanto o LOD (2 ng.mL^{-1}) quanto o LOQ ($2,5 \text{ ng.mL}^{-1}$) obtidos foram aceitáveis para a análise de anatoxina-*a* em água. O método proposto demonstrou uma boa sensibilidade quando comparado com os outros métodos já publicados, inclusive aqueles que usam SPME (GHASSEMPOUR *et al.*, 2005, NAMERA *et al.*, 2002).

A figura 20 apresenta os cromatogramas relativos ao LOD e LOQ obtidos por SPME-GC/MS.

Figura 20. Cromatogramas correspondentes ao (A) LOD e (B) LOQ do método desenvolvido por SPME-GC/MS obtidos da análise de amostras de água adicionadas com 2 ng.mL^{-1} e $2,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ de anatoxina-a, respectivamente. Pico 1 anatoxina-a derivatizada, pico 2 norcoocaína derivatizada.

4.4.2 Linearidade

O método desenvolvido por SPME-GC/MS mostrou-se linear na faixa de concentração estudada ($2.5 - 200 \text{ ng.mL}^{-1}$). A figura 21 apresenta a curva de calibração construída a partir do estudo de linearidade pelo método de regressão linear convencional. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação obtido foi $Y = 0,0031X - 0,025$ e $r^2 = 0.992$ [onde Y e X representam a razão entre a área dos picos (analito/IS) e a concentração do calibrador correspondente, respectivamente].

Figura 21. Curva de calibração para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS. Concentrações de 2,5 a 200 ng.mL⁻¹.

O critério adotado para estabelecer o limite superior de quantificação foi o de não ter uma diferença superior a duas ordens de magnitude entre o limite superior e inferior da curva de calibração (200 e 2,5 ng.mL⁻¹, respectivamente), já que, quanto maior é o intervalo de valores do eixo x (concentração) maior é a variância dos pontos da curva de calibração (JOHNSON *et al.*, 1988).

A qualidade do resultado de um método analítico é altamente dependente da qualidade da curva de calibração, já que a concentração do composto de interesse numa amostra desconhecida é calculada a partir dos resultados de análise de regressão obtidos da curva de calibração (ALMEIDA *et al.*, 2002). Por isso, em vista da relevância de uma curva de calibração bem desenhada e interpretada, foi aplicado o teste de homocedasticidade ao método por SPME-GC/MS. Embora o modelo de regressão linear dos mínimos quadrados seja o mais utilizado, ele pre-supõe a igualdade de variâncias de todos os pontos da curva (homocedasticidade). No entanto, este modelo de regressão linear é mais influenciado pelo desvio padrão das concentrações mais altas da curva do que pelo desvio padrão das concentrações mais baixas, esta influência provoca uma redução da precisão nas concentrações mais baixas, condição conhecida como heterocedasticidade (ALMEIDA *et al.*, 2002). Para contrabalancear essa situação indesejável, principalmente para métodos que usualmente determinam concentrações baixas do analito nas amostras, é recomendável o uso da regressão linear dos mínimos quadrados ponderados.

Os resultados obtidos da aplicação do teste de homocedasticidade para o método por SPME-GC/MS são apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Teste de homocedasticidade da curva de calibração do método para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS

Método	s_2^2	s_1^2	F_{exp}	F_{tab}	Resultado
SPME-GC/MS	0,0038	$1,11543 \cdot 10^{-06}$	3447,390	99	$F_{exp} > F_{tab} =$ Heterocedasticidade

s_2^2 = variância do limite superior de quantificação

s_1^2 = variância do limite inferior de quantificação

F_{exp} = valor de F experimental

F_{tab} = valor de F tabelado, 99% de intervalo de confiança, números de graus de liberdade=2

Uma vez verificada a heterocedasticidade da curva de calibração do método por SPME-GC/MS de acordo com o teste de homocedasticidade ($F_{exp} > F_{tab}$), foi escolhido o melhor fator de peso de acordo à porcentagem de erro relativo (%RE). O %RE é considerado um indicador sensível permitem um bom ajustamento dos resultados na avaliação da efetividade dos fatores de peso testados (ALMEIDA *et al.*, 2002)

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos da análise estatística realizada pelo modelo de regressão linear dos mínimos quadrados ponderados do método por SPME-GC/MS para escolha do melhor fator de peso, baseado no menor valor da somatória da %RE encontrados.

Tabela 6: Porcentagens de Erro Relativo (%RE) obtidos da análise por regressão linear ponderada do método para determinação de anatoxina-a em água por SPME-GC/MS.

w	a	b	r	$\Sigma\%RE$
x	0,025	0,0031	0,992	360,26
1/x	-0,007347	0,002893	0,986542	148,68
$1/x^2$	-0,002054	0,00238	0,96311	127,01
$1/x^{1/2}$	-0,01412	0,003032	0,993086	214,32
1/y	-0,006668	0,002781	0,979623	148,77
$1/y^2$	-0,000967	0,00204	0,96275	135,34

Onde: w= fator de peso, a= intercepto da reta, b= coeficiente angular da reta, r= coeficiente de correlação e $\Sigma\%RE$ = porcentagem de erro relativo

Como apresentado na tabela 6, da análise dos 6 fatores de peso testados, foi obtido o menor %RE quando usado o fator de peso $1/x^2$ (%RE=127), sendo, por conseguinte a nova equação da reta $y = 0,00238x - 0,0025$ e o coeficiente de correlação $r = 0,963$ [onde Y e X representam a razão entre a área dos picos (analito/IS) e a concentração do calibrador correspondente, respectivamente].

4.4.3 Repetibilidade

As concentrações utilizadas nos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) para o método por SPME-GC/MS foram 8 ng.mL^{-1} , 80 ng.mL^{-1} e 150 ng.mL^{-1} , respectivamente. Os valores do coeficiente de variação obtidos no estudo de repetibilidade ou precisão intraensaio para o CQB, CQM e CQA foram CV = 11; 7 e 11%, respectivamente. Estes valores foram considerados satisfatórios, pois foram avaliadas variáveis do método como eficiência de derivatização, extração por SPME e análise cromatográfica.

