



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

LARISSA SOUSA SILVINO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE SAXITOXINA E dc-
SAXITOXINA EM ÁGUA VIA DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA**

FORTALEZA

2014

LARISSA SOUSA SILVINO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE SAXITOXINA E de-
SAXITOXINA EM ÁGUA VIA DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. José Capelo Neto.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

S594v

Silvino, Larissa Sousa.

Validação da metodologia para análise de Saxitoxina e dc-Saxitoxina em água via derivatização pré-coluna / Larissa Sousa Silvino. – 2014.

75 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. José Capelo Neto.

1. Saneamento. 2. Cianobactérias. 3. Eutrofização. 4. Água – Qualidade. I. Título.

LARISSA SOUSA SILVINO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE SAXITOXINA E de-
SAXITOXINA EM ÁGUA VIA DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Capelo Neto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Rita Mickaela Barros de Andrade
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Aos meus pais, Márcia Maria Sousa Silvino e
Silvanildo Tavares Silvino, pelo amor, carinho
e dedicação.

AGRADECIMENTO

À Deus, que concede a vida, a saúde, as oportunidades, e a força para lutar e vencer os desafios que surgem na nossa vida.

À minha família, meus pais Silvanildo e Márcia, minha irmã Amanda e minha “vó Jovem” (minha avó), pelo amor e apoio incondicional e pelos preciosos ensinamentos e valores que recebi ao longo da minha vida. Meu eterno amor e gratidão!

Ao meu namorado Sinueh, pelo seu amor, carinho, companheirismo, compreensão e motivação nos momentos difíceis.

A todos os meus tios, primos, cunhados e sogros.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Capelo Neto, por ter acreditado em mim, pela orientação desta dissertação, colaboração para o meu crescimento científico e profissional, compreensão, paciência e atenção que me concedeu no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento por estar disposto a prestar-me esclarecimentos sempre que precisei em questões técnicas relacionadas a este estudo.

Aos meus amigos do mestrado, em especial Sâmara, Priscila, Patrícia e Karina, pelo apoio, conselhos, por encorajar-me durante todo esse período, cada um de alguma forma contribuiu para a realização desta pesquisa.

Aos companheiros de laboratório (SELAQUA), Ticiane, Jolita, Ana Zélia, Thaís, Mario, Régis, Rhayam, Ivinne e em particular ao Ismael, por me ajudar nas traduções desta pesquisa.

Aos amigos queridos Mayara e Hermeson, pela amizade, carinho, apoio, conselhos, e por estar ao meu lado durante toda minha formação acadêmica.

A todos os meus amigos, cada um com um papel especial em todas as situações da minha vida, sempre contribuindo para minha felicidade.

Aos professores do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA) pela oportunidade de crescimento intelectual.

À Prof.^a Dra Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo da Universidade Federal do Rio de Janeiro por nos ceder à cepa utilizada no trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelo gentil aceite do convite de participação e suas contribuições pertinentes ao trabalho.

A empresa Companhia de Água e Esgoto do Ceara (CAGECE), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro para realização da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão!

Não existe o “melhor método” em termos absolutos, senão o “método mais adequado” para a resolução de um problema concreto.

M. Pistonesi

RESUMO

A intensificação da eutrofização nos mananciais é provocada pelas ações antrópicas e tem como predominância as florações de cianobactérias. Por sua vez, estas cianobactérias alteram a qualidade da água para o abastecimento da população, e, ao serem lisadas, podem liberar toxinas (cianotoxinas) causando intoxicação. A primeira confirmação *in loco* da morte de seres humanos por intoxicação com cianotoxinas no Brasil levou o Ministério da Saúde a publicar rapidamente novas portarias sobre o monitoramento da qualidade da água bruta que incorporaram novos indicadores, como a concentração das cianobactérias e de suas toxinas nos mananciais utilizados para abastecimento de água potável. Com isso, as tecnologias para o tratamento da água e para a identificação e quantificação das cianotoxinas vêm passando por um processo de aperfeiçoamento. Neste contexto, o presente trabalho objetivou validar o método de cromatografia líquida de fase reversa com detector de fluorescência e derivatização pré-coluna para detecção e quantificação das cianotoxinas saxitoxina e decarbamoil-saxitoxina proveniente do cultivo da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. Esta validação foi realizada para dar confiabilidade ao método analítico, sendo os parâmetros selecionados: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez. Os resultados obtidos apresentaram boa seletividade, comprovando que o método possuía capacidade de medir as toxinas em uma matriz Pós Extração na presença de outros componentes. As curvas analíticas foram construídas com nove pontos a partir dos padrões de saxitoxina e decarbamoil-saxitoxina. O método apresentou uma linearidade no intervalo de 4,5 à 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para saxitoxina e 3,0 à 132 $\mu\text{g L}^{-1}$ para decarbamoil-saxitoxina, e o coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para as duas toxinas, mostrando que o método tem a capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos detectados. A sensibilidade foi medida através do limite de detecção e quantificação, obtendo resultados satisfatórios para os objetivos do trabalho. O método obteve boa precisão e exatidão, visto que para saxitoxina e decarbamoil-saxitoxina os diferentes níveis de concentração estavam com valores dentro dos intervalos permitidos pelas normas brasileiras de validação, e apresentou-se robusto, pois foi insensível a pequenas variações possíveis de ocorrer durante a análise. Em resumo, pode-se considerar que o método utilizado para a detecção e quantificação das cianotoxinas saxitoxina e decarbamoil-saxitoxina apresentou resultados satisfatórios, uma vez que os parâmetros analisados para validá-lo estavam em conformidade com os valores aceitos nas normas brasileiras.

Palavras-chave: Cianobactérias. Cianotoxinas. Saxitoxinas. CLAE-FLD. Validação.

ABSTRACT

The intensification of eutrophication in the reservoirs is caused by anthropic actions and it frequently leads to the predominance of cyanobacteria among phytoplankton community. In turn, these cyanobacteria negatively affects the quality of the water for the population supply, and when its cell are lysed, can release toxins (cyanotoxins) causing intoxication. The first *in situ* confirmation of death by poisoning of humans with cyanotoxins in Brazil led the Ministry of Health to quickly publish new ordinance on monitoring of raw water quality, in which are incorporate new indicators, such as the concentration of the cyanobacteria and their toxins in water sources used for drinking water supply. Thus, technologies for water treatment and for the identification and quantification of cyanotoxins have been undergoing an improvement process. Given the context, this study aimed to validate the method of reverse phase liquid chromatography using fluorescence detection and pre-column derivatization for detection and quantification of saxitoxin and decarbamoil-saxitoxin from a *Cylindrospermopsis raciborskii* culture. This validation was performed to give credibility to the analytical method and the selected parameters were selectivity, linearity, limit of detection and quantification, accuracy, precision and robustness. The results showed good selectivity, confirming that the method had the ability to measure the previously mentioned toxins in a matrix Post Extraction, which is comprised of a series of other components besides toxins. The analytical curves were constructed taking into account nine points from the saxitoxin and decarbamoil-saxitoxin patterns. The method presented linearity in the range of 4.5 to 150 mg L⁻¹ for saxitoxin and 3.0 to 132 mg L⁻¹ decarbamoil-saxitoxin, and the correlation coefficient (r) was greater than 0.99 for the two toxins, showing that the method has the capacity to provide results directly proportional to the concentration of detected analyte. The sensitivity was measured by the limit of detection and quantification, obtaining satisfactory results for the research objectives. The method achieved good precision and accuracy, whereas for saxitoxin and decarbamoil-saxitoxin, the different concentration levels were with values within the ranges allowed by Brazilian validation standards, and showed to be robust because it was insensitive to tiny variations, which can occur during analysis. In summary, one can consider that the method used for the detection and quantification of saxitoxin and decarbamoil-saxitoxin showed satisfactory outcomes, since the parameters analyzed to validate it were in accordance with the accepted values in Brazilian standards.

Keywords: Cyanobacterias. Cyanotoxins. Saxitoxins. HPLC-FLD. Validation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Efeito da saxitoxina no sistema nervoso	25
Figura 2 –	Sistema cromatográfico para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27
Figura 3 –	Esquema simplificado da derivatização pré-coluna e pós-coluna	29
Figura 4 –	Peroxidação da saxitoxina (STX)	31
Figura 5 –	Sistema de CLAE com reator pós-coluna para a análise de saxitoxinas	33
Figura 6 –	Comparação das curvas analíticas para determinação da seletividade do método. Figura (a) representa um método seletivo e Figura (b) representa um método não-seletivo	35
Figura 7 –	Fluxograma das atividades desenvolvidas nas etapas experimentais	43
Figura 8 –	Cultivo de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> em diferentes volumes seguindo o esquema de repicagem	44
Figura 9 –	Esquema de repicagem de cianobactérias	44
Figura 10 –	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FLD) utilizado na validação da metodologia para determinação das saxitoxinas	48
Figura 11 –	Curvas analíticas obtidas para STX e dc-STX por padronização externa sem superposição da matriz e padronização externa com superposição da matriz (Extrato T3 pós-extração)	56
Figura 12 –	Cromatogramas obtidos pelo CLAE-FLD das amostras com as toxinas presente (a) no branco da matriz, (b) no padrão externo e (c) na matriz após adição do padrão externo para calcular o valor de exatidão da STX e dc-STX	57
Figura 13 –	Curva de calibração (relação área do pico x concentração) obtida para saxitoxina e dc-saxitoxina	59
Figura 14 –	Cromatogramas obtidos no teste de robustez, sendo (a) análise combinatória com variável C (temperatura da coluna igual a 30 °C) e (b) análise combinatória com variável c (temperatura da coluna igual a 33 °C)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas químicas das toxinas PSP e suas toxicidades relativas	24
Tabela 2 – Comparação dos métodos de derivatização pré e pós-coluna utilizando CLAE-FLD para análise de toxinas PSPs	30
Tabela 3 – Concentrações das toxinas presentes nas Soluções Estoque 1	46
Tabela 4 – Concentração das toxinas presentes na Solução Trabalho MIX	47
Tabela 5 – Reagentes utilizados para as análises	47
Tabela 6 – Condições do CLAE usadas para análise de STX e dc-STX	49
Tabela 7 – Gradiente de eluição	49
Tabela 8 – Concentrações das toxinas para curva de calibração	50
Tabela 9 – Concentrações das toxinas para o método de repetitividade e previsão intermediária	52
Tabela 10 – Concentrações dos padrões das toxinas utilizados para o método exatidão ..	53
Tabela 11 – Parâmetros analíticos selecionados para a análise de robustez e suas respectivas variações	53
Tabela 12 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos analisados	54
Tabela 13 – Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz e por padronização externa com superposição da matriz para a saxitoxina	58
Tabela 14 – Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz e por padronização externa com superposição da matriz para a dc-saxitoxina	58
Tabela 15 – Faixa linear de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação para cada toxina	59
Tabela 16 – Limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_I e LQ_I) a partir do método da relação sinal-ruído e limites de detecção e quantificação do método (LD_M e LQ_M) para cada toxina	60
Tabela 17 – Estudos de LD e LQ para a determinação de STX e dc-STX	61
Tabela 18 – Coeficiente de variação máximo permitido (CV) para os testes de repetitibilidade e precisão intermediária de acordo com a concentração do analito (C) presente na amostra	62

Tabela 19 – Coeficiente de variação máximo permitido (CV) para os testes de precisão intermediária de acordo com a concentração do analito (C) presente na amostra	62
Tabela 20 – Resultados do parâmetro de precisão (repetitividade e precisão intermediária) para análise quantitativa (área do pico) e qualitativa (tempo de retenção) das toxinas STX e dc-STX em três diferentes concentrações ..	63
Tabela 21 – Intervalos permitidos para o teste de exatidão de acordo com a concentração do analito (C) presente na amostra	64
Tabela 22 – Resultados do parâmetro de exatidão para a saxitoxina e dc-saxitoxina em cinco diferentes concentrações	64
Tabela 23 – Valores do critério $s\sqrt{2}$ para STX e dc-STX	65
Tabela 24 – Valores de efeitos obtidos a partir da resposta de detecção (área do pico) e do tempo de retenção	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Communities</i>
CAGECE	Companhia de Água e Esgoto do Ceará
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência
C	Carbono
CE	Comissão Europeia
CEFAS	<i>Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coefficiente de Variação
C18	Cartucho de extração Octadecil
dc	Decarbamoil
DEHA	Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELISA	<i>Enzyme-Linked Sorbent Assay</i>
Eq	Equivalente
FLD	Detector de fluorescência
GTX	Goniautoxina
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
LD	Limite de Detecção
LD _I	Limite de Detecção do Instrumento
LD _M	Limite de Detecção do Método
LPS	Lipopolissacarídeos
LQ	Limite de Quantificação
LQ _I	Limite de Quantificação do Instrumento
LQ _M	Limite de Quantificação do Método
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Espectrometria de massas
Na	Sódio

NaOH	Hidróxido de Sódio
NSSP	<i>National Shellfish Sanitation Program</i>
PSP	<i>Paralytic Shellfish Poison</i>
OSO ₃ ⁻	Sulfato
PE	Pernambuco
pH	Potencial Hidrogeniônico
r	Coefficiente de Correlação
SPE	Extração em fase sólida
STX	Saxitoxina
Tr	Tempo de Retenção
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Cianobactérias a cianotoxinas	20
2.2	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	22
2.3	Saxitoxina e seus análogos	23
2.4	Método de detecção e quantificação da saxitoxina	25
2.4.1	<i>Bioensaio</i>	26
2.4.2	<i>Testes de toxicidade (bio e imunoquímico)</i>	26
2.4.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE</i>	27
2.4.3.1	<i>Método de derivatização pré-coluna</i>	31
2.4.3.2	<i>Método de derivatização pós-coluna</i>	32
2.5	Validação do método analítico	33
2.5.1	<i>Seletividade</i>	34
2.5.2	<i>Linearidade</i>	35
2.5.3	<i>Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)</i>	36
2.5.4	<i>Precisão</i>	37
2.5.5	<i>Exatidão</i>	38
2.5.5.1	<i>Materiais de Referência Certificados (MRC)</i>	39
2.5.5.2	<i>Comparação dos métodos</i>	39
2.5.5.3	<i>Recuperação</i>	40
2.5.5.4	<i>Adição de Padrão</i>	40
2.5.6	<i>Robustez</i>	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Cultivo de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3 e extração do conteúdo intracelular	43
3.2	Método de preparo das amostras (Extrato T3 pós-extração)	45
3.3	Derivatização pré-coluna das toxinas STX e dc-STX	45
3.4	Padrões, Solução Estoque 1, Solução Trabalho MIX e reagentes	46
3.5	Condições cromatográficas	47
3.6	Calibração do método cromatográfico para determinação de STX e dc-STX	50

3.7	Validação do método analítico	50
3.7.1	<i>Seletividade</i>	50
3.7.2	<i>Linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação</i>	51
3.7.3	<i>Precisão e exatidão</i>	52
3.7.4	<i>Robustez</i>	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Validação do método	56
4.1.1	<i>Seletividade</i>	56
4.1.2	<i>Linearidade e faixa linear de trabalho</i>	58
4.1.3	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	60
4.1.4	<i>Precisão</i>	61
4.1.5	<i>Exatidão</i>	63
4.1.6	<i>Robustez</i>	64
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural de primeira necessidade, sendo ela renovável e abundante. Contudo, fatores como o crescimento das cidades e das atividades agrícolas e industriais colocam em risco a disponibilidade das águas de lagos, rios, reservatórios e estuários. O uso intensivo da água nos processos produtivos e a poluição gerada pelas atividades antrópicas, como descarga de esgoto, agricultura, piscicultura e outras atividades na bacia de drenagem, contribui para o aumento da concentração de nutrientes disponíveis nos reservatórios (DI BERNADO; MINILLO; DANTAS, 2010).

O enriquecimento de nutrientes nos mananciais, sobretudo de compostos nitrogenados e fosfatados, tem como decorrência uma mudança nas suas características tróficas, excedendo a capacidade de suporte dos sistemas aquáticos, induzindo estes ao fenômeno de eutrofização (GUIMARÃES, 2012), que significa a passagem de um determinado ambiente aquático do estado oligotrófico, ou seja, baixa produtividade para mesotrófico (média produtividade) ou eutrófico (alta produtividade) (ESTEVES, 1998).

