

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA

RAQUEL DE ALMEIDA KONZEN

**VALIDAÇÃO DE PARÂMETROS DE MÉRITO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
MICROCISTINA-LR POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA ACOPLADO A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

RAQUEL DE ALMEIDA KONZEN

**VALIDAÇÃO DE PARÂMETROS DE MÉRITO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
MICROCISTINA-LR POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA ACOPLADO A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Bacharelado em Química do Departamento de Química e Biologia – DAQBi, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucila Adriani Coral

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz

CURITIBA

2015

**RAQUEL DE ALMEIDA KONZEN**

**VALIDAÇÃO DE PARÂMETROS DE MÉRITO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR MEIO DE  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A  
DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS**

Trabalho de Conclusão de Curso **aprovado** como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1 – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler**

**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Membro 2 – Ms. Bianca do Amaral**

**Universidade Federal do Paraná (UFPR)**

**Orientadora – Profa. Dra. Lucila Adriani Coral**

**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Coorientador – Prof. Dr. Marcus Vinícius de Liz**

**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler**

Curitiba, 03 de dezembro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela proteção e por todas as oportunidades concedidas ao longo dos anos.

Ao meu marido, João Paulo, pelo apoio e paciência nos momentos que estive ausente.

Ao meu pai, Neori, à minha mãe, Isabel, e à minha irmã, Carina, por todo o amor e por todas as lições de vida.

Aos meus orientadores, Lucila Adriani Coral e Marcus Vinicius de Liz, pela paciência, pelo carinho com que me trataram, pelos conhecimentos ministrados e por todo o apoio que me concederam ao longo deste trabalho.

Às meninas do LTPA e do GPTEc pelo apoio e pelos momentos de cumplicidade.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ter dado base ao meu desenvolvimento, e ao desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

KONZEN, Raquel A. Validação de parâmetros de mérito para quantificação de microcistina-LR por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos. 2015. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Cianobactérias são microrganismos que, quando submetidos a determinadas condições ambientais, podem passar a produzir e liberar diferentes metabólitos, dentre eles as cianotoxinas. Uma cianotoxina hepatotóxica de grande importância é a microcistina-LR (MC-LR), de aparecimento comum em florações de cianobactérias do gênero *Microcystis*, principalmente, e com efeitos severos ao organismo humano e de animais se ingerida. A detecção deste metabólito em água é comumente realizada a partir de técnicas cromatográficas, as quais necessitam de etapas prévias de otimização e validação do método escolhido. O objetivo do estudo foi a otimização e validação de um método cromatográfico para a quantificação da microcistina-LR, e também a análise cromatográfica de extratos de cianobactérias contendo a toxina. Devido à baixa sensibilidade da técnica na detecção deste composto, foram realizados ensaios de recuperação deste analito, através da técnica de extração em fase sólida (SPE). As análises foram conduzidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (Agilent - 1260 Infinity). Com base em dados da literatura, o método a ser validado consistiu em uma eluição isocrática utilizando-se como fase móvel (FM) acetonitrila (ACN) com ácido trifluoracético (TFA) 0,05% (Fase A) e água com (TFA) 0,05% (Fase B) e coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). Através da otimização do método, foram definidas como melhores condições de análise o monitoramento em 238 nm, proporção de FM de 60H<sub>2</sub>O:40ACN, com volume de injeção de 20 µL e vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Na validação em água ultrapura, foi estabelecido que o método é linear para a faixa de trabalho testada, com um limite de detecção (LD) de 0,06 mg L<sup>-1</sup> e um limite de quantificação (LQ) de 0,17 mg L<sup>-1</sup>. Uma metodologia para concentração da MC-LR também foi estabelecida, através da técnica de extração em fase sólida utilizando-se cartuchos CHROMABOND<sup>®</sup> C-18 end-capped, sendo que recuperações de 98,51 ± 2,74% foram obtidas. Testes envolvendo extratos obtidos a partir de cultivo de cianobactérias, preparados em estudos anteriores, também foram executados. A condição previamente estabelecida para analisar o padrão em água ultrapura e metanol não se mostrou adequada para quantificar a toxina na matriz do extrato, já que houve co-eluição de interferentes junto à MC-LR. Sendo assim, eluições gradiente foram testadas, sendo estabelecida a condição em que a Fase A variou de 30% a 50% de 0 a 70 minutos como a que melhor separou ambos os picos. O método com eluição gradiente é linear para a faixa de concentrações testada, com um LD de 0,03 mg L<sup>-1</sup> e um LQ de 0,09 mg L<sup>-1</sup>. Um dos extratos, denominado de extrato 2, não apresentou MC-LR, enquanto que os outros dois extratos (1 e 3) demonstraram possuir concentrações de 7,10 mg L<sup>-1</sup> e 0,68 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