Já os resultados da precisão interensaio não foram satisfatórios, presumivelmente pelas diferenças da anatoxina-a e a norcocaína em termos de estabilidade em meio alcalino. Como foi explicado anteriormente, a norcocaína é hidrolisada rapidamente em pH alcalino, isso provavelmente provoca variações na quantidade de IS absorvido na fibra, fazendo com que a razão analito/IS não seja constante. Não foi realizado o estudo de recuperação do método por SPME-GC/MS em razão da impossibilidade de avaliar perdas do analito de interesse durante a extração.

4.4.4 Seletividade

Considerando a necessidade de métodos específicos que não ocasionam erros na identificação da anatoxina-a com isóbaros presentes em amostras biológicas, como a fenilalanina, um aminoácido comum que além de ter a mesma massa molecular que a anatoxina-a (MW 165) apresentou um tempo de retenção similar quando analisada por cromatografia líquida em fase reversa. (FUREY *et al.*, 2005). Amostras de água foram adicionadas com fenilalanina (600 ng.mL^{-1}) e analisadas com o método proposto por SPME-

GC/MS. Os cromatogramas demonstraram não haver resposta no GC/MS, portanto, a fenilalanina não é absorvida na fibra de PDMS nas condições do método desenvolvido.

Posteriormente, partiu-se para a análise das amostras de água e florações coletadas. No entanto, após várias tentativas de aplicação direta do método desenvolvido por SPME-GC/MS para determinação de anatoxina-a em florações, observou-se que nas análises do sobrenadante aquoso obtido da sonicação e centrifugação de liofilizado de florações, não havia absorção da anatoxina-a nem norcocaína na fibra de SPME, mesmo adicionando os padrões em altas concentrações (1000 ng). Possivelmente, compostos intracelulares, como pigmentos e proteínas entre outros, liberados após o rompimento das células por sonicação, impediram a absorção dos analitos, pois se sabe que interferentes presentes na amostra podem competir com os analitos ficando em volta da fibra de PDMS e impedindo a sua absorção (ULRICH, 2000).

Desta maneira, em vista da necessidade de fazer um *clean-up* das nossas amostras, investigou-se outra técnica de extração que permitisse eliminar interferentes. Como mostrado na tabela 4, a extração em fase sólida (SPE) é umas das técnicas de extração mais utilizadas na determinação de anatoxina-a em matrizes complexas (aproximadamente 50% dos métodos publicados). Desta maneira, iniciaram-se testes com SPE para se fazer um *clean-up* nas amostras de floração, antes da extração por SPME. Os tipos de cartuchos de SPE utilizados para determinação de anatoxina-a nos métodos descritos na literatura são diversos (HARADA *et al.*, 1993; JAMES, *et al.* 1998; JAMES, *et al.*, 2005). Assim, tanto pela sua disponibilidade e por estarem dentre os tipos de cartucho mais freqüentes na determinação de anatoxina-a, foram testados os cartuchos Supelclean LC-Si, Sep-Pak C₁₈ e Bond Elut Certify (STEVENSON *et al.*, 1988, HIMBERG *et al.*, 1989; ARÁOZ *et al.* 2005). O cartucho misto Bond Elut Certify é usado na determinação de benzoilecgonina (metabolito da cocaína) em urina (PEREIRA *et al.*, 2003).

4.4. Resultados e discussão do desenvolvimento do método por SPE-GC/MS

4.4.1 Resultados com o cartucho Supelclean LC-Si

Na figura 22 podem ser visualizados os cromatogramas obtidos da análise por SPE(Supelclean LC-Si)-SPME-GC/MS das frações coletadas de uma amostra preparada segundo o procedimento descrito em 3.2.3.1.1 e as condições cromatográficas descritas em 3.2.2.2.

Figura 22. Cromatogramas obtidos da análise por SPME-GC/MS das frações de: (A) acetato de etila, (B) metanol:água (1:1) e (C) água após *clean-up* por SPE com cartucho Supelclean LC-Si de uma amostra adicionada com 1000 ng

de padrão de anatoxina e norcocaína, respectivamente. Pico 1 norcocaína derivatizada.

Como pode ser observado nos cromatogramas da figura 22, a anatoxina-*a* não foi detectada no GC/MS em nenhuma das frações coletadas, após *clean-up* da amostra com o cartucho Supelclean LC-Si. Provavelmente, houve uma saturação da capacidade de adsorção da fase sólida usada (*breakthrough*) (AQUINO NETO *et al.*, 2003). A elevada polaridade do grupo silanol presente no cartucho testado, em função a sua atividade ácida e de formação de ligações de hidrogênio, pode ter levado a uma interação irreversível com a anatoxina-*a* dificultando sua liberação do cartucho (AQUINO NETO *et al.* 2003). Já a norcocaína (IS), embora em baixa intensidade, foi detectada em todas as frações coletadas, evidenciando que a diferença de polaridade com a anatoxina-*a* afeta diretamente a interação com o sorbente do cartucho. Os log P da anatoxina-*a* e a norcocaína sem derivatizar são: 0,21 e 1,44, respectivamente (log P obtidos pelo software Chemdraw[®] 8.0), demonstrando a diferença de polaridades das duas moléculas.

4.4.2 Resultados com o cartucho Sep- Pak C₁₈

A figura 23 mostra os cromatogramas obtidos da análise por SPE(Sep-Pak C₁₈)-SPME-GC/MS das três frações coletadas de amostras preparadas segundo o procedimento e as condições cromatográficas descritas em 3.2.3.1.2. e 3.2.2.2.2, respectivamente.

Figura 23. Cromatogramas obtidos da análise por SPME-GC/MS de uma amostra adicionada com 1000 ng de anatoxina-*a* e norcoocaína respectivamente, após *clean-up* com o cartucho Sep-Pak C₁₈. (A) fração metanólica, (B) fração hidroalcoólica, (C) fração aquosa. Pico 1 anatoxina-*a* e pico 2 norcoocaína derivatizadas.

Como mostra a figura 23 a anatoxina-*a* foi detectada somente nas frações hidroalcoólica e aquosa. Considerando as abundâncias dos sinais obtidos por GC/MS, a anatoxina-*a* apresentou um sinal de maior intensidade na fração hidroalcoólica, no entanto, a etapa de secagem dessa fração foi muito demorada. Mesmo assim, foram realizados pré-testes de recuperação,

adicionando-se 200 ng de anatoxina-a na amostra. Os resultados obtidos foram pouco satisfatórios (recuperação menor que 5%).