A eutrofização pode trazer prejuízos graves para a qualidade da água, como o aparecimento de algas, déficit de oxigênio, odores desagradáveis e crescimento excessivo de macrófitas (BARROS, 2013). Além disso, ecossistemas ricos em nutrientes, com condições ideais de temperatura e pH, entre outras características, favorecem a floração de algas e cianobactérias, que atuam ocasionando sérias alterações ambientais, como a modificação das suas características organolépticas, aumento da matéria orgânica e liberação de cianotoxinas, devido à lise celular das cianobactérias (ESTEVES, 1998).

As toxinas potentes sintetizadas pelas cianobactérias, conhecidas como cianotoxinas, são um grupo variado de moléculas orgânicas que apresenta diferentes propriedades toxicológicas, tais como efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos (HERMEL, 2010). As intoxicações em humanos podem ocorrer pelo contato com a água contendo células tóxicas, bem como consumo de peixes contaminados e/ou água contaminada de reservatórios de abastecimento público (VIANA, 2006).

No Brasil alguns casos de morte por intoxicação de cianotoxinas já foram detectados, como o caso ocorrido em Caruaru (PE), em 1996, quando pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise (exposição intravenosa), vieram a falecer. Testes realizados na água utilizada na hemodiálise indicaram a presença de

cianotoxinas, dos grupos da microcistina e cilindrospermopsina. Este foi o primeiro caso comprovado de mortes humanas causadas por toxinas de cianobactérias (AZEVEDO, 1996).

Este acontecimento contribuiu para a inclusão das cianotoxinas nos padrões de potabilidade brasileiros. A Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde incorporou as microcistinas na lista de substâncias químicas que representam risco à saúde humana, indicando um valor máximo permissível de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). Posteriormente, a Portaria MS nº 2914/2011 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), substituindo a Portaria nº 518/2004, passou a obrigar também a análise de saxitoxina em água potável, adotando um limite de concentração de $3,0 \mu\text{g}$ equivalente de saxitoxina L^{-1} .

A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* tem um alto potencial de produção de saxitoxinas e, diante dos relatos de que há um aumento de sua floração tóxica em diversas partes do mundo, incluindo os reservatórios de abastecimento público brasileiros, desde a região Nordeste até a região Sul do país, torna-se necessário o seu monitoramento e controle nos sistemas aquáticos (BARROS, 2013; LOPES, 2013; AZEVEDO; BRANDÃO, 2003).

Várias pesquisas para remoção de cianobactérias e suas toxinas têm sido desenvolvidas, principalmente visando manter o padrão de potabilidade da água para abastecimento humano. Entretanto, os métodos de determinação de cianotoxinas em água não estão totalmente consolidados na literatura, sobretudo para os métodos cromatográficos. Bouaïcha *et al.* (1998) estudaram três tipos de métodos utilizados para a detecção e quantificação de toxinas: o método biológico, bioquímico e físico-químico (cromatográfico). Como há uma tendência na comunidade científica de abolir a utilização de mamíferos em teste de toxicidade, o método físico-químico usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) torna-se uma alternativa para substituir o método de bioensaio (método biológico) (LEVIN, 1992).

O método físico-químico mais comumente utilizado é a cromatografia líquida de fase reversa com detecção por fluorescência (CLAE-FLD). Como as saxitoxinas não apresentam absorção de UV específico nem de fluorescência necessárias para sua detecção, é fundamental a conversão oxidativa de saxitoxinas a derivados fluorescentes. As toxinas podem ser derivatizadas em substâncias florescentes antes da separação na coluna cromatográfica – Derivatização pré-coluna (LAWRENCE; NIEDZWIADK, 2001) ou pós-coluna (OSHIMA, 1995).

O método de quantificação da saxitoxinas utilizando CLAE-FLD com derivatização pré-coluna é particularmente atrativo, uma vez que a reação é simples, requerendo apenas periodato diluído ou peróxido de hidrogênio em pH fracamente básico, os reagentes não possuem fluorescência e, portanto, não interferem na detecção dos produtos (LAWRENCE; SCOTT, 1999) e a configuração instrumental é fácil devido à simplicidade.

Entre os métodos descritos na literatura para a determinação de saxitoxinas utilizando CLAE-FLD, há o método aprovado como oficial pela Comissão Europeia para a detecção e quantificação de várias saxitoxinas por derivatização pré-coluna (AOAC, 2006). Entretanto, este método foi validado apenas para extratos de mariscos (CEFAS, 2008), não tendo sido encontrados relatos de validação do método para análise de saxitoxinas por derivatização pré-coluna em amostras de água utilizada para abastecimento público.

O presente trabalho objetivou validar uma metodologia de detecção e quantificação das cianotoxinas saxitoxina (SXT) e decarbamoil-saxitoxina (dc-STX) por CLAE-FLD com derivatização pré-coluna em uma matriz que simulava uma água contendo saxitoxinas após o processo de filtração em estações de tratamento de água para abastecimento público. Esta matriz foi sintetizada a fim de realizar posteriores estudos de adsorção em carbono ativado, simulando um tratamento real para água para abastecimento público.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cianobactérias e cianotoxinas

As cianobactérias são microrganismos procariontes, não possuindo núcleo nem estruturas definidas, assemelhando-se assim estruturalmente e bioquimicamente às bactérias. São microrganismos aeróbios fotoautotróficos, como as células vegetais, que podem ser uni, pluricelulares ou coloniais e possuem apenas reprodução assexuada. Poucas formam filamentos ramificados e raras formam placas ou colônias irregulares (RAVEN; EVERT, 2007). Popularmente são conhecidas como “algas azuis”, pois quando observadas ao microscópio, há uma coloração verde-azulada nas células devido o pigmento ficocianina, responsável pela sua coloração azulada, além de pigmentos necessários para a realização da fotossíntese como a clorofila-a (WHITTON; POTTS, 2000).

As cianobactérias podem apresentar células especiais denominadas heterocistos e acinetos que são utilizadas, respectivamente, na fixação do nitrogênio atmosférico e como esporos de resistência em condições desfavoráveis (SANT’ANNA *et al.*, 2006). Esses organismos têm capacidade de crescimento nos mais diferentes meios, podendo ser encontrados em água doce, salobra ou marinha, solos, rochas, além de habitats extremos, como fontes termais, neve e deserto. Entretanto, os ambientes de água doce são os mais importantes para o crescimento das cianobactérias, visto que a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutro alcalinas com pH entre 6 e 9, temperatura entre 15 °C e 30 °C e com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (AZEVEDO, 1998).

Os fenômenos das florações de cianobactérias estão relacionados a processos de eutrofização dos ecossistemas aquáticos. As cianobactérias ocorrem em todo o mundo e podem ocasionalmente atingir altas densidades populacionais (HUISMAN *et al.*, 2005). Esse processo está relacionado com os vários usos múltiplos das bacias hidrográficas: irrigação, ausência de tratamento de esgotos nas cidades com consequente lançamento de efluentes nos cursos de rios, atividade de pecuária e atividades agrícolas.

Em estações de tratamento de água para abastecimento público, o excesso de cianobactérias tem causado problemas operacionais, trazendo efeitos negativos sobre a eficiência e o custo do tratamento de água (AMORIM, 2007). Porém, a principal preocupação com o excesso desses microrganismos é a produção e liberação de toxinas potentes, causando possíveis danos à saúde humana através do consumo da água e de peixes

contaminados ou pelo contato superficial com água de reservatórios contaminados (VIANA, 2006).

Calijuri, Alves e Santos (2006) classificam as cianotoxinas sob três aspectos. O primeiro é de acordo com a sua origem e forma de dispersão no ambiente, podendo ser endotoxinas (quando as cianotoxinas são liberadas para a água após a morte celular e ao entrarem em senescência) ou exotoxinas (são polipeptídios, com ação tóxica poderosa, secretados em baixas concentrações). O segundo aspecto é conforme a estrutura química das toxinas, dividindo-as em alcaloides, peptídeos cíclicos hepatotóxicos e lipopolissacarídeos (LPS). O terceiro critério adotado é em função da ação farmacológica, sendo as toxinas são classificadas em neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas.

Quanto à classificação em função da ação farmacológica, as hepatotoxinas agem principalmente no fígado, sendo promotores de tumores no fígado mediante exposição crônica, podendo provocar também diarreias e cólicas (FALCONER; HUMPAGE, 1996). As hepatotoxinas compreendem as microcistinas, as nodularinas e a cilindrospermopsina. As microcistinas são as cianotoxinas mais frequentemente encontradas em água e uma contínua exposição mesmo a níveis baixos dessa toxina é um risco à saúde humana, devido a sua ação bioacumulativa e visto que ela pode promover tumores hepáticos. As neurotoxinas atuam especificamente no sistema nervoso e tendem a provocar tontura, adormecimento da boca e extremidades do corpo, fraqueza muscular, náusea, vômitos e taquicardia (APELDOORN *et al.*, 2007), sendo agrupadas em três classes, anatoxina, anatoxina-a(S) e saxitoxina. As dermatotoxinas são toxinas irritantes ao contato com a pele e mucosas, cujos sintomas são vermelhidão e lesões na pele, irritação nos olhos, conjuntivite, obstrução nasal e asma (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Há diversos relatos na literatura de intoxicações por cianotoxinas no mundo. Segundo Stewart, Seawright e Shaw (2008), o primeiro registro sobre a natureza tóxica das cianobactérias foi documentado por George Francis em 1878, que relatou as mortes de animais silvestres a partir da contaminação por cianobactérias em um lago australiano. Em 1996, ocorreu em Caruaru (PE) um caso chamado de “Síndrome de Caruaru”. Este foi primeiro caso relatado no Brasil de intoxicação fatal com cianotoxinas em seres humanos. Através da utilização de uma fonte de água contaminada por microcistina e cilindrospermopsina, 61 pacientes vieram a falecer após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise (AZEVEDO, 1996; JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Este acontecimento contribuiu para a inclusão das cianotoxinas nos padrões de potabilidade brasileiros. Com isso, a Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde obriga a análise de microcistina e saxitoxina em água potável, adotando um limite de concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistina e $3,0 \mu\text{g}$ equivalente de saxitoxina L^{-1} (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.2 *Cylindrospermopsis raciborskii*

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (ordem Nostocales) é um componente importante entre as espécies formadoras de florações, ela é potencialmente tóxica em sistemas aquáticos eutrofizados e vem recebendo atenção da comunidade científica devido ao seu comportamento invasivo em diversos ambientes límnicos do mundo. Pode produzir hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas, trazendo assim riscos à saúde humana (PADISÁK, 1997; SPRÖBER *et al.*, 2003; NEILAN *et al.*, 2003). Esta espécie pode apresentar tricomas retos, sigmóides ou espiralados, sendo que as razões para esta variação ainda não foram claramente definidas (BUCH, 2009).

Primeiramente a *Cylindrospermopsis raciborskii* foi descrita como uma cianobactéria de origem tropical. No entanto, Padisák (1997) relata que esta espécie é amplamente distribuída no globo terrestre. Nos últimos anos a frequência de florações de *C. raciborskii* aumentou nos trópicos. Mais recentemente, a espécie tem sido observada em regiões subtropicais e temperadas (BRANCO; SENNA, 1994; VIDAL; KRUK, 2008).

Mondardo (2009) afirma que seu êxito ecológico é atribuído a diversas variáveis, tais como: a tolerância à salinidade, a resistência à predação, a flexibilidade à baixa luminosidade, a propensão de estocar e utilizar posteriormente o fosfato, a baixa necessidade de nitrogênio, a fixação de nitrogênio, alta afinidade por amônia, ampla tolerância térmica e a habilidade de migração na coluna d'água. Isto aponta a possibilidade de sua rápida propagação em diferentes zonas do planeta devido sua alta capacidade se adequar ao meio ambiente e de apresentar vantagens competitivas (SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000).

A cianobactéria planctônica *C. raciborskii* tem a capacidade de produzir duas toxinas, a cylindrospermopsina (SAKER; NEILAN, 2001) e as saxitoxinas, comumente conhecidas como toxinas paralisante de molusco (PSP) (LAGOS *et al.*, 1999). A

cilindropermopsina é um alcalóide com ação hepática e renal e a PSP é uma potente toxina paralisante que age no sistema neuromuscular (APELDOORN *et al.*, 2007).

Em reservatórios brasileiros um aumento na ocorrência de cianobactérias *Cylindropermopsis raciborskii* tem tornado esta espécie um dos mais importantes componentes das comunidades fitoplanctônicas. Segundo Branco e Senna (1994) a capacidade de fixar carbono inorgânico em altos valores de pH, a habilidade de usar bicarbonato diretamente como fonte de carbono, a capacidade de tolerar altas temperaturas e regime pluviométrico irregular são fatores que favorecem florações em águas brasileiras.

Devido ao intenso impacto da ação antrópica em reservatórios que favorece o aumento na ocorrência de *Cylindropermopsis raciborskii* e conseqüentemente a produção de saxitoxinas, torna-se necessário o seu monitoramento e controle nos sistemas aquáticos. Cepas brasileiras de *C. raciborskii* isoladas de diferentes regiões do país demonstraram produzir saxitoxinas (LAGOS *et al.*, 1999, BERNARD *et al.*, 2003, POMATI *et al.*, 2003). Segundo Barros (2013), através dados da CAGECE (comunicação pessoal, 2012), no estado do Ceará, após análises em teste ELISA, a espécie *C. raciborskii* esteve presente em grande parte dos reservatórios cearenses. Além disso, verificou-se que esta espécie em águas cearenses é predominantemente produtora de saxitoxinas.

2.3 Saxitoxina e seus análogos

As PSP (do inglês, *paralytic shellfish poison*), ou seja, toxinas responsáveis por paralisia ou veneno paralisante de moluscos bivalves, são chamadas de “paralisante” por causar fortes efeitos no sistema nervoso. Podem também ser conhecidas como neurotoxinas, mitilotoxinas ou saxitoxinas (BARBIERI, 2009). Segundo Wiese (2010) são conhecidas cerca de 57 toxinas paralisantes e todas elas têm propriedades químicas semelhantes às da saxitoxina (STX). A toxina mais potente das PSP conhecidas é a STX. Oshima (1995) apresenta a toxicidade dos outros análogos incluídos no grupo expressa em relação à STX e suas estruturas químicas, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Estruturas químicas das toxinas PSP e suas toxicidades relativas

Toxinas cabamato		Toxinas N sulfocarbamoil		toxinas decarbamoil		OH		
R4	Tox. rel.	R4	Tox. rel.	R4	Tox. rel.	R1	R2	R3
STX ^a	1,00	GTX ^b	0,06	dc-STX ^c	0,51	-H	-H	-H
GTX2	0,36	C1	0,01	dc-GTX2	0,15	-H	-H	-OSO ₃ ⁻
GTX3	0,64	C2	0,01	dc-GTX3	0,38	-H	-OSO ₃ ⁻	-H
NEO	0,92	GTX6	0,06	dc-NEO	-	-OH	-H	-H
GTX1	0,99	C3	0,01	dc-GTX1	-	-OH	-H	-OSO ₃ ⁻
GTX4	0,73	C4	0,06	dc-GTX4	-	-OH	-OSO ₃ ⁻	-H
11α-OH-STX	-					-H	-H	-OH
11β-OH-STX	-					-H	-OH	-H

Fonte: adaptado de OSHIMA (1995)

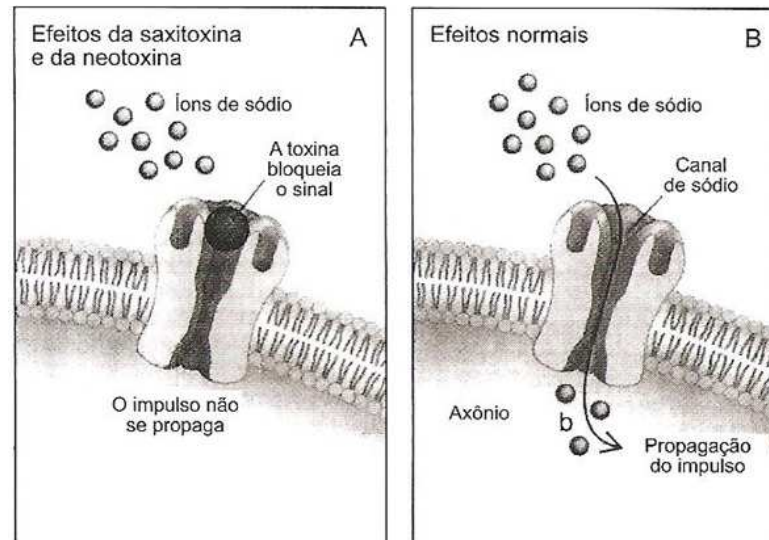
Nota: ^aSTX – Saxitoxina; ^bGTX – Goniautoxinas; ^cdc-STX – Decarbamoilsaxitoxinas

As toxinas paralisantes são representadas por grupos de alcaloides carbamatos que podem ser não sulfatados (saxitoxinas), com um único grupamento sulfatado (G-toxinas) ou com dois grupamentos sulfatados (C-toxinas). Além dessas, há toxinas com denominação iniciada com as letras dc (dcSTX ou dcGTX) que fazem parte do grupo decarbamoil e novas toxinas denominadas de neotoxinas, que têm estrutura química associada com o tipo não sulfatado, e foram isoladas recentemente. (CEBALLOS; AZEVEDO; BENDATE, 2006).