**Palavras-chave:** Microcistina-LR. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Validação.

## ABSTRACT

KONZEN, Raquel A. Validation of merit parameters for quantification of microcystin-LR by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector. 2015. 78 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Cyanobacteria are microorganisms that, in certain environmental conditions, can produce and release different metabolites, such as cyanotoxins. One hepatotoxic cyanotoxin of great importance is microcystin-LR (MC-LR) that commonly appears in cyanobacterial blooms, mainly of *Microcystis* genera, with severe effects to the human body and animals if ingested. The detection of this metabolite in water is usually performed using chromatographic techniques, which require previous steps of optimization and validation of the chosen method. The objective of this study was to optimize and validate a chromatographic method for quantification of microcystin-LR, and also analyse a cyanobacterial extract containing the toxin by chromatography. As a consequence of the low sensitivity of the technique in detecting this compound, recovery tests of this analyte using the solid phase extraction (SPE) technique were performed. The analysis were conducted in a high performance liquid chromatograph coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) (Agilent – 1260 Infinity). Based on published data, the chosen method consisted of an isocratic elution using acetonitrile (ACN) with 0,05% of trifluoroacetic acid (TFA) (phase A) and water with 0,05% TFA (phase B) as a mobile phase and a C18 chromatographic column (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). The best conditions of analysis were established, including 238 nm for monitoring, 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN for mobile phase proportion, 20 µL for injection volume, and 1,0 mL min<sup>-1</sup> as flow rate. With the validation in ultra pure water, were established that the method is linear within the working range tested, with a limit of detection (LOD) of 0,06 mg L<sup>-1</sup> and a limit of quantification (LOQ) of 0,17 mg L<sup>-1</sup>. A method for the concentration of microcystin-LR was also established, using the solid phase extraction technique, with CHROMABOND<sup>®</sup> C-18 end-capped cartridges, with recovery of 98,51% ± 2,74%. Tests of extract samples obtained from a cyanobacterial culture, prepared in previous studies, were also performed. The previous established condition to analyse the standard in ultrapure water and methanol was not suitable to quantify the extract matrix toxin, due to co-elution of other compounds with the MC-LR. Therefore, gradient elutions were tested, being established 30:70 ACN:H<sub>2</sub>O until 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O in 70 minutes as the best condition to separate the co-eluting peaks. The gradient elution method was linear for the concentration range tested, with LOD of 0,03 mg L<sup>-1</sup> and LOQ of 0,09 mg L<sup>-1</sup>. One of the extracts, called extract 2, didn't show any sign of MC-LR, while the other two extracts (1 and 3), showed concentrations of 7,10 mg L<sup>-1</sup> and 0,68 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** Microcystin-LR. High performance liquid chromatography. Validation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura geral de uma cianobactéria..... 19
- Figura 2 - Estrutura geral da microcistina, com a indicação de suas quatro principais variantes (A); e estrutura dos aminoácidos leucina e arginina, presentes na microcistina-LR (B). ..... 21
- Figura 3 – Equipamento utilizado em HPLC. (a) reservatório da fase móvel; (b) bomba de alta pressão; (c) válvula de injeção; (d) coluna; (e) detector e (f) sistema para obtenção dos dados ..... 23
- Figura 4 - Cromatogramas obtidos para uma mistura complexa de compostos benzênicos com eluição por gradiente (A) e eluição isocrática (B) ..... 26
- Figura 5 - Sistema cromatográfico utilizado no estudo, constituído de: (A) local para armazenagem na fase móvel; (B) bomba; (C) injetor automático; (D) coluna; (E) detector de arranjo de diodos (DAD); (F) detector de fluorescência; e (G) sistema computacional para comando do equipamento e obtenção dos resultados..... 38
- Figura 6 - Sistema utilizado para os ensaios de extração em fase sólida, constituído de: (A) bomba a vácuo; (B) trap de segurança; (C) funil para disposição da amostra durante o processo de extração; e (D) manifold. .... 41
- Figura 7 - Fluxograma do processo de extração em fase sólida (SPE) ..... 40
- Figura 8 - Sistema de secagem por N<sub>2</sub>, constituído de: (A) cilindros de N<sub>2</sub>; (B) válvulas de controle da pressão e vazão do gás do cilindro; (C) válvulas de ajuste fino de vazão do gás para pontos independentes de amostra; (D) sistema de regulagem da altura das mangueiras; (E) bloco metálico de aquecimento ..... 42
- Figura 9 - (A) Variações de FM testadas com o padrão de 125,0 mg L<sup>-1</sup>; e (B) sinal obtido com o padrão de microcistina-LR na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup> (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 210 nm, 238 nm e 260 nm)..... 44
- Figura 10 - (A) Perfil de absorção da maioria das microcistinas, sendo neste exemplo a microcistina-LR; (B) Perfil de absorção das microcistinas que contém triptofano, no caso, a microcistina-WR; e (C) Perfil de absorção da microcistina-LR obtida no presente trabalho. .... 45
- Figura 11 - Relação entre volume de injeção e área com os volumes de 5 µL a 50 µL (A); ajuste linear entre os primeiros quatro volumes de injeção (R<sup>2</sup> igual a 0,999) (B); e