4.4.3. Resultados com o cartucho Bond Elut Certify

O cartucho Bond Elut Certify contém um tipo de sorvente misto, desenhado para extração de drogas básicas (catiônicas) de matrizes complexas como urina, plasma, soro, sangue total, etc. Os analitos são fortemente retidos por combinação de troca iônica e mecanismos não polares com os dois grupos funcionais ligantes: uma cadeia de oito carbonos (C_8) e ácido benzenosulfônico ($C_6H_6O_3S$). Estas características permitem a aplicação de uma série de lavagens com solventes orgânicos e água para eliminar contaminantes apolares, polares e aniônicos da matriz (YONAMINE, 2000). Deste modo, pode ser efetuado tanto um *clean-up* da amostra, assim como é possível concentrar os analitos de interesse para posteriormente serem analisados por cromatografia líquida, gasosa ou camada delgada.

Na figura 24 podem ser visualizados os cromatogramas obtidos da análise por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS das frações coletadas de uma amostra preparada segundo o procedimento e as condições descritos em 3.2.3.1.3. e 3.2.2.2.2., respectivamente.

Figura 24. Cromatogramas obtidos da análise por SPME-GC/MS das frações obtidas após *clean-up* com cartucho Bond Elut Certify de uma amostra adicionada com 1000 ng de anatoxina-*a* e norcocaina, respectivamente. (A) fração aquosa, (B) fração orgânica. Pico 1 anatoxina-*a* pico 2 norcocaina derivatizadas.

Levando-se em consideração as características do cartucho Bond Elut Certify e a boa resposta obtida no seu uso na determinação de benzoilecgonina, um metabólito de cocaína de características semelhantes ao nosso IS (estrutura química figura 25), foram realizadas análises por SPME-GC/MS das frações aquosa e orgânica coletadas após *clean-up* da amostra com o mencionado cartucho. Os cromatogramas apresentados na figura 24, mostram que embora a anatoxina-*a* tenha sido detectada somente na fração orgânica, tanto ela como IS apresentaram um ótimo sinal. Uma porcentagem de recuperação de 68% obtida em pré-testes, assim como o fato não haver na literatura descrição do uso deste cartucho para determinação de anatoxina-*a*, nos levou a escolhê-lo.

Figura 25. Estrutura química da benzoilecgonina.

A explicação da boa adequação do cartucho Bond Elut Certify na determinação da anatoxina-*a* é que além da possível interação por forças de van der Waals entre o biciclo da anatoxina-*a* e a cadeia alquílica C_8 presente no sorbente do cartucho, haveria atração eletrostática entre a amina protonada da anatoxina-*a* e o grupo benzeno sulfônico do cartucho. O esquema da figura 26 mostra a possível interação entre a anatoxina-*a* e os grupos presentes no cartucho Bond Elut Certify.

Figura 26. Esquema das possíveis interações entre o anatoxina-*a* e os grupamentos do sorvente do cartucho Bond Elut Certify (C_8 e benzenosulfônico).

Seguidamente, considerando a impossibilidade de injetar diretamente extratos aquosos no GC/MS, modificou-se o meio da reação de derivatização com hexilcloroformato para acetonitrila. Desta maneira, evitaria-se o uso de duas técnicas de extração (SPE e SPME) em sequência, já que o eluato seco obtido seria ressuspenso diretamente em solvente orgânico, além de diminuir o número de etapas do novo método.

4.4.4 Resultados e discussão da otimização do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS

Assim sendo, visando à otimização da reação de derivatização no novo meio reacional, foram avaliadas a influência do volume de acetonitrila, a concentração de hexilcloroformato e o tempo de sonicação da reação.

4.4.4.1 Resultados do estudo da influência do volume de acetonitrila

As médias das áreas absolutas da anatoxina-a obtidas com 50 μL e 100 μL de acetonitrila foram: 10847 e 6214, respectivamente. Como houve melhor resposta no GC/MS com 50 μL de acetonitrila, foi escolhido ressuspender o eluato seco com esse volume.

4.4.4.2 Resultados do estudo da concentração de hexilcloroformato

A segunda variável avaliada foi a concentração de hexilcloroformato. As médias das áreas absolutas de anatoxina-a obtidas da injeção de 1 μL das amostras preparadas conforme descrito no item **3.2.3.2.2.** foram: 10847 e 9817 para 37,5 e 75 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ (2 e 4 μL de hexilcloroformato), respectivamente. Não foram observadas grandes diferenças nos sinais obtidos no GC/MS entre as duas concentrações testadas (37,5 e 75 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). Consequentemente foi adotada a menor concentração de agente derivatizante.

4.4.4.3 Resultados da influência do tempo de sonicação

Do estudo do tempo de sonicação apropriado para a reação de derivatização em acetonitrila, como pode ser observado na figura a continuação, 10 minutos de sonicação foram suficientes para obter o melhor sinal no GC/MS. A figura 27 mostra a influência do tempo de sonicação na reação de derivatização da antoxina-a com hexilcloroformato em acetonitrila, conforme ao procedimento descrito em **3.2.3.2.3.**

Figura 27. Estudo do efeito do tempo de sonicação na eficiência da reação de derivatização da anatoxina-a com hexilcloroformato.

4.4.4.4 Resultados da influência do pH

Em razão de não contarmos com uma amostra de floração positiva para anatoxina-a, não foi possível realizar grandes modificações na extração propriamente dita, apenas foi avaliada a resposta em função do pH.

No GC/MS foram obtidas as médias das áreas absolutas de anatoxina-a de 55725 e 101765 para o grupo de amostras preparadas com tampão fosfato (pH=6,8) e água:tampão fosfato, respectivamente. Embora as diferenças de pH entre os grupos testados não tenha sido muito grande, de acordo com os resultados obtidos, a melhor condição consistiu em ressuspender o liofilizado com a mistura água:tampão fosfato. Assim, garante-se a ruptura da parede celular das cianobactérias liofilizadas e a semelhança de condições de pH da amostra e o sorvente do cartucho após condicionamento com tampão.

Após a otimização das variáveis mencionadas, seguindo os critérios adotados na validação do método por SPME-GC/MS para determinação de anatoxina-a em água, foi realizada a validação do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.