Conforme Barbieri (2009), as PSPs são, em geral, hidrossolúveis e termoestáveis em meio ácido. Entretanto em meio alcalino ou em meio fracamente ácido (pH a partir de 4,5) têm baixa estabilidade e são oxidadas com facilidade.

As saxitoxinas agem no sistema nervoso central, bloqueando os canais de sódio (Na⁺) nas membranas dos axônios nervosos e inibindo a condução nervosa, afetando a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas, impedindo, assim, a comunicação entre o cérebro e as células musculares, conforme a Figura 1 (ANDRINOLO *et al.*, 1999, *apud* CEBALLOS, AZEVEDO; BENDATE, 2006).

Figura 1 – Efeito da saxitoxina no sistema nervoso



Fonte: CARMICHAEL (1994) *apud* CALIJURI, ALVES E SANTOS (2006)

As toxinas paralisantes podem ser identificadas como sintomas de intoxicação quando humanos apresentarem: adormecimento da boca e das extremidades, sensação de queimadura na boca e garganta, vertigem, vômito, sede, fraqueza, perda da coordenação motora, paralisia muscular e respiratória, além de taquicardia (CUNHA, 2004).

2.4 Método de detecção e quantificação da saxitoxina

O método pioneiro para análise de cianotoxina, em água doce e marinha, foi o bioensaio em camundongos no início do século XX (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Na década de 1980, surgiram métodos de detecção mais sofisticados, como ensaios enzimáticos e métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectroscopia de massa. Esses métodos variam quanto ao grau de sofisticação e de informação que eles fornecem (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999). Bouaïcha *et al.* (1998) mencionam três tipos de métodos utilizados para a detecção e quantificação de toxinas:

- a) Método biológico: bioensaio;
- b) Método bioquímico: ELISA (Ensaio do Imuno-adsorvente ligado à enzima), Ensaio de inibição de fosfatase, Ensaio de inibição de acetilcolinesterase;
- c) Método físico-químico: CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), Eletroforese Capilar, Cromatografia Gasosa.

2.4.1 Bioensaio

Os bioensaios são baseados na bioatividade das toxinas, como por exemplo, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, atividade enzimática e interações imunológicas. Este método consiste na injeção intraperitoneal, geralmente em camundongos, de uma amostra contendo cianotoxina obtida a partir da lise de células de cianobactérias. O animal permanece em observação por até sete dias. Depois do período de observação, é realizada uma autópsia no tecido e órgãos do animal. De acordo com os sintomas observados e com os resultados da autópsia, indentifica-se a cianotoxina presente (FREITAS, 2007).

A utilização de camundongos tem sido o teste padrão para avaliação de toxicidade de cianobactérias, no que se refere à saúde pública. Além disso, esse método é econômico e de simples implantação em laboratórios, pois dispensa o uso de equipamentos caros e fornece o resultado em poucas horas (BRANDÃO; SILVA, 2006). Porém, esse método tem a desvantagem de não identificar baixas concentrações e não distinguir entre diferentes análogos de uma mesma toxina (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999), além do fato de que há uma tendência na comunidade científica de abolir a utilização de mamíferos em teste de toxicidade (LEVIN, 1992).

2.4.2 Testes de toxicidade (bio e imunoquímico) – teste ELISA

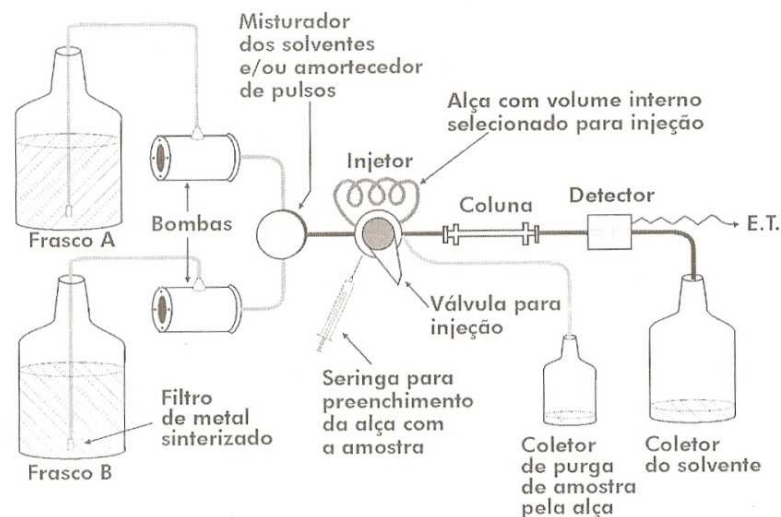
O método bioquímico específicos do teste ELISA (*Enzyme Linked Sorbent Assay*) se baseia numa reação de anticorpos policlonais com a toxina. É uma técnica de detecção imunológica de fácil operação, rápido resultado e de grande sensibilidade (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999). Este teste possibilita a análise de cianotoxinas providas de amostras ambientais naturais ou de cultivos em laboratórios (MINILLO, 2005).

As vantagens do teste ELISA são a alta sensibilidade das reações bioquímicas, pouca necessidade de limpeza da amostra para identificação do analito, baixo custo após padronização, facilidade operacional além de permitir a utilização do kit em campo (HEFLE, 1995). Apresenta, entretanto, algumas limitações como, por exemplo, algumas cianotoxinas não possuem reatividade com os anticorpos usados neste método, não sendo, portanto, detectadas (CARMICHAEL, 1996). Para a saxitoxina, o desenvolvimento de um sistema de imunodiagnóstico teve como objetivo inicial substituir o bioensaio com camundongos no monitoramento de mariscos (CEMBELLA, 1995).

2.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método físico-químico que tem por objetivo a separação dos compostos de interesse em uma mistura, realizada através da distribuição entre duas fases (GOMES, 2009). Segundo Lanças (2009), para a devida separação dos analitos, as fases dividem-se em: fase estacionária, geralmente um sólido com grande área superficial, e fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária. A Figura 2 mostra um sistema de cromatografia líquida.

Figura 2 – Sistema cromatográfico para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



E.T. - Estação de trabalho, microprocessador, integrador / registrador.

Frascos A e B contém solventes

Fonte: Adaptado de Aquino Neto e Nunes (2003)

Segundo Cass e Degani (2001), o método CLAE apresenta como vantagens separação rápida, alta resolução (separa elevado número de componentes com alto grau de pureza), alta exatidão e fácil análise quantitativa, versatilidade, alta sensibilidade, ampla variedade de detectores disponíveis e sistemas automático. Porém, há também suas limitações, como, elevado custo, falta de um detector universal e requer maior experiência do analista.

A detecção de toxinas presentes na água depende de suas propriedades, sendo as mais comuns à detecção por ultravioleta ou por fluorescência. Aquelas que não podem ser identificadas por nenhum desses detectores podem ser derivatizadas, recorrendo-se

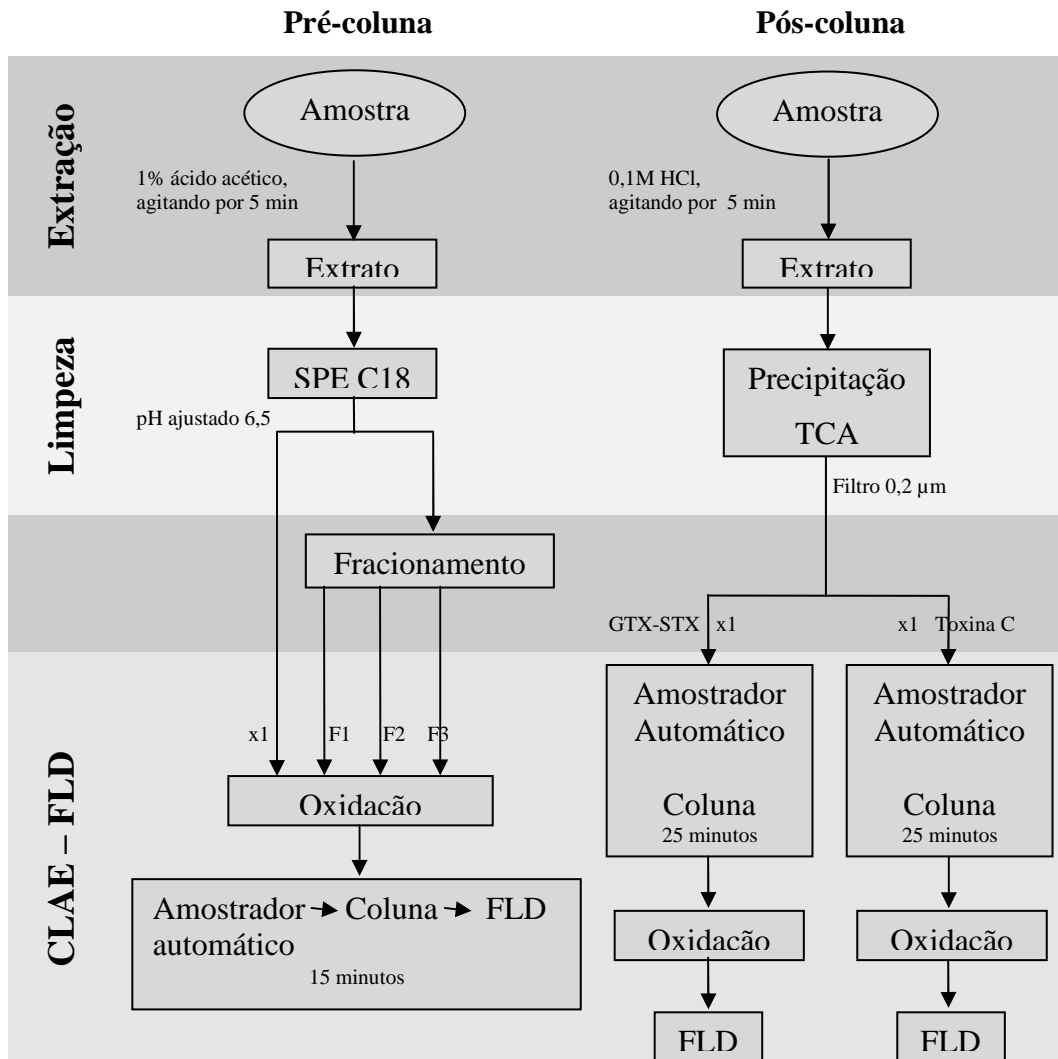
frequentemente ao acoplamento com um reagente fluorescente (VALE, 2006). Inicialmente, o CLAE foi utilizado para analisar saxitoxinas em moluscos. Contudo, tem se mostrado adequado para detecção dessas cianotoxinas em cianobactérias (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999).

No caso das saxitoxinas, o método para análise mais comumente empregado é o da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (OSHIMA, 1995). Como as saxitoxinas não apresentam absorção de UV específico nem de fluorescência necessárias para sua detecção, é fundamental a conversão oxidativa de saxitoxinas a derivados fluorescentes. Os reagentes oxidantes utilizados são peróxido de hidrogênio, terc-butil hidroperóxido e periodato, que atualmente parecem ser os mais adequados para a detecção química da vasta gama de análogos desta toxina. No entanto, deve-se notar que o rendimento de fluorescência varia gradativamente com a ligeira mudança de condições oxidantes tais como das espécies presentes, da concentração do oxidante, do pH, da temperatura e do tempo de reação.

Outra desvantagem deste método é a possibilidade de conversões químicas entre as saxitoxinas, especialmente durante a preparação da amostra. Essas conversões normalmente podem transformar uma variante menos tóxica para uma forma mais tóxica e, portanto, a toxicidade real da amostra original torna-se mais difícil de determinar (HUMPAGE; MAGALHÃES; FROSCIO, 2010).

No método químico de cromatografia líquida de fase reversa com detecção por fluorescência (CLAE-FLD), as toxinas são derivatizadas em substâncias florescentes antes da separação na coluna cromatográfica – Derivatização pré-coluna (LAWRENCE; NIEDZWIADK, 2001), ou pós-coluna (OSHIMA, 1995). Ambos os métodos tem sido avaliados e validados para mariscos em vários laboratórios como uma alternativa para substituir o método de bioensaio. A Figura 3 apresenta, de forma esquemática, os sistemas de derivatização pré-coluna e pós-coluna.

Figura 3 – Esquema simplificado da derivatização pré-coluna e pós-coluna



Fonte: adaptado DEGRASSE *et al.* (2011)

Cada método tem suas vantagens e limitações, conforme apresentado na Tabela 2. O método de derivatização pré-coluna, por exemplo, necessita de um maior tempo para o preparo da amostra, já que a mesma deve ser oxidada antes da injeção no CLAE. O método de derivatização pós-coluna necessita de instrumentos adicionais no cromatógrafo usados para oxidar as toxinas após a separação na coluna cromatográfica, sendo necessários dois gradientes binários, um para a separação da toxina e outro para a sua oxidação, enquanto o método de derivatização pré-coluna necessita apenas de um gradiente binário. (DEGRASSE *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Comparação dos métodos de derivatização pré e pós-coluna utilizando CLAE-FLD para análise de toxinas PSPs

	Derivatização pré-coluna	Derivatização pós-coluna
Requisitos para instrumentação	Necessidade de uma técnica de extração em fase sólida (SPE) utilizando um cartucho de extração C18	Necessita de instrumentos adicionais no cromatógrafo para a oxidação da toxina
Nível de experiência e de formação do operador	Operador qualificado, especialmente para processamento de dados	Operador com conhecimento moderado
Configurações cromatográficas	Fácil de configurar devido à simplicidade do método cromatográfico	Moderada, pois caso necessite de mudanças nos reagentes de oxidação, será necessário reconfigurar o método cromatográfico
Tempo de corrida de uma injeção para análise de toxinas	Aproximadamente 15 minutos	Aproximadamente 25 minutos
Sensibilidade (limite de detecção em extrato de molusco)	Saxitoxina: 2,2 mg Eq STX 100 g ⁻¹ dc-Saxitoxina: 0,40 mg Eq STX 100 g ⁻¹	Saxitoxina: 1,3 mg Eq STX 100 g ⁻¹ dc-Saxitoxina: 0,77 mg Eq STX 100 g ⁻¹
Aplicabilidade	Validação laboratorial para todas as toxinas comercializadas.	Validação laboratorial para todas as toxinas comercializadas, exceto para dc-NEO e GTX6
Interpretação dos dados	Difícil, pois muitas PSPs têm múltiplos produtos de reação da oxidação e algumas até têm os mesmos produtos de reação	Simple
Comparação com bioensaio	Ótima correlação	Boa correlação
Aceitação do método	AOAC*; EC (Off. J. Eur. Commun.)	NSSP**; AOAC* em andamento

Fonte: Modificado de DEGRASSE *et al.* (2011)

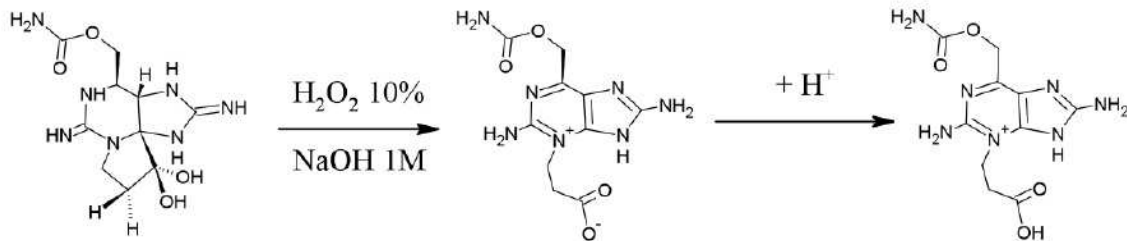
* AOAC: *Association of Official Analytical Communities*

** NSSP: *National Shellfish Sanitation Program*

Para ambos os métodos, oxida-se a ligação C4-C12 de uma molécula com três anéis aromáticos, característica das PSPs, e formam-se anéis aromáticos de purina que produzem uma emissão de fluorescência (QUILLIAM; JANECEK; LAWRENCE, 1993). A

reação de peroxidação da saxitoxina (STX) com os prováveis produtos é apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Peroxidação da saxitoxina (STX)



Fonte: MELEGARI (2010)

2.4.3.1 Método de derivatização pré-coluna

Lawrence e Menard (1991) desenvolveram um método para separar e detectar os compostos fluorescentes formados pela oxidação de saxitoxinas que passou a ser conhecido como “método de oxidação de pré-coluna” ou “método de Lawrence”. Neste método, a reação de oxidação ocorre antes da análise por cromatografia e os produtos oxidados são separados na coluna do CLAE. Posteriormente, um microcomputador ligado ao CLAE coleta e processa os dados recebidos pelo detector de fluorescência (FLD), obtendo assim uma curva (cromatograma), cuja área sob os picos específicos fornece a concentração das saxitoxinas presentes na amostra. As espécies são identificadas pelos tempos de retenção.