ajuste linear entre os quatro últimos volumes de injeção ( $R^2$ igual a 0,967) (C); (padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de MC-LR).....	46
Figura 12 - Cromatogramas do padrão de MC-LR de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ nas vazões de 0,8, 1,0 e 1,2 $\text{mL min}^{-1}$ ; FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; $\lambda$ de 238 nm .....	47
Figura 13 - Curva analítica de maiores concentrações ( $R^2$ igual a 0,9998); FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 238 nm .....	48
Figura 14 - Curvas analíticas 1 (A) 2 (B) 3 (C) e curva analítica construída com a média e desvio padrão da triplicata (D) nas concentrações de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0 \text{ mL}$ $\text{min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 238 nm.....	50
Figura 15 - Acréscimo na resposta do equipamento com o aumento da concentração de microcistina-LR injetada no HPLC-DAD; FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 238 nm .....	51
Figura 16 - Erros obtidos para as curvas 1, 2, 3 e curva média.....	52
Figura 17 - (A) Cromatograma da recuperação por SPE da MC-LR testando-se cartuchos SampliQ <sup>®</sup> C-18 (volume de 3 mL, 500 mg de adsorvente) e (B) perfil de absorção do pico cromatográfico, de mesmo tempo de retenção do padrão; FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0 \text{ mL}$ $\text{min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 238 nm.....	54
Figura 18 - Cromatogramas das recuperações por extração em fase sólida da microcistina-LR testando-se cartuchos CHROMABOND <sup>®</sup> C-18 ec (end-capped) e eluição com metanol (A) e com metanol e 0,1% TFA (B); FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 210, 238 e 260 nm .....	55
Figura 19 - Cromatogramas das recuperações por extração em fase sólida da microcistina-LR; FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0$ $\text{mL min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 238 nm .....	56
Figura 20 - Cromatograma do extrato 1 (A), onde dois picos com perfis de absorção similares ao da MC-LR estão indicados por flechas; e cromatograma do extrato 2 (B); FM 40ACN:60H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 $\mu\text{L}$ ; vazão de $1,0 \text{ mL}$ $\text{min}^{-1}$ ; $\lambda$ de 210, 238 e 260 nm .....	58