4.5 Resultados da validação do método desenvolvido por SPE(Bond Elut Certify)GC/MS

4.5.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Para o método proposto por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS para determinação de anatoxina-a em florações o LOD e LOQ obtidos foram de 10 e 13 ng.mg⁻¹ de liofilizado, respectivamente.

O limite de detecção e quantificação obtidos neste método estão de acordo com os limites publicados na literatura para este tipo de matriz (ver tabela 4). Cabe salientar, que embora sejam usadas células liofilizadas como amostra, a unidade reportada em vários dos artigos é expressa em unidade de massa/volume (ng.L⁻¹ ou ng.mL⁻¹), e em alguns deles os resultados são reportados em relação ao volume de meio de cultura, solvente usado para ressuspender as células ou volume de água filtrada.

A figura 28 apresenta os cromatogramas relativos ao LOD e LOQ obtidos por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.

Figura 28. Cromatogramas referentes ao LOD e o LOQ do método desenvolvido por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS obtidos da análise de amostras de floração de cianobactéria liofilizada adicionadas com 10 ng.mg^{-1} e 13 ng.mg^{-1} de anatoxina-a, respectivamente. Pico 1 anatoxina-a derivatizada, pico 2 norcoocaína derivatizada.

4.5.2 Linearidade

O método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS, demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada ($13 - 250 \text{ ng.mg}^{-1}$). A figura 29 apresenta a curva de calibração construída a partir do estudo de linearidade. A equação de regressão linear e coeficiente de correlação obtido para o método por SPE-GC/MS foram $Y = 0,422X - 0,3487$ e $r^2 = 0,993$ [onde Y e X representam a razão entre a área dos picos (analito/IS) e a concentração do calibrador correspondente, respectivamente].

Figura 29. Curva de calibração para determinação de anatoxina-a em florações por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS). Concentrações de 13 a 250 ng.mg⁻¹.

Os resultados obtidos do teste de homocedasticidade aplicados para o método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Teste de homocedasticidade da curva de calibração do método para determinação de anatoxina-a florações por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS.

Método	s_2^2	s_1^2	F_{exp}	F_{tab}	Resultado
SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS	0,3300	0,003	94,974	99	$F_{exp} < F_{tab} =$ Homocedasticidade

s_2^2 = variância do limite superior de quantificação

s_1^2 = variância do limite inferior de quantificação

F_{exp} = valor de F experimental

F_{tab} = valor de F tabelado, 99% de intervalo de confiança, números de graus de liberdade=2

Como o método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS mostrou-se homocedástico não foi necessário fazer a análise de regressão linear ponderada. Sendo mantidas a equação e o coeficiente de correlação apresentados.

4.5.3 Repetibilidade

Os valores de CV obtidos do estudo de repetibilidade do método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS para CQB, CQM e CQA (CV= 12, 6 e 16%, respectivamente) foram considerados aceitáveis, quando consideradas variáveis como eficiência de derivatização, extração por SPE e análise por cromatografia gasosa. Contudo, novamente o estudo de precisão interensaio

não foi satisfatório. Para verificar até que ponto a variação inerente ao equipamento estaria influenciando as análises foram preparadas amostras adicionadas com 200 ng de anatoxina-*a* e norcocaína (n=5). Após a injeção dessas amostras, os extratos foram misturados e esse *mix* foi injetado 5 vezes. A partir do cálculo do CV, foi obtido que a variação do equipamento está na faixa de 20-30% o que é razoável, considerando que, o GC/MS utilizado neste trabalho é obsoleto, se comparado com equipamentos mais sofisticados e precisos presentes no mercado. Além do mais, observou-se que a variação da anatoxina-*a* nem sempre foi corrigida pela norcocaína, o que levaria aos problemas enfrentados no cálculo da precisão interensaio.

4.5.4 Recuperação

De acordo com a definição da Portaria 899 da ANVISA, a recuperação de um método analítico é entendida como a avaliação da eficiência de extração, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. Mesmo assim, embora sejam desejáveis porcentagens de próximas a 100%, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa (ANVISA, 2003).

Os resultados do estudo de recuperação obtidos da análise de anatoxina-*a* em liofilizado por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS foram de 85% para a concentração de 40 ng.mg⁻¹, 86% para a concentração de 120 ng.mg⁻¹ e 96% para a concentração de 210 ng.mg⁻¹.

4.6 Resultados e discussão dos testes com LLE

Com o objetivo de se fazer uma comparação da eficiência de extração da anatoxina-*a* a partir de água usando a técnica LLE, ainda foram analisadas amostras preparadas seguindo os procedimentos apresentados nos itens **3.2.5.1** e **3.2.5.2** de “Materiais e Métodos”.

Não houve resposta no GC-MS das injeções realizadas utilizando o procedimento 1 (item **3.2.5.1**). A figura a seguir (Figura 30) apresenta um cromatograma obtido da análise de uma amostra de referência negativa

adicionada com os padrões de anatoxina-a e norcocaína (80 e 20 ng.mL⁻¹, respectivamente) usando o procedimento descrito no item 3.2.5.2.

Figura 30. Cromatograma obtido por LLE e GC-MS de uma amostra adicionada com 80 ng.mL⁻¹ anatoxina-a (pico 1) e 20 ng/mL norcocaína (pico 2).

Os resultados obtidos da aplicação do segundo procedimento (item 3.2.5.2) mostraram que para uma concentração de 80 ng.mL⁻¹ de anatoxina-a e 20 ng.mL⁻¹ de norcocaína, elas foram muito pouco extraídas como mostra a figura 26 (menos de 5% comparado com os resultados obtidos para essas mesmas concentrações por SPME).

4.7 Resultados e discussão da análise de amostras ambientais

4.7.1 Resultados obtidos por microscopia óptica

Foram identificados por microscopia óptica os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis* e *Anabaena sp.* em algumas das amostras coletadas. A figura 31 apresenta as fotos microscópicas referentes às amostras coletadas no Reservatório Billings, braço Taquaçetuba, São Paulo-SP (ii) e I.C. Camp.- Reservatório Americana-SP (v)

Figura 31. (A) Microfotografia de um aglomerado de *Microcystis* sp. da amostra coletada no I.C. Camp., aumento 400X (B) Microfotografia de *Anabaena* sp. da amostra coletada no I.C. Camp., aumento 400X (C) Microfotografia dos gêneros *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* sp. da amostra coletada no Reservatório Billings, braço Taquaçetuba, aumento 400X (D) Microfotografia dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* sp. da amostra coletada no Reservatório Billings, braço Taquaçetuba.