O procedimento de oxidação é particularmente atrativo como um meio de derivatização, uma vez que a reação é simples, requerendo apenas periodato diluído ou peróxido a pH fracamente básico. Além disso, os reagentes não possuem fluorescência e, portanto, não interferem na detecção dos produtos (LAWRENCE; SCOTT, 1999).

O regulamento (CE) N° 2074/2005 (Comissão Europeia, 2005), alterado pelo Regulamento (CE) N° 1664/2006 (Comissão Europeia, 2006) especifica que: “O teor de toxinas paralisantes (*Paralytic Shellfish Poison — PSP*) das partes comestíveis dos moluscos (o corpo inteiro ou qualquer parte comestível separadamente) deve ser detectado em conformidade com o método de teste biológico ou com qualquer outro método reconhecido a nível internacional. O denominado método Lawrence também pode ser utilizado como método alternativo para a detecção das referidas toxinas, tal como publicado no método oficial 2005.06 (*Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish*) da AOAC (*Association of*

Official Analytical Communities). Em caso de contestação dos resultados, o método de referência deverá ser o método biológico”.

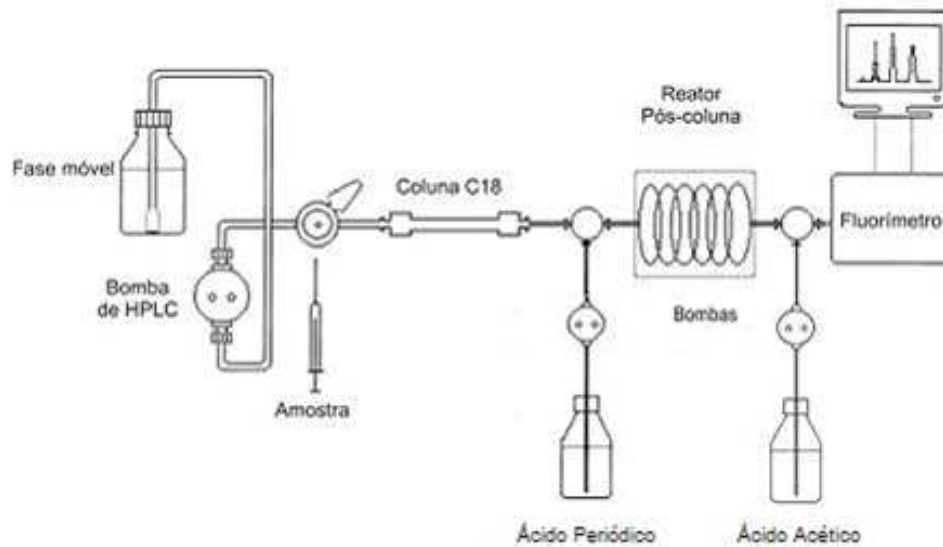
Este regulamento indica que os testes biológicos devem ser substituídos assim que outro método validado internacionalmente esteja disponível. O método 2005.06 da *Association of Official Analytical Communities* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com derivatização pré-coluna e detecção por fluorescência - também conhecido como método de Lawrence, foi validado através de um estudo colaborativo e adotado pela Comissão Europeia como método oficial para a detecção e quantificação de várias de saxitoxinas em mariscos utilizando CLAE-FLD (CEFAS, 2008).

2.4.3.2 Método de derivatização pós-coluna

A ideia de análise contínua das toxinas por pós-coluna de oxidação e subsequente detecção de fluorescência foi proposta pela primeira vez por Buckley, Oshima e Dhimizu (1978) e complementada por Oshima *et al.* (1984), que conseguiu separar as toxinas com permuta iônica (OSHIMA *et al.*, 1989; OSHIMA, 1995). Nos trabalhos realizados, os limites de detecção da derivatização pós-coluna variaram de acordo com a natureza química das toxinas, e eram geralmente de uma ordem de magnitude menor que as obtidas através de ensaios com camundongos, havendo uma forte correlação entre os métodos do bioensaio e derivatização pós-coluna. Através do método de Oshima é possível detectar pelo menos 12 toxinas PSP utilizando três fases móveis diferentes (ASP; LARSEN; AUNE, 2004), sendo ele totalmente automatizado.

A formação de moléculas que apresentam fluorescência ocorre após a amostra passar pela coluna, depois da qual recebe continuamente o agente oxidante durante a passagem pelo tubo de Teflon formando produtos fluorescentes, o que permite a detecção das saxitoxinas no fluorímetro. O reagente acidificante é utilizado para parar a reação antes da detecção no fluorímetro. Um microcomputador acoplado no CLAE recebe as informações obtidas no detector e processa os dados produzindo um cromatograma (AMORIM, 2007).

Figura 5 - Sistema de CLAE com reator pós-coluna para a análise de saxitoxinas



Fonte: Chen e Chou (2002), modificado extraído de Arantes (2004)

2.5 Validação do método analítico

A necessidade de qualificar as medições químicas está sendo cada vez mais exigida e reconhecida. A validação do método analítico envolve um procedimento que comprova que o método oferece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão.

Conforme Lanças (2009), validação é uma ação ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal ou seja, visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão (erro aleatório) ou inexatidão (erro sistemático) de uma resposta apresentada. No contrário, os resultados analíticos não confiáveis podem resultar em decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Portanto, a validação metodológica consiste no desenvolvimento, e posterior controle, de determinada metodologia analítica implantada em um laboratório, parte fundamental de um programa de garantia de qualidade.

Para que ocorra o credenciamento da qualidade assegurada e demonstração de competência técnica, diversos órgãos internacionais e nacionais exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental (RIBANI *et al.*, 2004). Há vários órgãos internacionais que normatizam esta matéria como: ICH (“*International Conference on Harmonization*”), IUPAC (“*International Union of Pure and Applied Chemistry*”), ISO (“*International Organization for Standardization*”), entre outros. No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos: ANVISA

(Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial).

Segundo Inmetro (2010), o processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados.

Do mesmo modo, o responsável pela realização dos estudos deve ser competente na área e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do mesmo (INMETRO, 2010).

No processo de validação, os parâmetros analíticos são escolhidos de acordo com a intenção e o objetivo do uso do método. Normalmente, os principais parâmetros encontrados para validação do método: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, e robustez (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Estes parâmetros são sucintamente descritos a seguir.

2.5.1 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma espécie de interesse em misturas ou matrizes na presença de outros componentes da matriz tais como impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2003).

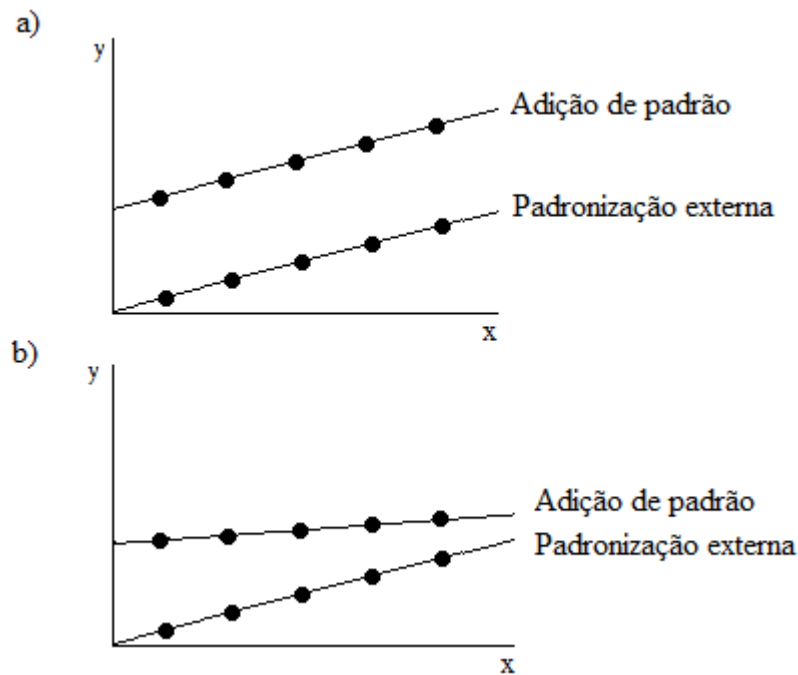
A seletividade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e, caso ela não seja assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2010).

Conforme Ribani *et al.* (2004), a avaliação da seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Para os métodos cromatográficos, por exemplo, compara-se a matriz ausente do analito de interesse e a matriz adicionada com o analito (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum outro componente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra.

Outra maneira de avaliar a seletividade é comparando uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra (método adição de padrão ou padronização externa com superposição da matriz) com uma curva analítica sem a presença da matriz (padronização externa ou padronização externa sem superposição da matriz). Caso elas sejam paralelas, o método será seletivo, ou seja, não há interferência da matriz na determinação do

analito de interesse. O método adição de padrão é aplicado quando não for possível obter a matriz isenta de analito de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). A Figura 6 apresenta o método de avaliação da seletividade através da comparação das curvas analítica (adição de padrão), com e sem superposição da matriz, apresentando um método com curvas paralelas, ou seja, seletivo (a) e outro método com curvas não paralelas, não seletivo (b).

Figura 6 – Comparação das curvas analíticas para determinação da seletividade do método. Figura (a) representa um método seletivo e Figura (b) representa um método não-seletivo



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

2.5.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Na prática, a linearidade é determinada por gráficos de calibração ou curvas de calibração, seguido de um tratamento estatístico (LANÇAS, 2009).

Segundo Leite (2008), para assegurar a qualidade da curva de calibração analítica, algumas regras são necessárias:

- a) Alguns pontos da curva podem ser excluídos, desde que se mantenham cinco pontos. O maior e menor devem permanecer;
- b) Deve-se evitar excluir dois pontos sequenciais;

- c) A curva será iniciada pelo menor valor mensurável ou pelo menor valor de interesse para a quantificação.

Na curva de calibração, a variável independente (eixo horizontal ou x) relaciona-se às concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a dependente (eixo vertical ou y), relaciona-se ao sinal analítico obtido para cada concentração padrão. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é expressa da seguinte maneira (Equação 1):

$$y = ax + b \quad (1)$$

Sendo: y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.), x = concentração, a = inclinação da curva analítica em relação aos eixos (Coeficiente angular) e b = interseção da curva analítica com os eixos (Coeficiente linear).

A regressão normalmente utilizada para análise é a dos mínimos quadrados, sendo a equação da reta obtida através do gráfico. A correlação é calculada por intermédio do coeficiente r de Pearson, ou pelo coeficiente de determinação, r^2 (LANÇAS, 2009).

2.5.3 Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado como um valor exato, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). E o limite de quantificação corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão (LANÇAS, 2009).

Segundo Ribani *et al.* (2004), na prática, para a determinação do LD e do LQ pode-se utilizar três maneiras distintas:

- a) Visual: distingue-se o sinal do ruído pela visualização da menor concentração possível;
- b) Sinal-ruído: Para o LD, o sinal da menor concentração do analito é 3 vezes maior do que o ruído do sistema (N), ou seja, $LD = 3N$ e para o LQ, o sinal da menor concentração do analito é 10 vezes maior do que o ruído do sistema (N), ou seja, $LQ = 10N$;

c) Método baseado em parâmetros da curva analítica: Onde o LD e o LQ podem ser expressos como:

$$LD = 3 \times \frac{s}{S} \quad e \quad LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003).

2.5.4 Precisão

Expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2009). Ou seja, quanto mais próximos estiverem os valores, a amplitude será menor e a precisão será maior.

Conforme o Inmetro (2010), a precisão pode ser usualmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação - CV, usualmente expresso em %, também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$C.V = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (3)$$

Em que DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada.

A precisão pode ser verificada através da repetibilidade (ou repetitividade), da precisão intermediária ou em condições de reprodutibilidade. A seguir apresenta-se um resumo da aplicação de cada um destes testes.

a) Repetibilidade (repetitividade)

- O mesmo método;
- Para a mesma amostra;
- No mesmo laboratório;
- Pelo mesmo operador;
- Usando o mesmo equipamento;
- Em um curto intervalo de tempo.

b) Precisão intermediária

- O mesmo método;
- Para a mesma amostra;
- No mesmo laboratório;
- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Diferentes tempos.

c) Reprodutibilidade

- O mesmo método;
- Para a mesma amostra;
- Em diferentes laboratórios;
- Por diferentes analistas;
- Usando diferentes equipamentos.

2.5.5 Exatidão

Segundo Albano e Rodrigues (2009), exatidão é o grau de concordância entre o resultado de um valor encontrado e um valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita cujo valor é indeterminado por natureza.

Lanças (2009) diz que valores baixos de exatidão são, geralmente, ocasionados por erros sistemáticos que provocam desvios ou tendências nos resultados. Assim, uma exatidão expressa como 105% estaria significando uma tendência positiva de desvio de 5% enquanto que uma exatidão expressa como 95% significa uma tendência negativa de 5%. Erros sistemáticos típicos na exatidão de resultados analíticos provêm de equipamentos não calibrados ou aferidos, interferentes na amostra, baixa recuperação na extração, medidas volumétricas incorretas, seringas contaminadas e etc.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são materiais de referência certificados (MRC), comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.5.1 Materiais de Referência Certificados (MRC)

Os MRC (quando disponíveis) são materiais acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Seu uso é de controle preferido, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. Entretanto, o alto custo do MRC e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso (RIBANI *et al.*, 2004; CHIARADIA, 2009).

O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar os valores da média e da estimativa do desvio padrão obtido pelo laboratório para uma série de replicatas da mesma amostra padrão e comparar com os valores certificados do material de referência, podendo a exatidão do método ser calculada conforme a Equação 4 (MESLEY; POCKLINGTON; WALKER, 1991; PASCHOAL *et al.*, 2008).

$$\text{Exatidão por MRC (\%)} = \frac{\text{Concentração Média Medida}}{\text{Concentração de MRC}} \times 100\% \quad (4)$$

2.5.5.2 Comparação dos métodos

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência (outro método validado) (CHIARADIA, 2009; RIBANI *et al.*, 2004).

Para calcular a exatidão, valia-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado (nesse caso, zero). Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração (menores valores de concentração causam maior dispersão dos dados aumentando o limite de confiança) (SANCHES, 2013).

2.5.5.3 Recuperação

A medição de recuperação ou fator de recuperação R, definida como sendo uma proporção entre a quantidade da substância de interesse presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004). Para Leite (2008), a recuperação é o número obtido da porcentagem de erro ou perda do analito em análise.

As medições de recuperação são as mais comuns devido à dificuldade em se obterem MRC (que, para certas aplicações, nem existem) e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (branco ou placebo), em um determinado número de ensaios, podendo ser determinada pela Equação 5 (SANCHES, 2013).

$$\text{Exatidão por Recuperação (\%)} = \frac{\text{Quantidade quantificada da espécie}}{\text{Quantidade adicionada na espécie}} \times 100\% \quad (5)$$

Segundo Ribani *et al.* (2004), o procedimento de recuperação pode ter uma limitação devido à substância adicionada não se encontrar, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, em avaliações otimistas de recuperação devido à presença de substâncias que proporcionem melhor detecção dos analitos.