- Figura 21 - Cromatogramas do extrato 1 sem fortificação (A) e fortificado (50% extrato 1 e 50% padrão de MC-LR  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) (B); FM 5% ACN:95% $\text{H}_2\text{O}$  até 60% ACN:40% $\text{H}_2\text{O}$  em 60 minutos; volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 210, 238 e 260 nm ..... 59
- Figura 22 - Cromatogramas do extrato 2 sem fortificação (A) e fortificado (50% extrato 2 e 50% padrão de MC-LR  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (B); FM 5% ACN:95% $\text{H}_2\text{O}$  até 60% ACN:40%  $\text{H}_2\text{O}$  em 60 minutos; volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 210, 238 e 260 nm..... 59
- Figura 23 - Eluições gradiente testadas, demonstrando o tempo de variação da condição, em minutos, pela porcentagem de ACN utilizada (Y), onde a respectiva proporção de  $\text{H}_2\text{O}$  na fase móvel é dada por  $(100-Y)$  ..... 61
- Figura 24 - Cromatogramas do extrato 1 com a eluição gradiente 9 (30:70 a 50:50 ACN: $\text{H}_2\text{O}$  em 70 minutos) (A), gradiente 10 (10:90 a 50:50 ACN: $\text{H}_2\text{O}$  em 70 minutos) (B), gradiente 11 (10:90 a 50:50 ACN: $\text{H}_2\text{O}$  em 90 minutos) (C) e gradiente 12 (10:90 a 40:60 ACN: $\text{H}_2\text{O}$  em 70 minutos) (D); volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 238 nm ..... 61
- Figura 25 - Cromatograma do extrato 1 com a eluição gradiente 9, indicando a diferença entre a linha base e o ponto de mínimo entre os dois picos cromatográficos; volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 238 nm ..... 62
- Figura 26 - Cromatogramas em 238 nm, de um extrato de água contendo cianobactérias (A) e padrões, respectivamente, de MC-RR, nodularina, YR, LR, LW e LF (B) ..... 64
- Figura 27 - Curva de calibração utilizando-se o gradiente 9, nas concentrações de  $1,0$  a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  com variação de  $1,0$  em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $R^2$  de 0,9942); volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 238 nm ..... 64
- Figura 28 - Curvas analíticas 1 (A) 2 (B) 3 (C) e curva analítica construída com a média e desvio padrão da triplicata (D) nas concentrações de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; gradiente 9 (30:70 até 50:50 ACN: $\text{H}_2\text{O}$  em 70 minutos); volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 238 nm ..... 65
- Figura 29 - Erros obtidos para as curvas 1, 2, 3 e curva média para os testes com a eluição gradiente 9.. ..... 67
- Figura 30 - Cromatogramas do extrato 3 (A) e extrato 3 fortificado com padrão de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (B) utilizando condição gradiente 9 (30:70 até 50:50 ACN: $\text{H}_2\text{O}$  em 70 minutos); volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 210, 238 e 260 nm .... 68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Eluição gradiente utilizado nas análises de HPLC-DAD.....	37
Tabela 2 - Equações obtidas com o ajuste linear para cada curva analítica construída, com seus respectivos coeficientes de correlação linear e sensibilidades.....	49
Tabela 3 - Valores de área obtidos para as curvas analíticas entre 0,1 mg L <sup>-1</sup> e 1,0 mg L <sup>-1</sup> , média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) obtidos para cada concentração. ....	50
Tabela 4 - Erro calculado para as curvas 1, 2, 3 e a curva média.....	51
Tabela 5 - Concentrações do teste com solução de MC-LR realizado em triplicata, obtidas através dos ensaios por SPE com cartuchos SampliQ <sup>®</sup> C-18 (volume de 3 mL, 500 mg de adsorvente), Agilent.....	54
Tabela 6 - Concentrações e respectivas recuperações da MC-LR nos testes com cartuchos CHROMABOND <sup>®</sup> C-18 ec (end-capped).....	56
Tabela 7 - Eluições gradiente testadas para análise do extrato 1 e os respectivos tempos de retenção obtidos para a MC-LR.....	60
Tabela 8 - Equações obtidas com o ajuste linear para cada curva analítica construída, com seus respectivos coeficientes de correlação linear e sensibilidades.....	65
Tabela 9 - Valores de área obtidos para as curvas analíticas entre 0,1 mg L <sup>-1</sup> e 1,0 mg L <sup>-1</sup> , média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) obtidos para cada concentração, com a eluição gradiente 9. ....	66
Tabela 10 - Erros calculados para as curvas 1, 2, 3 e a curva média para os testes com a eluição gradiente 9.....	66
Tabela 11 – Concentrações obtidas para cada extrato e respectivas equações lineares utilizadas. ....	68