Desta forma, com a identificação desses gêneros na água, podia-se supor inicialmente pressupor a possibilidade da presença de anatoxina-a nas amostras, o que não foi comprovado com a aplicação dos métodos.

Cabe salientar, que somente foi realizada a observação no microscópio óptico em lamina de vidro e não houve a contagem de células que permitisse ter a relação de número de células por volume de amostra.

4.7.2 Resultados obtidos por SPME-GC/MS

As amostras de água descritas no item 3.1.4.4.1. foram analisadas utilizando o método desenvolvido por SPME-GC/MS, sendo todas elas

negativas para presença de anatoxina-a. Com o objetivo de verificar se compostos naturais presentes em amostras de campo poderiam interferir no método analítico desenvolvido, analisamos novamente algumas dessas amostras acrescentando padrão de anatoxina-a na concentração mais baixa da nossa curva de calibração. A anatoxina-a foi detectada em todos os casos.

4.7.3 Resultados obtidos por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS

As amostras de floração descritas em **3.1.4.4.2.** foram analisadas pelo método desenvolvido por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS, sendo negativas para anatoxina-a.

Embora as análises de amostras de campo tenham sido negativas, foi demonstrado neste trabalho que o método desenvolvido para água possibilita a detecção de anatoxina-a em baixas concentrações ($2,5 \text{ ng.mL}^{-1}$), já que ao se adicionar tal quantidade de padrão a anatoxina-a foi detectada em todas as amostras aquosas reanalisadas.

A anatoxina-a é a neurotoxina do grupo das anatoxinas que tem sido encontrada com maior frequência em algumas regiões do mundo, a detecção de anatoxina-a no meio ambiente tem algumas dificuldades, pois segundo alguns autores, trata-se de uma molécula fotossensível, especialmente em meio alcalino. Foi comprovado que a anatoxina-a teria uma meia vida de 2 horas sob condições de luz intensa (pH 9 a 12) e de 5 dias em condições normais de luz (12 horas claro: 12 horas escuro; pH=8 a 10) (STEVENS *et al.*, 1991, SMITH *et al.*, 1993). Portanto, as condições de coleta e armazenamento são de grande relevância na determinação dessa toxina. Apesar de até o momento não ter sido identificada a presença de anatoxina-a nos ecossistemas aquáticos brasileiros, os métodos desenvolvidos no presente trabalho poderão ser utilizados em outras regiões do mundo, permitindo o controle rigoroso da qualidade das águas.

5. CONCLUSÕES

- i. O método por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME-GC/MS) desenvolvido demonstrou ser rápido, sensível e eficiente para determinação de anatoxina-*a* em amostras de água;
- ii. Observou-se boa sensibilidade e linearidade do método na faixa estudada (2.5 to 200 ng.mL⁻¹). O coeficiente de correlação (r^2) obtido foi 0.991. O cartucho Bond Elut Certify demonstrou-se ser apto para a determinação de anatoxina-*a* em amostras de floração. Evidenciou-se que o método por SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS é sensível, linear e preciso dentro da faixa de estudo (13-250 ng.mg⁻¹);
- iii. Os métodos desenvolvidos por SPME-GC/MS e SPE(Bond Elut Certify)-GC/MS podem ser aplicados na monitorização de anatoxina-*a* em amostras ambientais e inclusive no controle de qualidade das águas de abastecimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods *J. Cromatogr. B* v.774, p.215-222, 2002.

ALKONDON, M.; ALBURQUERQUE, E. X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. III. Agonist actions of the novel alkaloid epibatidine and analysis of type II current. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 274, n.2, p. 771-782, 1995.

AMBRUSTER, D. A.; TILLMAN, M. D.; HUBBS, L. M. Limit of detection (LOD)/Limit of quantification (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 1233-1238, 1994.

ANVISA. Portaria n. 518/00, 25 de março de 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469_00.htm. Acesso em 1 de junho 2006.

ANVISA. Resolução n. 899, 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899.htm>. Acesso em 13 de outubro de 2003.

AQUINO NETO, F. R.; SOUZA NUNES, D. S **Extração por Fase sólida: Cromatografia** Rio de Janeiro : Interciência, 2003, p 5-18.

ARÁOZ, R.; NGHIÊM, H.; RIPPKA, R.; PALIBRODA, N.; TANDEAU, N. M.; HERDMAN, M. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology*, v. 151, p. 1263-1273, 2005.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers *Anal. Chem.*, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

ASTRACHAN, N. B.; ARCHER, B. G.; HILBELINK, D. R. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon*, v. 18, p. 684-688, 1980.

AULAKH, J.S.; MALIK, A.K.; KAUR, V.; SCHMITT-KOPPLIN, P. A Review on Solid Phase Micro Extraction-High Performance Liquid Chromatography (SPME-HPLC) Analysis of pesticides. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, v. 35, p. 71-85, 2005.

BARIK, J.; WONNACOTT, S. Indirect Modulation by $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors of Noradrenaline Release in Rat Hippocampal Slices: Interaction with

Glutamate and GABA Systems and Effect of Nicotine Withdrawal. *Mol. Pharmacol.*, v. 69, p. 618-628, 2006.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; KUJBIDA, P.; CARDOZO, K.; CARVALHO, V.; MOURA, A.; COLEPÍCOLO, P.; PINTO, E. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komarek *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 326, n. 3, p. 687-94, 2005.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; LOTUFO, J.G.; BARROS, M. T. **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo:Prentice Hall, 2002, p.305.

BUMKE-VOGT, C.; MAILAHN, W.; ROTARD, W.; CHORUS. I. A highly sensitive analytical method for the neurotoxin anatoxin-a, using GC-ECD, and first application to laboratory cultures. *Phycologia*, v. 35, n. 6, p. 51-56, 1996. *apud Scinfinder.Abstacts*.

CAO, J.; SUROWOY, C.; PUTTFARCKEN, P. Nicotinic Acetylcholine Receptor – Mediated [³H]Dopamine Realease from Hippocampus. *Pharmacol. Exp. Ther* v. 312, p. 1298-1304, 2004.