2.5.5.4 Adição de Padrão

Para avaliar a exatidão através do método de adição de padrão, quantidades do analito padrão são adicionadas na matriz da amostra em diferentes concentrações (ver item 2.5.1, Figura 6). A matriz sem adição do padrão e a amostras das matrizes com adição do padrão são relacionada com a quantidade adicionada (padrão), de acordo com a Equação 6.

$$\text{Exatidão por Adição de Padrão (\%)} = \frac{V_f - V_b}{V_p} \times 100 \quad (6)$$

Sendo: V_f – Valor do analito presente na matriz após adição do padrão; V_b – valor do analito no branco da matriz; V_p – valor do analito no padrão.

Conforme Ribani *et al.* (2004), o método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse.

2.5.6 Robustez

Lanças (2009) afirma que robustez é uma medida da capacidade de um método de não sofrer alterações devido a pequenas variações das condições experimentais, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. Em cromatografia, as condições experimentais sujeitas a variações podem ser: concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel no CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em cromatografia gasosa (CG), bem como o tempo de extração, agitação, etc.

A robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo se fixar as tolerâncias dos fatores envolvidos no método. Segundo Inmetro (2010), quanto maior for a robustez do método, maior será a confiança em sua precisão.

As alterações realizadas em um método que produzam resultados dentro de limites aceitáveis devem ser incorporadas ao procedimento analítico que é, então, considerado robusto em relação àquele fator.

Inmetro (2010) sugere avaliar a robustez do método através do teste de *Youden*. O teste consiste na análise multivariada de sete parâmetros que podem influenciar no resultado analítico. Este método proporciona avaliar não apenas a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variáveis nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma delas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

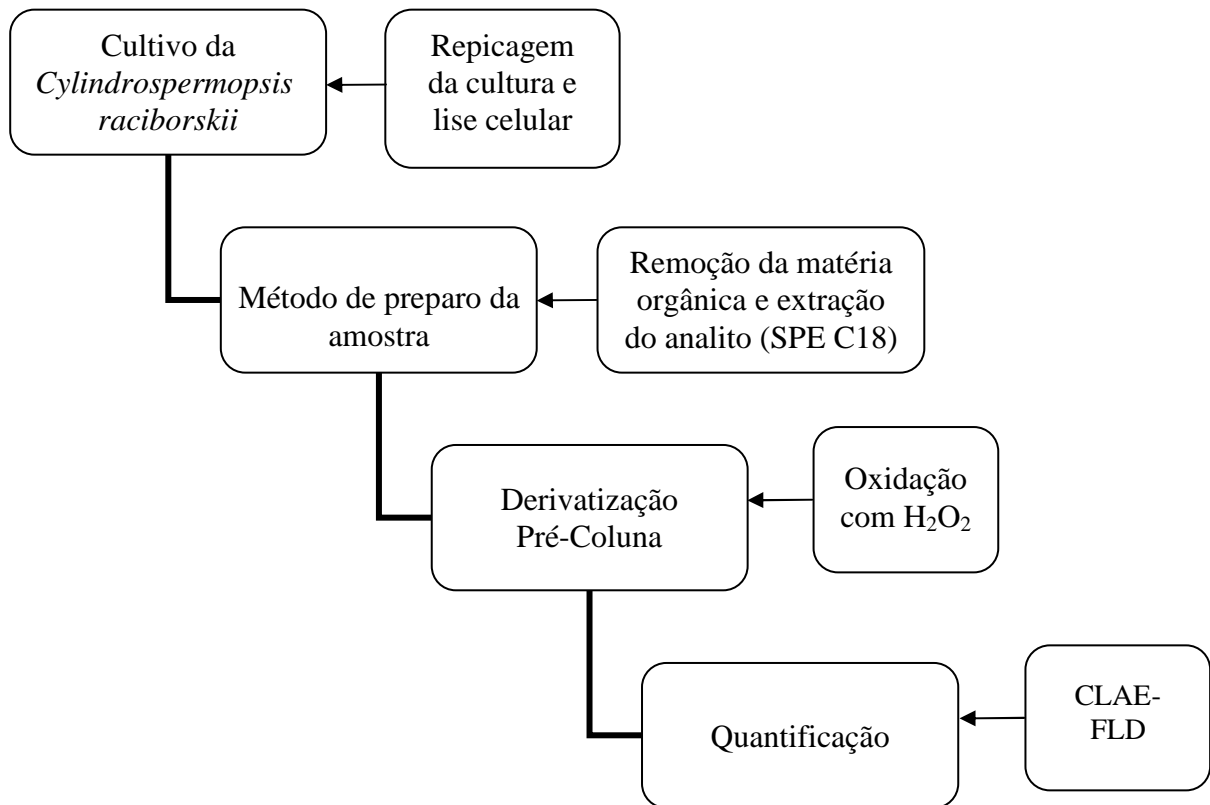
O estudo foi desenvolvido na Seção Laboratorial de Qualidade de Água – SELAQUA do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental do Centro de Tecnologia - DEHA, da Universidade Federal de Ceará - UFC.

Neste estudo, a validação do método de detecção de toxinas foi desenvolvida para as cianotoxinas Saxitoxina (SXT) e Decarbamoil-saxitoxina (dc-STX). A cianobactéria utilizada para a produção destas toxinas foi a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, cepa T3, por elas serem produzidas em abundância por esta espécie (LAGOS *et al.*, 1999). Esta cianobactéria foi isolada no ano de 1996, na represa de Bilings no estado São Paulo e gentilmente cedida pela Dra. Sandra Azevedo, do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O extrato contendo as toxinas supracitadas foi produzido e purificado com objetivo de realizar ensaios de adsorção em carbono ativado, simulando um tratamento real após o processo de filtração em estações de tratamento de água para abastecimento público. Dessa forma, fez-se necessário o desenvolvimento e a validação do método analítico proposto neste trabalho, visando garantir a confiabilidade do projeto de pesquisa financiado pela FINEP (07/2009) intitulado "Tratamento de Água de Abastecimento - Processos de Separação por Membranas ou Carvão Ativado".

O fluxograma de sequência metodológica realizada durante as etapas experimentais é apresentado na Figura 7. E, nos itens que se seguem, é detalhado o desenvolvimento dos experimentos realizados, bem como os equipamentos e materiais utilizados.

Figura 7 – Fluxograma das atividades desenvolvidas nas etapas experimentais



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

3.1 Cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 e extração do conteúdo intracelular

A cepa *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 foi cultivada com objetivo de produzir SXT e dc-SXT. Carneiro *et al.* (2009) afirmam que a cepa T3 pode produzir saxitoxina, neo-saxitoxina e decarbamoil-STX, sendo estas analisadas com um cromatógrafo líquido com detector de fluorescência (CLAE-FLD) acoplada à espectrometria de massas (CL-MS).

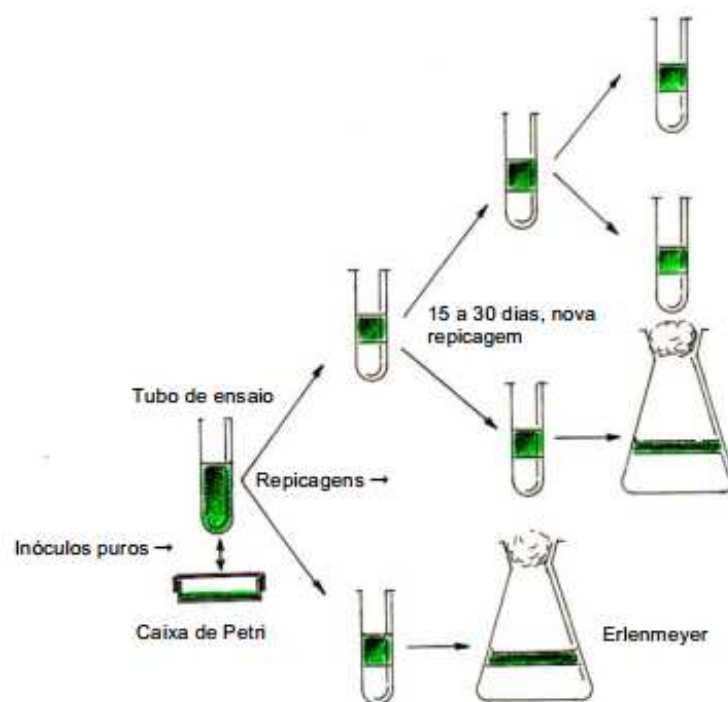
Para o crescimento e acúmulo da biomassa da cepa T3, o cultivo ocorreu em um meio ASM-1 (BARROS, 2013), com pH ajustado para 8, com temperatura de $24\text{ °C} \pm 2$ e luminosidade de aproximadamente $6,75\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para a luz branca de 470 nm. Ao atingir o final da fase exponencial de crescimento, após 15 a 18 dias de cultivo aproximadamente, foram realizados repiques da cultura para volumes maiores. No ultimo repique, a cultura permaneceu em um recipiente de vidro de 2 litros com aeração constante utilizando um compressor de ar. A Figura 8 apresenta os diferentes volumes de culturas da *Cylindrospermopsis raciborskii* seguindo o esquema de repicagem, esse esquema é apresentado na Figura 9.

Figura 8 – Cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* em diferentes volumes seguindo o esquema de repicagem



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Figura 9 – Esquema de repicagem de cianobactérias



Fonte: Ferreira (2009)

Para a concentração da biomassa, após aproximadamente 25 dias do último repique, dois litros da cultura foram homogeneizados e transferidos para tubos de centrífuga de 15 mL. A centrifugação ocorreu durante 10 minutos a 4000 rpm, em seguida descartou-se o sobrenadante e acumulando-se aproximadamente 15 mL da biomassa contida nos fundos

dos tubos, sendo doravante denominada de Extrato T3. Ajustou-se o pH do Extrato T3 para 4 utilizando ácido acético 0,1 N já que, segundo Alfonso *et al.* (1994), a saxitoxina e seus análogos permanecem estáveis em soluções ácidas.

Após a acidificação, o Extrato T3 foi congelado e descongelado por três vezes consecutivas para promover a lise das células, ou seja, o rompimento da membrana celular, e a solubilização das toxinas. O Extrato T3 foi então filtrado por um sistema de filtração a vácuo utilizando um papel filtro (J Prolab, porosidade 14 μm) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. A extração do conteúdo intracelular foi modificada a partir do método desenvolvido por Ravn *et al.* (1995), que trabalhou na extração de toxinas do dinoflagelado *Alexandrium tamarense*.

3.2 Método de preparo das amostras (Extrato T3 pós-extração)

Antes da amostra ser quantificada, aplicou-se um processo de limpeza para remoção da matéria orgânica e extração do analito. Neste processo, primeiramente, todo o Extrato T3 passou novamente por um sistema de filtração a vácuo utilizando um papel filtro (J Prolab, porosidade 14 μm) e, em seguida, por outro sistema de filtração utilizando um microfiltro fibra de vidro (Macherey-Nagel, porosidade 0,7 μm) acoplado a uma seringa.

Posteriormente, aplicou-se a técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizou um cartucho de extração SPE C18 de 3mL (Supelco), previamente condicionado com 6 mL de metanol seguido por 6 mL de água deionizada. Após o condicionamento, 1 mL do Extrato T3 filtrado foi percolado no cartucho através da aspiração utilizando um sistema a vácuo (*Primatec*, modelo 131) com pressão relativa de até -500 mmHg. Após todo o Extrato T3 ter percolado no cartucho, a toxina retida nele foi eluída e coletada utilizando 2 mL de água deionizada, denominando-se essa amostra de Extrato T3 pós-extração.

3.3 Derivatização pré-coluna das toxinas STX e dc-STX

A metodologia empregada para derivatização e quantificação das toxinas STX e dc-STX foi baseada na derivatização pré-coluna desenvolvida por Lawrence e Niedzwiadek (2001), através da qual é realizada a oxidação das toxinas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para a detecção por fluorescência. Conforme esses autores, estas toxinas têm uma melhor resposta de detecção através da oxidação com H_2O_2 .

Em um vial de plástico (1,5 mL) adicionou-se 250 μL de NaOH 1 mol L^{-1} e 25 μL de H_2O_2 aquoso 10% (m/v). Em seguida, 100 μL da solução padrão ou do Extrato T3 pós-extração também foram adicionados. Misturou-se a solução manualmente durante 2 minutos à temperatura ambiente ($24\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$) e, posteriormente, 20 μL de ácido acético concentrado foram adicionados e misturados com a solução reagente. Desta solução, uma alíquota de 20 μL foi analisada por CLAE.

3.4 Padrões, Solução Estoque 1, Solução Trabalho MIX e reagentes

Os padrões STX e dc-STX, foram adquiridos no Institute for Marine Bioscience, National Research Council em Halifax, Canadá, mantidos em solução de ácido clorídrico a 0,003M com um volume de aproximadamente 0,5 mL cada.

Inicialmente, o trabalho incluía a toxina NEO-saxitoxina, análoga da saxitoxina. Porém, no início dos experimentos, este padrão não se manteve estável, transformando-se em STX e dc-STX como observado também por Alfonso *et al.* (1994) que relatam a instabilidade da NEO-STX, podendo se transformar em outras toxinas. Portanto, optou-se por excluí-la do presente estudo.

A partir da diluição dos padrões em aproximadamente 21 vezes, também em ácido clorídrico 0,003M, preparou-se as soluções estoque de cada toxina, denominada de Solução Estoque 1, em balões volumétricos de 10 mL, resultando nas seguintes concentrações:

Tabela 3 – Concentrações das toxinas presentes nas Soluções Estoque 1

Toxina	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
STX	1149
dc-STX	1016

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

A solução Estoque 1 teve como objetivo principal manter a estabilidade das toxinas para que não ocorresse derivatização das mesmas com o passar do tempo. Segundo Cefas (2008), caso essa solução seja mantida no escuro e sob refrigeração (-20°C), ela terá validade de 1 ano.

A partir da solução Estoque 1, em um balão volumétrico (10 mL) foi preparada a Solução Trabalho MIX, ou seja, uma única solução com as duas toxinas presentes, com a

finalidade de permitir as diluições necessárias ao desenvolvimento de trabalho e conferir maior praticidade durante o procedimento de análise. Esta por sua vez, foi diluída com ácido acético 0,1mM, gerando as seguintes concentrações:

Tabela 4 – Concentração das toxinas presentes na Solução Trabalho MIX

Toxina	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
STX	149,37
dc-STX	132,08

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Os reagentes utilizados para limpeza da amostra ambiental no cartucho SPE C18, oxidação das toxinas e método cromatográfico, são discriminados na Tabela 5.

Tabela 5 – Reagentes utilizados para as análises

Reagentes	Marca
Acetonitrila	Merck
Ácido Acético Concentrado	Sigma-Aldrich
Ácido Clorídrico	Cinética Reagentes & Soluções
Ácido Periódico	Vetec Química Fina
Metanol	Vetec Química Fina
Fosfato de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea
Formiato de Amônio	Vetec Química Fina
Hidróxido de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea
Peróxido de Hidrogênio	Vetec Química Fina

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

3.5 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para a quantificação das toxinas também foram baseadas no método desenvolvido por Lawrence e Niedzwiadek (2001) com algumas modificações. Foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo *Agilent Technologies* modelo *1260 Infinity*. A técnica de

cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência utilizada foi empregada na validação do método por apresentar elevada seletividade e sensibilidade (LANÇAS, 2009).

O sistema CLAE utilizado no laboratório SELAQUA consistia de quatro reservatórios para a fase móvel, uma bomba de alimentação da fase móvel (*Agilent Technologies* modelo *1260 Infinity*), um injetor de amostra (*loop* de 20 μL), uma coluna de fase reversa (Phenomenex C18, 150 mm x 4,6 mm d.I; 4 μm de tamanho de partícula.) a qual foi mantida a 30°C, um detector de fluorescência (*Agilent Technologies* modelo *1260 Infinity*) e um microcomputador ligado a todo o sistema para coleta e processamento dos dados (Figura 10).