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características da microcistina-LR .....	21
Quadro 2 - Condições cromatográficas para a análise de microcistinas por HPLC-DAD .....	29

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-FL - Cromatografia Líquida em Fase Ligada

CLAE-FN - Cromatografia Líquida em Fase Normal

CLAE-FR - Cromatografia Líquida em Fase Reversa

CG - Cromatografia Gasosa

CLS - Cromatografia Líquido-Sólido

CLL - Cromatografia Líquido-Líquido

CV - Coeficiente de Variação

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

DPR - Desvio Padrão Relativo

EFS – Extração em Fase Sólida

EM – Espectrômetro de Massa

FDA – Food and Drug Administration

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MC – Microcistina

MRC – Material de Referência Certificado

ODS – Octadecilsilano

pH - Potencial Hidrogeniônico

PSP – Paralytic Shellfish Poisoning

SPE – Solid Phase Extraction

TFA - Ácido Trifluoracético

UV - Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS .....	18
3.2 MICROCISTINAS .....	20
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	22
<b>3.3.1 Conceitos Gerais</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.2 Aplicação de HPLC para Detecção e Quantificação de Microcistina</b> .....	<b>27</b>
3.4 VALIDAÇÃO.....	30
<b>3.4.1 Seletividade</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.2 Linearidade e Faixa de Aplicação</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.3 Precisão</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.4 Exatidão</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.5 Limite de Detecção</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.6 Limite de Quantificação</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.7 Robustez</b> .....	<b>36</b>
<b>4 MÉTODO DE PESQUISA</b> .....	<b>37</b>
4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	38
4.2 VALIDAÇÃO.....	39
4.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	40
<b>4.4 ENSAIOS COM EXTRATO DE MICROCISTINA-LR</b> .....	<b>42</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>43</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	43
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	47
5.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	53
5.4 ENSAIOS COM EXTRATO DE MICROCISTINA-LR.....	57
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas ou algas azuis, são microrganismos procarióticos e autotróficos encontrados nos mais diversos *habitats*, como fontes termais com pH superior a 5 e temperaturas de 85 °C, oceanos da Antártida, e até mesmo no solo sob as rochas. Porém, o ecossistema mais apropriado para o desenvolvimento de cianobactérias é o de água doce, já que a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutroalcalinas com pH de 6 a 9, temperaturas entre 15 e 30 °C e com elevada concentração de nutrientes (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Algumas espécies de cianobactérias têm a capacidade de produzir toxinas, denominadas cianotoxinas. As razões para essa produção ainda não são bem entendidas, mas uma hipótese é de que estas toxinas desempenham função protetora contra espécies zooplancônicas, seus predadores primários (ANCIUTTI; COCHÔA, 2010). Outra hipótese sugere que a produção de toxinas está relacionada às condições de crescimento ou à competição por recursos (nutrientes). A eutrofização dos sistemas aquáticos, devido ao despejo de esgotos sem tratamento ou tratados de forma precária, ricos em fósforo e nitrogênio, tem favorecido o aparecimento de espécies produtoras de cianotoxinas, gerando perigo potencial para a saúde da população (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Um caso de intoxicação que trouxe fortes evidências da presença de cianotoxinas ocorreu em Itaparica-BA. Em 1988, 2000 pessoas foram acometidas de gastroenterite após a ingestão de água proveniente do reservatório da cidade e, destas, 88 morreram (TEIXEIRA *et al.*, 1993; ARAGÃO *et al.*, 2007; FONSECA, 2014). No entanto, o primeiro caso comprovado de intoxicação por cianotoxinas ocorreu em Caruaru, cidade que fica a aproximadamente duas horas de Recife, capital de Pernambuco (FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKI-SUZUKI; AZEVEDO, 2002; LEAL; SOARES, 2004). Em fevereiro de 1996, 116 dos 131 pacientes que eram submetidos a um tratamento rotineiro de hemodiálise começaram a manifestar sintomas como dores de cabeça, visão embaçada, náusea e vômito. Sete dias após os primeiros sintomas, um paciente morreu. Outros 100 desenvolveram insuficiência hepática aguda e, destes, 76 faleceram. Em dezembro de 1996, 52 das mortes puderam ser atribuídas à intoxicação por cianotoxinas (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005; MENDONÇA, 2006). Carmichael *et al.* (2001) identificaram dois grupos de cianotoxinas (microcistinas e cilindrospermopsinas) como as responsáveis pelo ocorrido, através do exame do fitoplâncton proveniente da fonte de água que abastecia a região, análises