CARLILE , P. Further Studies to Investigate Microcystin-LR and Anatoxin-a Removal from Water. FOUNDATION FOR WATER RESEARCH , Marlow, UK, Report No. 0458, 1994. Disponível em: <http://www.fwr.org>. Acesso em 10 de maio 2006.

CARMICHAEL, W. W.; BIGGS, D. F.; PETERSON, M. A., PETERSON, M. A. Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon*, v. 17, n. 3., p. 229-236, 1979.

CARMICHAEL, W.W.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. In: *Freshwater Cyanobacteria (blue-green algae) toxins, natural toxins, Pharmacology and Therapeutics*, ed. Pergamon Press, Oxford, 1989, p. 3.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL W.W The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.*, v.270, n.1, p.781-796, 1994.

CARMICHAEL, W. W. The cyanotoxins. *Adv. Botan. Res.*, v. 27, p. 211-256, 1997.

CARMICHAEL, W. W.; *ET AL*. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Persp* v. 109, p. 663-668, 2001.

CARVALHO , S. L. Eutrofização artificial: um problema em rios, lagos e represas. <http://www.agr.feis.unesp.br/ctl28082004.php>. Acesso em 12 set. 2005.

CHORUS, I.; BARTRAM, J., eds. **Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon Press, 2003. 416 p.

CODD, G. A.; WARD, C. J.; BEATTIE, K. A.; BELL, S. G. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOTOTROPHIC PROKARYOTES, 9th, Vienna, Italy, 1999. n.p.

COELHO-BOTELHO, M.J. **Dinâmica da comunidade zooplanctônica e sua relação com o grau de trofia em reservatórios**. CETESB, 2004.

CROLL, B.; HART, J. Algal toxins and costumers. In: UKWIR-AWWARF TECHNOLOGY TRANSFER CONFERENCE, Philadelphia, 1996. *apud* CHORUS, I.; BARTRAM **Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon Press, 2003, p. 276-312.

DAGNINO, D.; SCHRIPSEMA, J. ^1H NMR quantification in very dilute toxin solutions: application to anatoxin-a analysis. *Toxicon*, v. 46, p. 236-240, 2005.

DALIT, E. D.; ZINDER, O. Catecholamine Secretion from Bovine Adrenal Chromaffin Cells Induced by the Dextrorotatory Isomer of Anatoxin-a *Gen. Pharmac.*, v. 31, p. 737-740, 1998.

DEVLIN, J. P.; EDWARDS, O. E.; GORHAM, P. R.; HUNTER, P. R.; PIKE, R. K.; STAVIE, B. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.*, v. 55, p. 1367-1371, 1977.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins- occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 50, p. 1-6, 2006.

DIZIOLI, C., **Determinação de canabinoides em cabelo por microextração em fase sólida por headspace e análise por espectrometria de massas associada à cromatografia gasosa**. São Paulo, 2005. 113 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DOMINGOS P.; RUBIM T.K.; MOLICA R.J.R. ; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL W.W. First report of microcystis production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from northeast brazilian drinking water supply. *Environ. Toxicol.*, v. 14, n. 1, p. 31-35, 1999.

DRAISCI, R.; FERRETI, E.; PALLESCHI, L.; MARCHIAFAVA, C. Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, v. 18, n. 6, p. 525-531, 1991.

DUBE, S. N.; MAZUMDER P. K.; KUMAR, D.; RAO, P. V. L.; BASHKAR, A. S. B. Cardiorespiratory & neuromuscular effects of freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* in rats. *Def. Sci. J.*, v. 46, p. 135-141, 1996.

EDWARDS, C.; BEATTIE, K. A.; SCRIMGEOUR, C. M.; CODD, G. A. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*, v. 30, p. 1165, 1992.

FRANKE, J. P.; ZEEUW, R. A. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr. B* v.713, p. 51-59, 1998.

FALCONER, I.; RUNNEGAR, M.; BUCKLEY, T.; HUYN, V.; BRADSHAW, P. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *J. Am. Water Works Assoc.* v. 81, n. 2, p. 102-105, 1989. *apud Scinfinder Abstract*.

FAWELL, J. K.; JAMES, H. A. Report No. *FR 0434/DoE 3728*, Alien House. The Listons, Listen Road, Marlow, Bucks, SL7 1FD, UK, 1994.

FITZGEORGE, R. B.; CLARK, S. K.; KEEVIL, C.W. Routes of intoxication. In: CODD, G. A.; JEFFRIES, T. M.; KEEVIL, C. W.; POTTER, E. Eds 1st. *International Symposium on Detecion Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 69-74, 1994.

FUREY, A.; CROWLEY, J.; SHUILLEABHAIN, A. N.; SKULBERG, O. M.; JAMES, K. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Irealnd. *Toxicon*, v. 41, p. 297-303, 2003.

FUREY, A.; CROWLEY, J.; HAMILTON, B.; LEHANE, M.; JAMES, K.J. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *J. Chromatogr. A*, v. 1082, n. 2, p. 91-97, 2005.

GALLON, J.; KITTA KOOP, O.; BROWN, E. Biosynthesis of anatoxin-a by *Anabaena flos-aquae*: examination of primary enzymic steps. *Phytochemistry*, v. 29, p. 1107-1111, 1994.

GHASSEMPOUR, A.; NAJAFI, N. M.; MEHDINIA, A.; DAVARANI, S.S.H.; FALLAHI, M.; NAKHSHAB, M. Analysis of anatoxin-a using polyaniline as a sorbent in solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1078, n. 1-2, p. 120-127, 2005.

GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE, A.; SCHMIDT, W.; CHORUS, I.; HEIJMAN, S. Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. *J. Membrane. Sci.* v. 276, p. 252-259, 2006.

GUGGER, M.; LENOIR, S.; BERGER, C.; LEDREUX, A.; DRUART, J.; HUMBERT, J.; GUETTE, C.; BERNARD, C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis *Toxicon* v. 45, n. 7, p. 919-928, 2005.

HARADA, K.; KIMURA, Y.; OGAWA, K.; SUZUKI, M.; DAHLEM, A. M.; BEASLEY, V. R.; CARMICHAEL, W. W. A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* v. 27, n. 12, p. 1289-1296, 1989.

HARADA, K.; NAGAI, H.; KIMURA, Y.; SUZUKI, M.; PARK, H.; WATANABE, M.; LUUKKAINEN, R.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W. Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria *Tetrahedron*, v. 49, n. 41, p. 9251- 9260, 1993.