Figura 10 – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FLD) utilizado na validação da metodologia para determinação das saxitoxinas



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

O volume de amostra injetado foi de 20 μL , o fluxo do eluente foi de 1,5 mL min^{-1} , o detector foi ajustado para os comprimentos de onda de 340 nm em excitação e 390 nm em emissão e o tempo total de cada corrida foi de 15 minutos. As condições usadas para análise de STX e dc-STX, conforme a metodologia descrita por Lawrence e Niedzwiadek (2001) com algumas modificações, estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições do CLAE usadas para análise de STX e dc-STX

Parâmetros	Condições ou descrições
Injetor de amostra	Loop de 20 μ L
Fase Móvel (Bomba gradiente quaternária)	A - Formiato de Amônio 0,1M (pH ajustado a $6 \pm 0,1$ com ácido acético 0,1M) B - Formiato de Amônio 0,05M (pH ajustado a $6 \pm 0,1$ com ácido acético 0,1M) com 5% de acetonitrila
Fluxo	1,5 mL min ⁻¹
Desgaseificador	Presente no sistema CLAE
Coluna	Fase reversa, C18 (Eclipse Plus C18, 5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Temperatura da coluna	30°C
Deteção - Excitação - Emissão	Detector de Fluorescência (FLD) 340 nm 390 nm
Pressão Máxima	400 bar

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

As fases móveis (A e B) usadas na metodologia para quantificação das toxinas constituía de (A) formiato de amônio (0,1M) e (B) formiato de amônio (0,05M) com acetonitrila (5%). O gradiente de eluição, apresentado na Tabela 7, tinha inicialmente 100 % da fase móvel A, mudando nos primeiros 7,5 minutos de 0 a 20 % da fase móvel B, passando posteriormente, nos 3,5 minutos seguintes, de 20 a 80 % da fase móvel B e terminando nos 2 últimos minutos em 100 % da fase móvel A.

Tabela 7 – Gradiente de eluição

Tempo (min)	A - Formiato de Amônio 0,1M (%)	B - Formiato de Amônio 0,05M com 5% de acetonitrila (%)
0	100	0
7,5	80	20
11	20	80
13	100	0

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

3.6 Curva de calibração do método cromatográfico para determinação de STX e dc-STX

Na calibração do método cromatográfico utilizou-se o método de padronização externa. Nove pontos, ou seja, nove soluções MIX foram preparadas a partir de uma única solução de Trabalho MIX utilizando água deionizada como diluente. Para cada solução havia uma concentração conhecida de STX e de dc-STX. A Tabela 8 apresenta as concentrações utilizadas na elaboração da curva de calibração de cada toxina.

Tabela 8 – Concentrações das toxinas para curva de calibração

Toxinas	Concentrações (µg/L)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
STX	4,48	8,96	14,94	22,41	29,87	44,81	74,69	104,56	149,37
dc-STX	3,96	7,92	13,21	19,81	26,42	39,62	66,04	92,46	132,08

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Obteve-se o cromatograma correspondente de cada uma delas e relacionou as áreas das respostas com as concentrações, obtendo-se para cada toxina a equação da reta e o coeficiente de correlação. Cada amostra foi injetada duas vezes para uma mesma curva de calibração sendo esta realizada em triplicata.

3.7 Validação do método analítico

A validação da metodologia foi realizada para a matriz do Extrato T3 pós-extração através dos testes de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

3.7.1 Seletividade

A seletividade foi o primeiro passo na validação do método, pois, segundo Ribani *et al.* (2004) caso a seletividade não fosse assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas.

Para avaliar a seletividade do método, comparou se as curvas analíticas eram paralelas, uma feita através do método de adição de padrão (STX ou dc-STX com

superposição da matriz) e a outra utilizando o método de padronização externa (STX ou dc-STX sem superposição da matriz), ver Figura 6 (Item 2.5.1).

A curva analítica foi construída relacionando a quantidade da toxina adicionada à amostra com a resposta de detecção (área do pico). As curvas analíticas foram obtidas com cinco pontos de concentração. As amostras foram analisadas em triplicata e cada amostra foi injetada duas vezes

Para a curva de adição de padrão foi adicionado em cada amostra quantidades conhecidas de toxinas (STX e dc-STX) a quantidades conhecidas de Extrato T3 pós-extração. Quanto à curva de padronização externa, foram preparadas amostras com as mesmas concentrações das toxinas que foram adicionadas ao Extrato T3 pós-extração e, no gráfico, relacionou-se as áreas obtidas com as concentrações de cada amostra.

Para confirmar a seletividade do método, utilizou-se a distribuição *t de Student* comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas de cada toxina. Este teste avaliou a hipótese de que não existia diferença significativa entre as médias dos coeficientes angulares das curvas (hipótese nula), ou seja, as médias dos coeficientes angulares eram iguais, considerando o nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

3.7.2 Linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade foi avaliada pelos valores dos coeficientes de correlação das curvas de calibração, feitas com 9 concentrações diferentes para cada toxina, variando a STX de 4,5 à 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a dc-STX de 3,0 à 132,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando água deionizada como solvente. Cada amostra foi injetada duas vezes para uma mesma curva analítica sendo esta realizada em triplicata. A análise de correlação linear foi feita utilizando o método dos mínimos quadrados, sendo a equação da reta obtida.

Quanto ao limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram analisadas amostras com baixa concentração do analito, preparadas através do método de padronização externa. O método utilizado para determinar o LD e LQ envolveu a relação sinal-ruído, onde, para o LD, o sinal da menor concentração do analito foi 3 vezes maior do que o ruído (N) do sistema, ou seja, $\text{LD} = 3 \times \text{N}$. Para o LQ, o sinal da menor concentração do analito foi 10 vezes maior do que o ruído (N) do sistema, ou seja, $\text{LQ} = 10 \times \text{N}$.

Levando-se em consideração que as amostras foram diluídas no processo de oxidação (Item 3.2), as áreas dos picos presentes no cromatograma indicavam o limite de detecção e de quantificação do instrumento (LD_I e LQ_I). Os valores de limite de detecção e de quantificação do método (LD_M e LQ_M) foram obtidos após considerar a diluição sofrida pelas amostras.

3.7.3 Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada em condições de repetitividade e precisão intermediária. Os testes foram realizados conforme BRASIL (2003), onde os resultados partiram de nove determinações, com três níveis de concentrações e três repetições para cada nível (Tabela 9). Cada amostra foi injetada duas vezes, sendo posteriormente utilizada sua média. As respostas foram expressas através do coeficiente de variação (CV) e calculadas a partir da Equação (3).

Tabela 9- Concentrações das toxinas para o método de repetitividade e previsão intermediária

Toxinas	Concentrações ($\mu\text{g/L}$)		
	P1	P2	P3
STX	4,48	8,96	13,44
dc-STX	3,96	7,92	11,89

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

No parâmetro de exatidão, foi utilizado o teste por adição de padrão, devido o branco da matriz utilizada (Extrato T3 pós-extração) não ser ausente de STX e dc-STX. As concentrações dos padrões externos utilizadas na adição de padrão variaram em 5 diferentes níveis e o teste foi realizado em triplicata. Para cada nível de concentração calculou-se o percentual de exatidão (%) de acordo com a Equação (5).

As concentrações dos padrões de STX e dc-STX utilizados para o teste de exatidão, Tabela 10, foram definidas de acordo com a concentração da matriz, pois, segundo Ribani *et al.* (2004), em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz.

Tabela 10 – Concentrações dos padrões das toxinas utilizados para o método exatidão

Toxinas	Concentrações ($\mu\text{g/L}$)				
	E1	E2	E3	E4	E5
STX	11,95	17,92	23,90	29,87	35,85
dc-STX	10,57	15,85	21,13	26,42	31,70

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

3.7.4 Robustez

A robustez do método foi analisada através do teste de *Youden* (YOU DEN; STEINER, 1975 *apud* GEHRING *et al.*, 2011), método recomendado pelo Inmetro (2010). Foram escolhidos sete parâmetros analíticos e induzidas pequenas variações nas condições nominais do método. Posteriormente, oito análises foram realizadas com o objetivo de determinar a influência de cada parâmetro no resultado final. A Tabela 11 apresenta os sete parâmetros analíticos utilizados, assim como as variações introduzidas. As condições nominais das variáveis são representadas por letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F e G) e as condições com as variações alternativas são representadas por letras minúsculas (a, b, c, d, e, f e g).

Tabela 11 – Parâmetros analíticos selecionados para a análise de robustez e suas respectivas variações

	Variável	Condições nominais		Condições alternativas	
A/a	Concentração da fase móvel	A	0,10 M	a	0,12 M
B/b	Estabilidade da solução de trabalho	B	Oxidar a amostra após diluição	b	Oxidar a amostra após 30 minutos da diluição
C/c	Temperatura da coluna	C	30°C	c	33°C
D/d	Agitação	D	Manual	d	Vortex
E/e	Tempo de injeção	E	Injetar a amostra após oxidação	e	Injetar a amostra após 15 minutos de ter oxidado
F/f	Tamanho da amostra	F	100 μL	f	110 μL
G/g	Tempo de oxidação	G	2 minutos	g	2:30 minutos

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Os sete parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em oito corridas cromatográficas, realizadas em uma ordem aleatória. A Tabela 12 apresenta a combinação fatorial dos parâmetros do teste de *Youden*. Os resultados das análises são apresentados por letras de s a z. Assim, quando uma combinação 1 foi testada, o resultado da área do pico representa s. Quando a combinação de 2 foi analisada, o resultado obtido foi t, e assim sucessivamente.

Tabela 12 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos analisados

Variável	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração da fase móvel	A	A	A	A	a	a	a	a
Estabilidade da solução de trabalho	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura da coluna	C	c	C	c	C	c	C	c
Agitação	D	D	d	d	d	d	D	D
Tempo de injeção	E	e	E	e	e	E	e	E
Tamanho da amostra	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo de oxidação	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Os resultados das 8 análises realizadas representados por letras de s a z no ensaio de robustez foram utilizados para avaliar o efeito de cada variável (diferença entre a média dos resultados das 4 análises com letra maiúscula e a média dos resultados das 4 análises com letra minúscula), bem como o desvio padrão entre os 8 resultados. Por exemplo, para avaliar o efeito da temperatura da coluna no resultado final da análise, empregou-se a seguinte equação:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4} \quad (7)$$

Se o valor do efeito da variável for maior do que o critério (desvio padrão dos 8 resultados (s) multiplicado pela raiz quadrada de dois - $s\sqrt{2}$), a variável analisada é considerada significativa e, portanto, altera a resposta analítica.

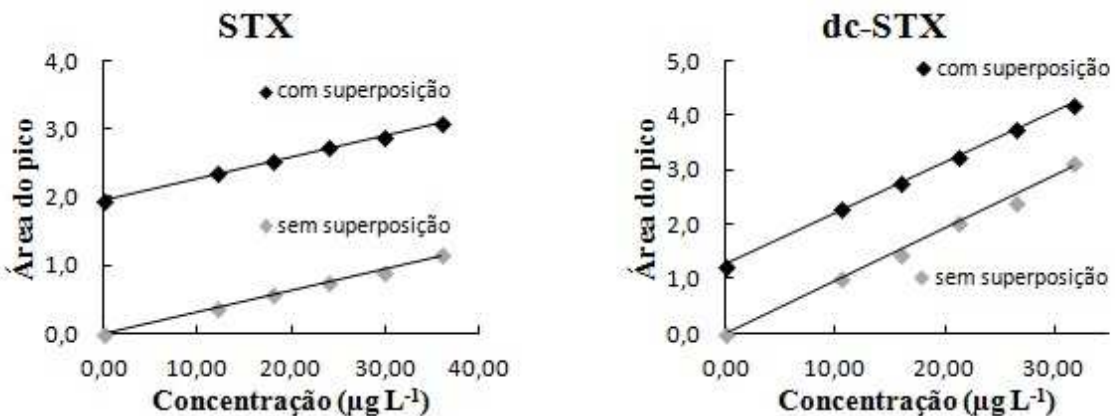
O teste *Youden* foi realizado em triplicada sendo as concentrações das amostras analisadas para STX e dc-STX de 11,95 e 10,57 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Os resultados avaliados em cada combinação foram à área do pico e o tempo de retenção (Tr).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 Seletividade

Conforme a Figura 11, pode-se afirmar que o método desenvolvido para a análise de STX e dc-STX é seletivo, pois as curvas analíticas apresentaram-se paralelas, e, segundo Ribani *et al.* (2004), quando as duas curvas analíticas forem paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz provocada por substâncias co-extraídas na determinação dos analitos.

Figura 11 – Curvas analíticas obtidas para STX e dc-STX por padronização externa sem superposição da matriz e padronização externa com superposição da matriz (Extrato T3 pós-extração)



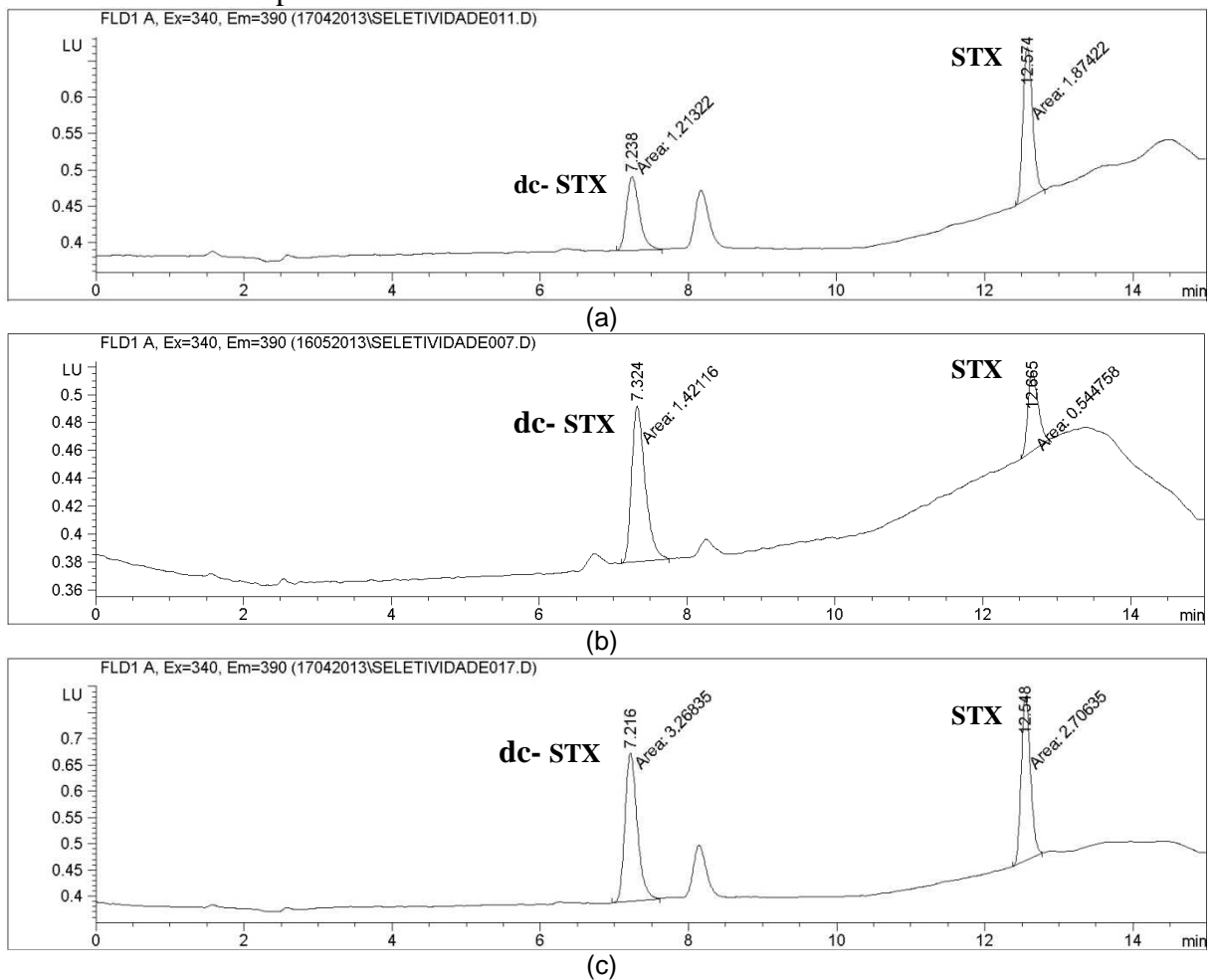
Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Ao comparar os coeficientes angulares das curvas analíticas de cada toxina utilizando a distribuição *t de Student*, conforme apresentados nas Tabelas 13 e 14, confirma-se a seletividade do método, pois, para as duas toxinas, o teste *t* apresentou valor de *p* acima de 0,05, e a hipótese nula foi aceita. Logo, não há diferença entre o coeficiente angular da curva analítica da padronização externa com superposição de matriz e da padronização externa sem superposição de matriz.

A Figura 12 apresenta os cromatogramas obtidos no teste de seletividade que também foram utilizados para calcular o valor de exatidão, neste caso, estão presentes os cromatogramas do 3º nível de concentração (ponto 3) das curvas analíticas com a concentração do padrão de 23,9 µg L⁻¹ de STX e 21,13 µg L⁻¹ de dc-STX, sendo (a) branco da matriz (Extrato T3 pós-extração), (b) padronização externa sem superposição da matriz, ou seja, concentração do analito apenas no padrão e (c) padronização externa com superposição

da matriz (quantidade do analito presente na matriz após adição do padrão). Observa-se nos cromatogramas que os analitos presentes estão bem separados, com tempos de retenção para STX de $12,54 \pm 0,03$ min e para dc-STX de $7,21 \pm 0,04$ min, e que a linha de base não apresentou sinais de interferentes provenientes de possíveis substâncias co-extraídas.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos pelo CLAE-FLD das amostras com as toxinas presente (a) no branco da matriz, (b) no padrão externo e (c) na matriz após adição do padrão externo para calcular o valor de exatidão da STX e dc-STX



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Foi possível também constatar que houve linearidade do método com as concentrações utilizadas no teste de seletividade por adição de padrão. As Tabelas 13 e 14 apresentam, além do teste de hipótese (teste-t), a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). O coeficiente de correlação apresentou valores acima de 0,99 para todas as curvas analíticas, indicando que o método apresenta linearidade de acordo com a norma da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz e por padronização externa com superposição da matriz para a saxitoxina

STX	Eq. da reta	r	Valor P
Sem superposição de matriz	$y = 0,1244x - 0,0023$	0,9985	0,81
Com superposição de matriz	$y = 0,1249x + 1,9543$	0,9984	

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Tabela 14 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz e por padronização externa com superposição da matriz para a dc-saxitoxina

dc-STX	Eq. da reta	R	Valor P
Sem superposição de matriz	$y = 0,3834x - 0,0197$	0,9979	0,17
Com superposição de matriz	$y = 0,3683x + 1,2686$	0,9996	

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

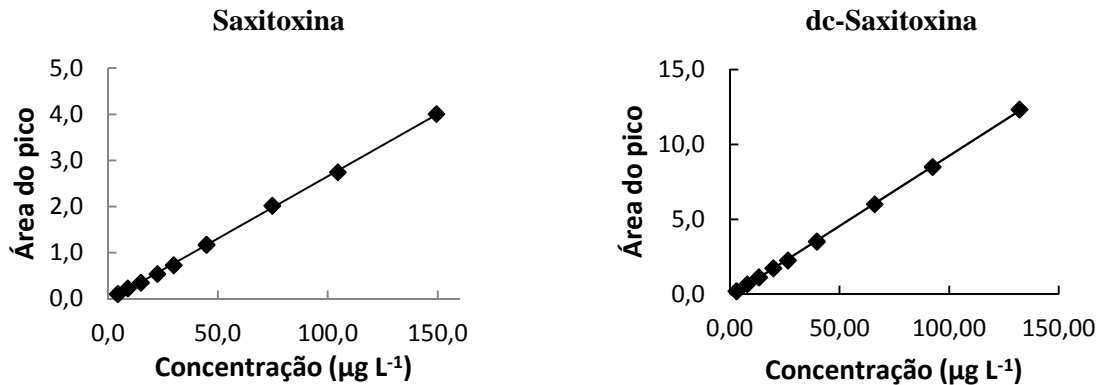
4.1.2 Linearidade e faixa linear de trabalho

Como o teste de seletividade mostrou a ausência do efeito da matriz ou de possíveis interferentes na detecção das toxinas, não houve a necessidade do uso do método de superposição de matriz para quantificação das toxinas. Logo, foi escolhida a padronização externa sem superposição de matriz para fazer os demais testes de validação do método, devido este método ser mais simples do que o método por adição de padrão.

A linearidade foi observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Um coeficiente de correlação (r) maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.* 2004). Brasil (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Inmetro (2003) um valor acima de 0,90 é, usualmente, requerido. As toxinas apresentaram uma ótima capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais às suas concentrações, com coeficiente de correlação de 0,9997 para STX e 0,9999 para dc-STX. A Figura 13 apresenta as curvas de calibração das toxinas estudadas.

Figura 13 – Curva de calibração (relação área do pico x concentração) obtida para saxitoxina e dc-saxitoxina



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Devido à limitada disponibilidade de padrões de toxinas, a faixa de trabalho, ou seja, a faixa de concentração da toxina no qual o método foi aplicado variou para saxitoxina de 4,5 à 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para dc-saxitoxina de 3,0 à 132,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As faixas de trabalho foram consideradas satisfatórias, uma vez que abrangem um intervalo de concentração com folga em relação aos valores encontrados em várias águas naturais no estado do Ceará (CAGECE - Comunicação Pessoal, 2013), e no qual o método pode ser aplicado mantendo uma boa linearidade. A Tabela 15 apresenta a faixa da curva de calibração para cada toxina, a equação da reta e seus respectivos coeficientes de correlação (r).

Tabela 15 - Faixa linear de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação para cada toxina

Toxina	Faixa da curva ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Eq. da reta	r
STX	4,5 à 150	$y = 0,027x - 0,0388$	0,9997
dc-STX	3,0 à 132	$y = 0,0938x - 0,1405$	0,9999

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

4.1.3 Limites de detecção e quantificação

O método apresentou boa sensibilidade com LD_M de $2,53 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ_M de $3,45 \mu\text{g L}^{-1}$ para STX e LD_M de $1,83 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ_M de $2,24 \mu\text{g L}^{-1}$ para dc-STX. Conforme a Tabela 16, o LD_I , LQ_I e LD_M atenderam os limites máximos impostos pela Portaria MS 2914/2011 (BRASIL, 2011). Apenas o LQ_M para a STX apresentou valor um pouco acima do limite máximo exigido pela legislação brasileira ($3,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e, portanto, seria necessário novos testes para aperfeiçoar este parâmetro.

Tabela 16 - Limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_I e LQ_I) a partir do método da relação sinal-ruído e limites de detecção e quantificação do método (LD_M e LQ_M) para cada toxina

Toxinas	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	LD_I	LQ_I	LD_M	LQ_M
STX	0,58	0,76	2,53	3,45
dc-STX	0,46	0,57	1,83	2,24

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Entretanto, quando comparado o presente trabalho com estudos que também avaliaram o limite de detecção e quantificação da STX e dc-STX, porém utilizando diferentes instrumentos, métodos de oxidação ou tipos de matrizes, observa-se que o LD e o LQ obtidos neste trabalho foram inferiores aos obtidos por outros autores (Tabela 17). Concluindo, portanto, que os testes apresentaram resultados satisfatórios para a análise destas toxinas na matriz estudada.

Tabela 17 – Estudos de LD e LQ para a determinação de STX e dc-STX

Referência	Autora (2014)	Freitas (2007)	Cefas (2008)	Halme <i>et al.</i> (2012)
Técnica/Deteção	HPLC-FLD	HPLC-FLD	HPLC-FLD	HILIC-MS/MS
Método de oxidação	Pré-coluna	Pós-coluna	Pré-coluna	*
Tipo de matriz	Extrato T3 pós-extração.	Água deionizada com toxina após lise celular da cepa T3	Extrato de molusco	Matriz de algas
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	STX – 2,53 dc-STX – 1,83	STX – 3 dc-STX – 3	STX – 18 dc-STX – 7	STX – 3 dc-STX - ***
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	STX – 3,45 dc-STX – 2,24	STX – ** dc-STX – **	STX – 40 dc-STX – 10	STX – 11 dc-STX - ***

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

HILIC-MS/MS - Cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplado à um espectrômetro de massa.

* Não necessitou oxidar a amostra devido à utilização de um espectrômetro de massa;

** Não apresentou o dado de LQ;

*** O trabalho analisou apenas STX.

4.1.4 Precisão

Segundo Brasil (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011), conforme a concentração do analito presente na amostra se define o valor máximo permitido do coeficiente de variação (CV) para os testes de precisão. As Tabelas 18 e 19 apresentam para os testes de repetitividade e precisão intermediária, respectivamente, os valores estimados do coeficiente de variação em função da concentração do analito.

Tabela 18 – Coeficiente de variação máximo permitido (CV) para os testes de repetibilidade de acordo com a concentração do analito (C) presente na amostra

Concentração (C)	Coeficiente de Variação (%)
$C < 1 \text{ mg/kg}$	11,7
$1 \text{ mg/kg} \leq C < 10 \text{ mg/kg}$	10,0
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	6,7
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	5,0
$1000 \text{ mg/kg} \leq C < 10000 \text{ mg/kg}$	3,3
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	2,5
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	1,8
$1000 \text{ mg/kg} \leq C < 10000 \text{ mg/kg}$	1,2
$10 \text{ g/kg} \leq C < 100 \text{ g/kg}$	0,9
$100 \text{ g/kg} \leq C < 1000 \text{ g/kg}$	0,7

Fonte: adaptado de Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011)

Tabela 19 – Coeficiente de variação máximo permitido (CV) para os testes de precisão intermediária de acordo com a concentração do analito (C) presente na amostra

Concentração (C)	Coeficiente de Variação (%)
$C < 1 \text{ mg/kg}$	35
$1 \text{ mg/kg} \leq C < 10 \text{ mg/kg}$	30
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	20
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	15
$1000 \text{ mg/kg} \leq C < 10000 \text{ mg/kg}$	10
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	7,3
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	5,3
$1000 \text{ mg/kg} \leq C < 10000 \text{ mg/kg}$	3,7
$10 \text{ g/kg} \leq C < 100 \text{ g/kg}$	2,7
$100 \text{ g/kg} \leq C < 1000 \text{ g/kg}$	2,0

Fonte: Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011)

Observa-se na Tabela 20 que para o teste de repetitividade o CV variou entre 0,40 e 9,66 % para a área do pico (análise quantitativa) e entre 0,02 e 1,65 % para o tempo de retenção (análise qualitativa). Para o teste de precisão intermediária o CV variou entre 0,12 e 2,36 % para a área do pico e entre 0,03 e 2,04 % para o tempo de retenção.

As diluições das amostras foram feitas em água deionizada. Considerando que 1 quilograma da substância referida pelo Ministério da Agricultura tem a mesma densidade da água e que portanto 1 quilograma tem o volume de 1 litro, pode-se considerar que as concentrações das toxinas utilizadas para este teste foram entre 3,96 e 13,44 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ou seja, $C < 1 \text{ mg kg}^{-1}$. Os valores de CV alcançados no método não ultrapassaram os valores máximos permitidos, demonstrando, portanto, que o método é preciso.

Tabela 20 – Resultados do parâmetro de precisão (repetitividade e precisão intermediária) para análise quantitativa (área do pico) e qualitativa (tempo de retenção) das toxinas STX e dc-STX em três diferentes concentrações

Análise	Toxinas	Coeficiente de variação (%)					
		Repetitividade			Precisão intermediária		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3
Área do pico	STX	6,80	3,77	2,19	2,36	0,64	0,12
	dc-STX	9,66	3,97	0,40	2,05	2,31	0,12
Tr	STX	0,03	0,02	1,65	0,03	0,14	1,15
	dc-STX	0,09	0,27	0,19	2,04	0,44	0,42

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

4.1.5 Exatidão

Da mesma forma do teste de precisão, as diluições das amostras no teste de exatidão foram feitas em água deionizada e considerando novamente que 1 quilograma da substância referida pelo Ministério da Agricultura tem a mesma densidade da água e que portanto 1 quilograma tem o volume de 1 litro, pode-se considerar que as concentrações variaram entre 10,57 e 35,55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 5 diferentes níveis de concentrações.

Para cada nível de concentração calculou-se a exatidão (%) (item 1.5.5.2). A faixa de aceitação foi compreendida de acordo com os intervalos especificados na Tabela 21, e definida conforme a concentração do analito presente na amostra (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011).

Tabela 21 – Intervalos permitidos para o teste de exatidão de acordo com a concentração do analito (C) presente na amostra

Concentração (C)	Intervalos (%)
$C < 1 \mu\text{g/kg}$	50 a 120
$1 \mu\text{g/kg} \leq C < 10 \mu\text{g/kg}$	70 a 110
$10 \mu\text{g/kg} \leq C < 100\mu\text{g/kg}$	80 a 110
$100 \mu\text{g/kg} \leq C < 1000 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$1000 \mu\text{g/kg} \leq C < 10000 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$10 \text{mg/kg} \leq C < 100 \text{mg/kg}$	90 a 107
$100 \text{mg/kg} \leq C < 1000 \text{mg/kg}$	95 a 105
$1000 \text{mg/kg} \leq C < 10000 \text{mg/kg}$	97 a 103

Fonte: Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011)

O método alcançou uma boa exatidão, devido à faixa de concentração das toxinas analisadas ($10 \mu\text{g/kg} \leq C < 100\mu\text{g/kg}$) terem apresentado resultados dentro do intervalo permitido, de 80 a 110 %, conforme estabelecido por BRASIL (2003).

Tabela 22 – Resultados do parâmetro de exatidão para a saxitoxina e dc-saxitoxina em cinco diferentes concentrações

Toxinas	Intervalo (%)				
	E1	E2	E3	E4	E5
STX	99,87	107,66	108,44	104,91	99,56
dc-STX	102,74	101,96	98,04	103,73	93,61

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

4.1.6 Robustez

Analisando a área do pico (análise quantitativa), o resultado do critério ($s\sqrt{2}$) para saxitoxina foi igual a 0,0240 e para a dc-saxitoxina foi igual a 0,0695, conforme apresentado na Tabela 23. Observa-se na Tabela 24 que para todas as variáveis nenhum efeito foi maior do que o critério $s\sqrt{2}$, ou seja, nenhum fator testado influenciou significativamente na resposta quantitativa, atestando a robustez do método.

Tabela 23 - Valores do critério $s\sqrt{2}$ para STX e dc-STX

Toxinas	Valores do critério $s\sqrt{2}$ para área do pico	Valores do critério $s\sqrt{2}$ para tempo de retenção
STX	0,0240	0,3145
dc-STX	0,0695	0,3824

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

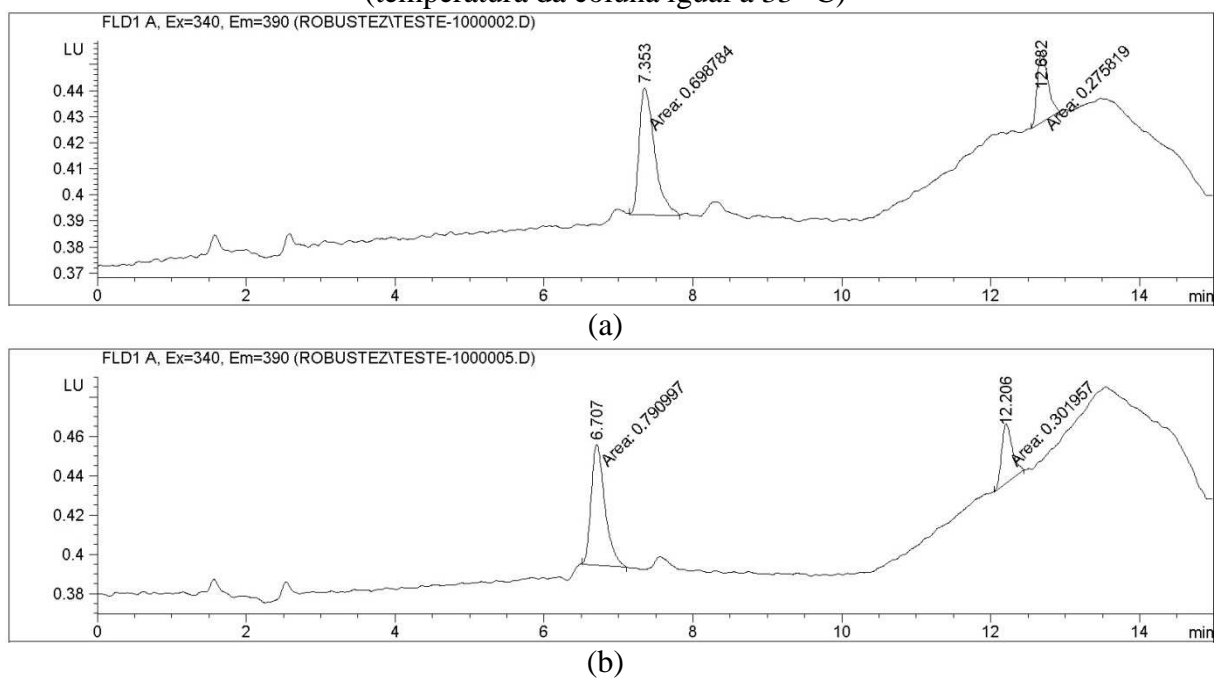
Tabela 24 – Valores de efeitos obtidos a partir da resposta de detecção (área do pico) e do tempo de retenção

Variável	Valores efetivos para área do pico		Valores efetivos para tempo de retenção	
	STX	dc-STX	STX	dc-STX
Concentração da fase móvel	-0,0098	0,0059	-0,0213	-0,0297
Estabilidade da solução de trabalho	-0,0026	0,0406	0,0383	0,0858
Temperatura da coluna	-0,0087	0,0223	0,4135	0,4939
Agitação durante a oxidação	0,0018	0,0417	0,0050	0,0073
Tempo de injeção após oxidação	0,0072	-0,0006	0,0088	0,0458
Tamanho da amostra	-0,0231	-0,0623	0,0075	0,0336
Tempo de oxidação	0,0154	-0,0256	0,0022	0,0207

Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Ao analisar o tempo de retenção (T_r), análise qualitativa, o critério $s\sqrt{2}$ para a STX foi de 0,3145 e para a dc-STX foi de 0,3824. Ao calcular os valores efetivos para cada uma das sete variáveis, todas tiveram resultados menores do que o critério $s\sqrt{2}$, exceto a variável temperatura da coluna (variável C/c), conforme apresentado na Tabela 24. Este resultado pode ser comprovado observando os cromatogramas da Figura 14. Observa-se que para os ensaios com temperatura da coluna de 30 °C (variável C), o T_r para STX foi igual a $12,66 \pm 0,03$ min e para dc-STX foi igual a $7,30 \pm 0,05$ min e para os ensaios com temperatura da coluna de 33 °C (variável c) os cromatogramas apresentaram um valor menor, obtendo um T_r para a STX igual a $12,23 \pm 0,03$ min e para a dc-STX igual a $6,74 \pm 0,04$ min.