HART, J.; FAWELL, J.; CROLL, B. The fate of both intra and extracellular toxins during drinking water treatment. In IWSA WORLD CONGRESS. Special subject No. 18, SS18-1-6, Blackwell Science, Oxford, 1997. *apud* Scinfinder *Abstracts*.

HEMSCHEIDT, T.; RAPALA, J.; SIVONEN, K.; SKULBERG, O. M. Biosynthesis of anatoxin-a in *Anabaena flos-aquae* and homoanatoxin-a in *Oscillatoria formosa*. *J. Chem. Soc. Chemical Communications*, p.1361-1362, 1995b.

HIMBERG, K. Determination of anatoxin-a, the neurotoxin of *Anabaena flos-aquae* cyanobacterium, in algae and water by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, v. 481, p. 358-362, 1989.

HUMPAGE, A. R.; ROSITANO, J.; BRETAG, A. H.; BAKER, P. D.; NICHOLSON, B. C.; STEFFENSEN A. Paralytic shellfish poisons from Australian blue-green algal (cyanobacterial) blooms *Aust. J. Mar. Freshwater* v. 45, n. 6, p. 761-771, 1994.

HUSEK, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents *J. Chromatogr. B*, v. 717, p. 57-91, 1998.

JAMES, K. J.; SHERLOCK, I. R.; STACK, M. A. In: 12TH EUROPEAN SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXIN, Basal, Switzerland 1997a.

JAMES, K. J.; FUREY, A.; KELLY, S. S.; SHERLOCK, I. R.; STACK, M. A., The first identification of neurotoxins in freshwater and shellfish in Ireland. *Toxicon* v. 35, n. 6, p. 811, 1997b.

JAMES, K.; FUREY, A.; SHERLOCK, I. R.; STACK, M. A.; TWOHIG, M.; CAUDWELL B. F.; SKULBERG O. M. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr A* v. 798, p. 147-157, 1998.

JAMES, K. J.; CROWLEY, J.; HAMILTON, B.; LEHANE, M.; SKULBERG, O.; FUREY, A. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 19, p. 1167-1175, 2005.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E.; ANTUNES, M. B.; DE MELHO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S.; AZEVEDO, S. M.; JARVIS, W. R. N. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *Engli. J. Med.*, v. 26, n. 13, p. 873-878, 1998.

JOHNSON, E. L.; REYNOLDS, D. S.; WRIGHT, L. A.; PACHLA, J. Biological sample preparation and data reduction concepts in pharmaceutical analysis. *J. Chromatogr. Sci.* v. 26, n. 8, p. 372-379, 1988.

KEIJOLA, A.; HIMBERG, K.; ESALA, A.; SIVONEN, K.; HIISVIRTA, L. Renoval of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot-scale experiments. *Tox. Assess.*, v.3, p. 643-656, 1988. *apud* CHORUS, I.; BARTRAM **Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon Press, 2003, p. 276-312.

KUJBIDA, P **Microcistinas produzidas pela cianobactéria *Microcystis panniformis* e alguns efeitos sobre funções de neutrófilos humanos**. São Paulo, 2005. 77p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KUJBIDA, P; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPÍCOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 341, n. 1, p. 273-277, 2006.

KOMAREK J.; KOMARKOVA-LEGNEROVA J.; SANT'ANNA C.L.; AZEVEDO M.T.D.; SENNA P.A.C. Two common microcystis species (cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie algologie* v. 23, n. 2, p. 159-177, 2002.

KOSKINEN, A. M. P.; RAPOPORT, H. J. Synthetic and conformational studies on anatoxin-a: a potent acetylcholine agonist. *J. Med. Chem.* v. 28, N.9, p. 1301-1309. 1985.

KRIENITZ, L.; BALLOT, A.; KOTUT, K.; WIEGAND, C.; PUTZ, S.; METCALF, J. S.; CODD, G. A.; PFLUMACHER, S. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, p. 141-, 2003.

LAKSHMANA P. V.; BHATTACHARYA, R.; GUPTA, N.; PARIDA, M. M.; BHASKAR, A. S. B.; DUBEY, R. Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells. *Arch. Toxicol.*, v. 76, p. 227, 2002.

LEE, R. E. **Phycology**, Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 92-93, 1991.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A*, v. 902, p. 17-63, 2000.

MACKINTOSH, CAROL; BEATTIE, KENNETH A.; KLUMPP, SUSANNE; COHEN, PHILIP; CODD, GEOFFREY A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants *FEBS Letters* v. 264, n. 2, p. 187-92, 1990.

MAIZELS, M.; BUDDE, W.L. A LC/MS method for the determination of cyanobacteria toxins in water. *Anal. Chem.*, v. 76, p. 1342-1351, 2004.

MARCHI, M.; RISSO, F.; VIOLA, C.; CAVAZZANI, P.; RAITERI, M. Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminal. *J Neurochem.*, v.80, p.1071-1078, 2002.

MILLS, G.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr. A*, v. 902, p. 267-287, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10959>. Acesso em 31 maio 2006.

MITROVIC, S. M.; PFLUMACHER, S.; JAMES, K. J.; FUREY, A. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquatic Toxicology*, v. 68, n. 2, p. 185-192, 2004.

MOLICA, R. J.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. V.; COSTA, A. N.; CUNHA, C. C.; MELO, G.; AZEVEDO, S. M. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*, v. 4, p. 743-753, 2005.

MOLLOY, L.; WONNACOTT, S.; GALLAGHER, T.; BROUGHT, P. A.; LIVETT, B. G. Anatoxin-a is a potent agonist of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenal chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 289, n. 3, p. 447-453, 1995.

MULLER, L.; FATTORE, E.; BENFENATI, E. Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples *J. Chromatogr. A*, v. 791, p. 221-230, 1997

NAMERA, A.; SO, A.; PAWLISZYN, J. Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber derivatization. *J Chromatogr A*, v. 963, n. 1-2, p. 295-302, 2002.

NAMIKOSHI, M.; MURAKAMI, T.; FUJIWARA, T.; NAGAI, H.; NIKI, T.; HARIGAYA, E.; WATANABE, M.; ODA, T.; YAMADA, J.; TSUJIMURA, S. Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 17, p. 1692-1696, 2004.