Figura 14 – Cromatogramas obtidos no teste de robustez, sendo (a) análise combinatória com variável C (temperatura da coluna igual a 30 °C) e (b) análise combinatória com variável c (temperatura da coluna igual a 33 °C)



Fonte: Elaborada pela autora (2014)

Com isso, conclui-se que para o tempo de retenção, dos sete fatores testados, apenas a temperatura da coluna apresentou uma alteração significativa na resposta de detecção para análise de STX e dc-STX, ou seja, quando há um aumento na temperatura da coluna, o tempo de retenção tende a diminuir.

5 CONCLUSÕES

O método empregado para análise de STX e dc-STX, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e derivatização pré-coluna, além de rápido e prático, quando comparado com o método de derivatização pós-coluna, é confiável, eficiente, exato, preciso e robusto, uma vez que os parâmetros analisados para a validação tiveram resultados em conformidade aos valores aceitos nas normas brasileiras.

Pode-se afirmar que o método é seletivo, uma vez que as curvas analíticas (padronização externa com e sem superposição da matriz) apresentaram-se paralelas, sendo comprovado pelo teste de hipótese *t de Student*, com probabilidade maior que 0,05. Portanto, confirmou-se que não há interferentes eluindo no tempo de retenção das toxinas.

Verificou-se também que o método apresenta uma ótima capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais às suas concentrações, ou seja, apresenta uma excelente linearidade, na faixa de concentração para STX de 4,5 à 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para dc-STX de 3,0 à 132,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, devido os coeficientes de correlação terem sido superiores a 0,999.

Quanto à sensibilidade do método, o LD_I , LQ_I e LD_M apresentaram-se satisfatórios, ou seja, com concentrações menores que os limites máximos permitidos pela legislação (MS Portaria 2914/2011). Apenas o LQ_M para a STX (3,45 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentou valor um pouco acima do limite máximo exigido pela legislação brasileira (3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, portanto seria necessário novos testes para aperfeiçoar este parâmetro.

Os resultados para a análise de exatidão e de precisão foram satisfatórios, visto que para as duas toxinas, os diferentes níveis de concentração estavam com valores dentro do intervalo permitido pela ANVISA.

Para o parâmetro de robustez, o método apresentou-se insensível a pequenas variações possíveis de ocorrer durante a análise. Com exceção da sensibilidade com o aumento da temperatura (+3 °C) para a análise qualitativa do método.

REFERÊNCIAS

ALBANO, F. M.; RODRIGUES, M. T. R. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais – guia prático**. 1 ed. Porto Alegre: Rede metrológica, 2009. 136 p.

ALFONSO A.; LOUZAO M. C; VIEYTES M. R.; BOTANA D L. M. Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples. **Toxicon**, v. 34, n. 12, p. 1593-1598, 1994.

AMORIM, F. F. **Remoção dos contaminantes orgânicos β -estradiol e saxitoxinas (stx, neo-stx e dc-stx) por meio de nanofiltração: avaliação em escala de bancada**. 2007. 133 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Faculdade Tecnológica, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES INTERNATIONAL (AOAC). Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. Pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. First action 2005, official method 2005.06. In: HORWITZ, W., LATIMER, G.W. (Ed.), **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2006. 83 p.

APELDOORN, M. E. V.; EGMOND, H. P. V.; SPEIJERS, G.J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 7-60, 2007.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. E. S. **Cromatografia - princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 188 p.

ARANTES, C. **Uso de filtração lenta para a remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* e saxitoxinas**. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

ASP, T. N.; LARSEN S.; AUNE T. Analysis of PSP toxins in Norwegian mussels by a post-column derivatization HPLC method. **Aunea Toxicon**, v. 43, p. 319–327, 2004.

AZEVEDO, S. M. F. O.; BRANDÃO, C. C. S. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. FUNASA/MS, Brasília, p. 56, 2003.

AZEVEDO S. M. F. O. **Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública**. Medonline, 3 ed., 1998. Disponível em: http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm. Acesso em: 15 jan. 2014.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. In: IV Symposium of Brazilian Society of Toxicology. Recife: **Brazilian Society of Toxicology**, 1996. 83 p.

BARBIERI, E. **O Perigo das Biotoxinas Marinhas**. São Paulo: Instituto de Pesca, 2009. 31 p.

BARROS, M. U. G. **Prospecção de *Cylindrospermopsis raciborskii* em reservatórios n ceará e efeitos da depleção de nutrientes na sua concentração celular.** 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental) – Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA), Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2013.

BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J. F.; BIR, R.; KRYS, S.; FONTAINE, J. J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 176-186, 2003.

BOUAÏCHA, N.; VIA-ORDORIKI, L.; VANDEVELDE, T.; FAUCHON, N.; PUISEUX-DAO, S. Toxic cyanoprokaryotes in resource waters: monitoring of their occurrence and toxin detection. **OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water**, Paris, p. 1-9, 1998.

BRANCO, C. W. C.; SENNA, P. A. C. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir. **Algological Studies**, Brasília, v. 75, p. 85-96, 1994.

BRANDÃO, C. C. S.; SILVA, A. S. Remoção de cianotoxinas por adsorção em carvão ativado. In: PÁDUA, V. L. (ed.). **Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano.** Rio de Janeiro: PROSAB/ABES, p. 415-465, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº. 518/2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.** Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº. 2.914/2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

BUCKLEY, L. J.; OSHIMA, Y.; AND SHIMIZU, Y. Construction of a paralytic shell fish toxin analyzer and its application. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 157-164, 1978.

BUCH, B. **Ecofisiologia de morfotipos reto e espiralado de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) em condições controladas.** 2009. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2009.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: Rima, 2006.

CARMICHAEL, W. W. Toxic Microcystis and the environment. *In*: M. F. WATANABE; K. I. HARADA; W.W. CARMICHAEL; H. FUJIKI (Ed.). **Toxic Microcystis**. Salem: CRC Press, 1996. 11 p.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos para HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.

CARNEIRO, R. L.; SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Jornal of plankton research**, Rio de Janeiro, v.1, n. 1, p. 1-8, 2009.

CEBALLOS, B. S. O.; AZEVEDO, S. M. F. O.; BENDATE, M. M. A. Fundamentos biológicos e ecológicos relacionados as cianobactérias. *In*: Pádua, V.L. (coord.) **Contribuição ao Estudo de Cianobactérias e Microcontaminantes Orgânicos por meio de Técnicas de Tratamento de Água para Consumo Humano**. Rio de Janeiro: PROSAB/ABES, p. 23-79, 2006.

CENTRE FOR ENVIRONMENT, FISHERIES & AQUACULTURE SCIENCE (CEFAS). **Refinement and in-house validation of the AOAC HPLC method (2005.06): the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in mussels by liquid chromatography and fluorescence detection**. Lowestoft, 2008. 81 p.

CEMBELLA A.D. Vitro biochemical methods and mammalian bioassays for phycotoxins. *In*: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D (Ed). **Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides**. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, v. 33, p. 177-211, 1995.

CHIARADIA, M. C. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD**. 2009. 119 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências, área de concentração em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

COMISSÃO EUROPEIA (CE). Regulamento (CE) N° 2074/2005. Estabelece medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Regulamento (CE) N° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e para a organização de controlos oficiais ao abrigo dos Regulamentos (CE) N° 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e N° 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que derroga o Regulamento (CE) N° 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e altera os Regulamentos (CE) N° 853/2004 e (CE) N° 854/2004. **Jornal Oficial da União Europeia**, v. 338, p. 27-59, 2005.

COMISSÃO EUROPEIA (CE). Regulamento (CE) N° 1664/2006. Altera o Regulamento (CE) N° 2074/2005 no que diz respeito a medidas de execução aplicáveis a determinados produtos de origem animal destinados ao consumo humano e que revoga determinadas medidas de execução. **Jornal Oficial da União Europeia**, v. 320, p. 13-45, 2006.

- CUNHA, N.T. **Metodologias para concentração e detecção de toxinas paralisantes em amostras ambientais**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2004.
- DEGRASSE, S. L.; RIET, J. V.; HATFIELD, R.; TURNER, A. Pre versus post-column oxidation liquid chromatography fluorescence detection of paralytic shellfish toxins. **Toxicon**, v. 57, p. 619–624, 2011.
- DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A.D. **Florações de algas e de cianobactérias: Suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento**. São Carlos: Editora LDiBe, 2010. 536 p.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602 p.
- FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R. Tumor promotion by cyanobacterial toxins. **Phycologia**, v. 35, p. 74–79, 1996.
- FREITAS, M. S. **Remoção de microcistina e saxitoxinas por meio de oxidação com hipoclorito de sódio: avaliação em escala de bancada**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2007.
- GEHRING P. A. F.; SANTOS O. M. M.; PEREIRA G. R.; ARAÚJO M. B. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.
- GOMES, S. V. F. **Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer**. 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.
- GUIMARÃES, H. R. C. **Avaliação da remoção de saxitoxina no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido de adsorção em carvão ativado granular (CAG)**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.
- HALME, M.; RAPINOJA, M. L.; KARJALAINEN, M.; VANNINEN, P. J. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. **Chromatography B**, v. 880, p. 50-57, 2012.
- HARADA, K.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In*: CHOROS, I.; BARTRAM, J. (Ed.) **Toxic cyanobacteria in water – A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. Londres: E&FN Spon, p. 369 – 405, 1999.
- HEFLE, S.L. Immunoassay fundamentals. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 102-107, 1995.
- HERMEL, A. V. B. **Análise da lise de células de *Microcystis aeruginosa* e de *Cylindrospermopsis raciborskii* e da liberação e degradação de cianobactérias em função**

do tempo de armazenamento do lodo em decantadores. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2010.

HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. M.; **Harmful cyanobacteria.** Berlin: Springer, 2005, v. 3. 243 p.

HUMPAGE, A. R.; MAGALHÃES, V. F.; FROSCIO, S. M. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1655-1671, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DQO-CGCRE- 008: Orientação sobre validação de métodos analíticos**, Rio de Janeiro: Coordenação Geral de Acreditação, 2010.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; An, J.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, B. C.; MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n.13, p. 873-878, 1998.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.O., OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p.1359-1373, 1999.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE.** Campinas: Átomo, 2009. 382 p.

LAWRENCE, J.F.; MENARD, C. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. **Journal of AOAC International**. v. 74, p. 1006-1012,1991.

LAWRENCE J. F.; SCOTT P. M. HPLC methods for the determination of mycotoxins and Phycotoxins. *In:* BARCELÓ, D. **Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance.** Ottawa: Elsevier Science, p. 432-437, 1999.

LAWRENCE, J. F.; NIEDZWIADK, B. Quantative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish by Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of AOAC International**, v.84, n. 4, p. 1099-1108, 2001.

LEITE, F. **Validação em análise química.** 5 ed., Campinas: Editora Átomo, 2008. 360 p.

LEVIN, R. E. Paralytic Shellfish toxic: Their origin, characteristics and methods of detection: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 405-417, 1992.

LOPES, I. K. C. **Identificação de cianobactérias produtoras de saxitoxinas em reservatórios de usos múltiplos no semiárido.** 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental) – Departamento de

Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA), Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2013.

MESLEY, R. J.; POCKLINGTON, D.; WALKER, R. F. Analytical quality assurance: a review. *Analyst*, v. 116, p. 975-990, 1991.

MINILLO, A. **Análise da distribuição, densidade e toxicidade de florações de cianobactérias e suas toxinas nos reservatórios de médio e baixo tietê (SP) e relação com as características limnológicas do sistema.** 2005. 394 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

MONDARDO, R. I. **Avaliação da filtração em margem como pré-tratamento à filtração direta descendente na remoção de células de cianobactérias e saxitoxinas.** 2009. 290 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MELEGARI, S. P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água.** 2010. 205 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

NEILAN, B. A.; SAKER, M. L.; FASTNER, J.; TÖRÖKNÉ, A.; BURNS, B. P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology*. v. 12, p. 133-140, 2003.

OSHIMA, Y.; MACHIDA, M.; SASAKI, K.; TAMAOKI, Y.; YASUMOTO, T. Liquid chromatographic-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 48, p. 1701-1711, 1984.

OSHIMA, Y.; SUGINO, K.; YASUMOTO, T. Latest advance in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. *In: NATORI, S.; HASHIMOTO, K.; UENO, Y. (Ed.). Mycotoxins and Phycotoxins*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 319-326, 1989.

OSHIMA, Y. Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. *In: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M. E CEMBELLA, A.D. (ed.). Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides*. Paris: United Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), v. 33, p. 81-94, 1995.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynnska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 107, p.563-593, 1997.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

POMATI, F., NEILAN, B.A., SUZUKI, T., MANAROLLA, G., ROSSETTI, C. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the

cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *Journal of Phycology*, v. 39, p. 535-542, 2003.

FERREIRA, P. M. P. **Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos**. Lisboa: Ipimar, 2009. 235 p.

QUILLIAM, M. A.; JANECEK, M.; LAWRENCE, J. F. Characterization of the oxidation-products of paralytic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography mass-spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 7, p. 482–487, 1993.

RAVN, H.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN C.; NIELSEN, P. H.; OSHIMA, Y. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 589-594, 1995.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F. **Biologia vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SAKER, M. L.; NEILAN, B. A. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1839-1845, 2001.

SANCHES, F. A. C. Um fotômetro LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil para análise screening e quantitativa de medicamentos injetáveis de forma não invasiva. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, p. 359-385, 2000.

SANT'ANNA C. L.; AZEVEDO M. T. P.; AGUJARO L. F.; CARVALHO M. C.; CARVALHO L. R.; SOUZA R. C. R. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência; 2006. 58 p.

SPRÖBER P.; SHAFIK H. M.; PRÉSING M.; KOVÁCS A. W.; HERODEK S. Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* under different nitrogen conditions. **Hydrobiologia**, v. 506–509, p. 169-174, 2003.

STEWART, I.; SEAWRIGHT, A. A.; SHAW, G. R. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. *In*: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, v. 619, p. 613-637, 2008.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. P.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VALE, P. Implementação de técnicas de HPLC e LC-MS para estudo de perfis de biotoxinas marinhas em plâncton e em bivalves. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 163-180, 2006.

VIANA, M. **Avaliação de técnicas de tratamento na remoção de saxitoxinas em águas de consumo humano**. 2006. 197 f. Dissertação (Mestrado Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

VIDAL L.; KRUK C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34 53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, p. 142-151, 2008.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1975. 88 p.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2000. 669 p.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P.M.; MIHALI, T.K.; MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2185-2211, 2010.