O'REILLY, J.; WANG, O.; SETKOVA, L.; HUTCHINSON, J.P.; CHEN, Y.; LORD, H.L.; LINTON, C.M.; PAWLISZYN, J. Automation of solid-phase microextraction *J. Sep. Sci.*, v. 28, n. 15, p. 2010-2022, 2005.

PEREIRA DE TOLEDO, F. C.; YONAMINE, M.; MOREAU, R. L.; SILVA, O. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr B*, v. 798, n. 2, p. 361-365, 2003.

PEAT, M.; DAVIS, A. Analytical considerations and approaches for drugs. In: KARCH, S. B., **Drug abuse Handbook**. Boca Raton: CRC Press, 1998, p. 751-764.

PFLEGER, F.; MAURER, H.; WEBER, A. **Mass Spectral and GC Data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites**. 2 ed. Germany: VCH, 1992. p. 1415.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C.J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, v. 352, n. 4, p. 21-26, 1998.

QUILLIAM, M. A. *Phycotoxins*. *J. AOAC Int.*, v. 82, n. 3, p. 773-781, 1999.

RAPALA, J.; IAHILI, K.; SIVONEN, K.; NIEMELAE, S. I. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 19, p. 423, 1994.

RODRÍGUEZ, S. V. C.; MOURA, S.; PINTO, E.; PEREIRA, C.; BRAGA, R. Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos *Quim Nova* v. 29, n. 6, p. 1365-1371, 2006a.

RODRÍGUEZ, S. V. C.; YONAMINE, M.; PINTO, E. Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry *J. Sep. Sci.* v. 29, p. 2085-2090, 2006b.

ROSITANO, J.; NICHOLSON, B. **Water treatment Techniques for Removal of Cyanobacterial Toxins from Water**. Australian Centre for Water Quality Research. Salisbury, South Australia, [s.n.], 1994, 55p. *apud* CHORUS, I.; BARTRAM **Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon Press, 2003, p. 276-312.

RUSEVA, E.; PIETSCH, J.; FICHTNER, S.; LUTZ, I.; SCHMIDT, W. Determination of cyanobacterial hepato- and neurotoxins in water samples by HPLC-ESI-MS-MS. *Chimia*, v. 57, n. 1-2, p. 32, 2003.

SANT'ANA C.L. & AZEVEDO M.T.D. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* v. 71, n. 3-4, p. 359-385, 2000.

SIVONEN, K.; NIEMELA, S.; NIEMI, R.; LEPISTO, L.; LUOMA, H.; RASANEN, L. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters *Hydrobiologia*, v. 190, p. 267-275, 1990.

SKULBERG O. M.; CARMICHAEL, W. W.; ANDERSEN, R. A.; MATSUNANGA, S.; MOORE, R. E.; SKULBERG, R. Investigations of a neurotoxic oscillatoriacean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 11, p. 321-329, 1992.

SIVONEN, K.; NIEMELA, S.; NIEMI, R.; LEPISTO, L.; LUOMA, H.; RASANEN, L. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters *Hydrobiologia*, v.190, p.267-275, 1990.

SMITH, C; SUTTON, A. The persistence of anatoxin-a in reservoir water. Foundation for Water Research, UK Report No. FR0427, 1993.

SMITH, P. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). *Toxicon*, v. 34, n. 8, p. 857-869, 1996.

SMITH, R. A. ; LEWIS, B. A rapid Analysis of water for anatoxin-a, the unstable toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae*, the stable non-toxic alkaloids left after bioreduction and a related amine which may be nature's precursor to anatoxin-a, *Vet. Hum. Toxicol.* v. 29, n. 2, p. 153-154, 1986.

SOLIAKOV, L.; GALLEGHER, T.; WONNACOT, S. Anatoxin-a-evoked [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes *Neuropharmacology*, v. 34, n. 11, p. 1535-1541, 1975.

SOLOMONS, T. W.; CRAIG, F. *Organic Chemistry*. 7ed.. New York: Wiley, 2000, 846 p.

STEVENS D.K., KRIEGER R.I., Analysis of anatoxin-a by GC-ECD *J. Anal. Toxicol.*, v. 12, p. 126-131, 1988.

STEVENS, D. K.; KRIEGER, R. I. Applications of a sensitive, GC-ECD analysis for anatoxin-a *Toxicon*, v. 27,n. 1, p. 79, 1989.

STEVENS, D.K.; KRIEGER, R.I. Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-a. *Toxicon*, v. 29, n. 2, p. 167-179, 1991.

SVERCK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.*,v. 3, p. 155, 2004.

SWANSON, K. L.; ALLEN, C. N.; ARONSTAM, R. S.; RAPAPORT, H.; ALBURQUERQUE, E. X. Molecular mechanisms of the potent and

stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Molecular Pharmacology*, v. 29, n. 3, p. 250-257, 1986.

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.; JONG, G. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 475, p. 49-82, 2000.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. *Quim. Nova*, Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados v. 27, p. 441, 2004.

TURNER, P.C.; GAMIE, A. J.; HULLINRAKE, K.; CODD, G. A.; *Br. Med. J.* v. 300, p. 1440, 1990.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WANATABE, M.; PARK, H.D.; CHEN, G.; YU, S.Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* v. 17, p. 1317-1321, 1996.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 902, p. 167-194, 2000.

VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, v. 39, p. 233-254, 2004.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algae: from aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. *Quim. Nova* v. 27, n.1, p. 139-145, 2004.

WALKER, V.; MILLS, G. Solid-phase extraction in clinical biochemistry *Ann Clin Biochem* v. 39, p. 464-477, 2002.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais.** São Paulo, 2004. 117 p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

YONAMINE, M. **Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas.** São Paulo, 2000. 96 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O.A. Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr. B*, v. 789, n. 1, p. 73-78, 2003.

ZAGATO, P.A., ARAGÃO, M. A., CARVALHO, M.C., SOUZA, R.C.R. **Manual de Orientação em casos de Florações de Algas Tóxicas: um Problema Ambiental e de Saúde Pública**. São Paulo: CETESB, 1997.p. 9-10.

ZOTOU, A.; JEFFERIES, T.; BROUGH, P.; GALLAGHER, T. Determination of Anatoxin-*a* and Homoanatoxin-*a* in Blue-Green Algal Extracts by High-performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analyst*, v. 118, p. 753-758, 1993.