da água proveniente do sistema de tratamento de água da clínica, além de tecido hepático dos pacientes. A maior contribuição para a morte destes pacientes de hemodiálise foi a exposição por via intravenosa à microcistina, especificamente as variantes microcistina -YR, -LR e -AR (AZEVEDO *et al.*, 2002; BRANDÃO, 2008).

O Ministério da Saúde, através da portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011 (atualização da portaria nº 518, de 25 de março de 2004), estabelece o valor máximo de concentração de microcistinas permitido em águas de abastecimento público em  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (em termos de equivalente de microcistina) (SANCHES *et al.*, 2007; GUERRA, 2012).

Uma técnica muito utilizada para quantificar microcistinas em matrizes aquosas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), empregando detector de arranjo de diodos (DAD) ou espectrometria de massas (EM) (NASCIMENTO, 2011; SANCHES *et al.*, 2012). Entretanto, segundo Pyo *et al.* (2005), o limite de detecção da técnica de HPLC-DAD para quantificação de microcistinas é de aproximadamente  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , exigindo uma etapa prévia de concentração. Cartuchos de fase reversa C18 podem ser utilizados, sendo aconselhável realizar uma validação da metodologia escolhida através dos parâmetros exatidão e precisão. Além disso, para garantir confiabilidade aos resultados obtidos por meio da técnica de HPLC-DAD e extração em fase sólida (SPE), é de fundamental importância determinar alguns parâmetros de mérito como seletividade, linearidade, limite de quantificação e limite de detecção (VICENTE, 2011; CASSINI; ANTUNES; KELLER, 2013; FLORES; ZARZA; GARCÍA, 2013).

Mediante o aumento nas ocorrências de floração de cianobactérias e a presença de cianotoxinas, em especial microcistinas no ambiente aquático, assim como na água após tratamento, torna-se evidente a necessidade e importância de estudos que envolvam, desde o tratamento de águas com a presença desses organismos e metabólitos, até o estabelecimento de métodos que possam analisá-los e quantificá-los adequadamente. Métodos estabelecidos de quantificação e concentração da toxina por HPLC-DAD e SPE, respectivamente, são ferramentas úteis e que dão suporte a caracterização da qualidade da água. Além disso, esses métodos são de grande importância para estudos desenvolvidos no Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água (LTPA), envolvendo não somente a quantificação de toxinas em água ultrapura, mas também em matrizes mais complexas, como extratos preparados a partir de cultivo de cianobactérias.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar parâmetros de mérito para a quantificação de microcistina-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos, considerando as melhores condições cromatográficas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram considerados como objetivos específicos deste estudo:

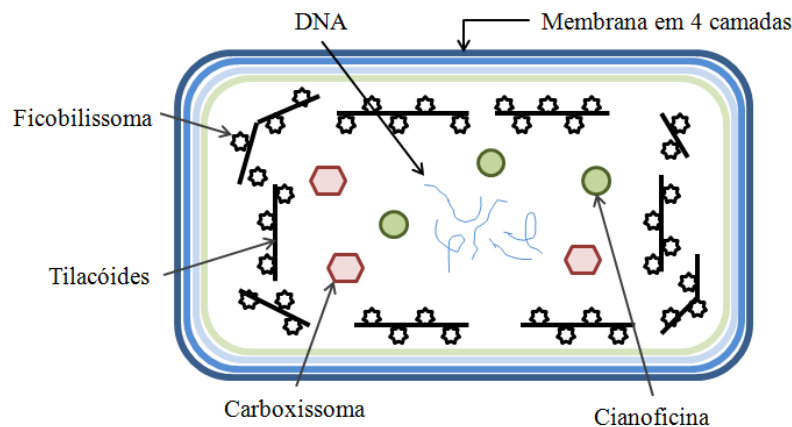
- Otimizar condições cromatográficas, como comprimento de onda a ser monitorado, proporção da fase móvel, vazão e volume de injeção, baseado no método cromatográfico de quantificação de microcistina-LR desenvolvido por Vilela (2009);
- Determinar, no estudo da validação, os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação;
- Validar o processo de pré-concentração da microcistina-LR por extração em fase sólida em termos de exatidão e precisão;
- Testar a aplicabilidade do método estabelecido para determinação da microcistina-LR em extrato pré-purificado de cianobactérias;
- Determinar os parâmetros linearidade, limite de detecção e limite de quantificação na melhor condição estabelecida para análise de extrato pré-purificado de cianobactérias;
- Quantificar a toxina microcistina-LR em extrato pré-purificado de cianobactérias.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

As cianobactérias são microrganismos procariontes que possuem lamelas fotossintéticas (tilacóide) onde são encontrados pigmentos fotossintetizantes (CLARO, 2009). Algumas cianobactérias, como as dos gêneros *Microcystis* sp., *Gomphosphaeria* sp., *Gloetrichia* sp., *Anabaena* sp. e *Oscillatoria* sp., apresentam vacúolos gasosos (pseudovacúolos) que fornecem à célula a capacidade de flutuação, permitindo assim que estas permaneçam em uma profundidade ótima ao seu crescimento, com concentração de nutrientes, oxigênio e disponibilidade de luz solar adequadas (MATSUZAKI; MUCCI; ROCHA, 2004; CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Como pode ser visualizado na Figura 1, as cianobactérias possuem em suas células uma estrutura denominada cianoficina, que têm a capacidade de armazenar nitrogênio (SANTOS, 2011), além de um sistema fotossintético constituído de sacos membranosos, onde se encontram pequenos grânulos denominados cianossomos ou ficobilissoma (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Estes grânulos contêm a ficocianina e a ficoeritrina, enquanto a estrutura membranosa contém a clorofila e alguns outros compostos. A ficocianina, ou ficobiliproteína, atua como pigmento auxiliar na fotossíntese, já que fixa energia luminosa principalmente na faixa de comprimento de onda da cor vermelha, entre 625 e 630 nm, faixa esta que a clorofila-a não atua de maneira efetiva, sendo que a clorofila-a atua principalmente na faixa do comprimento de onda azul, que se estende de 425 a 475 nm (FERNANDES *et al.*, 2009; SILVA; IDERIHA; NETTO, 2001). Esta característica proporciona uma vantagem ecológica a estes microrganismos, já que com a presença da ficocianina, a cianobactéria consegue utilizar luz mesmo a maiores profundidades (ELIAS, 2011), onde a luz no comprimento de onda do azul já se extinguiu. A maioria das espécies de cianobactéria é fototrófica obrigatória, porém alguns organismos filamentosos podem crescer na ausência de luz, utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).



**Figura 1 - Estrutura geral de uma cianobactéria.**

Fonte: adaptado de Calijuri, Alves e Santos (2006).

A atividade antrópica, através do despejo de efluentes sem tratamento em corpos d'água, pode fornecer excesso de nutrientes ao ambiente e favorecer o aparecimento do fenômeno denominado floração ou *bloom*. Este fenômeno se caracteriza pelo crescimento excessivo de cianobactérias, o que pode trazer efeitos deletérios como o aparecimento de compostos que conferem odor e sabor desagradáveis à água (ZAT, 2009). Em certas condições ambientais, as cianobactérias também podem passar a produzir substâncias nocivas denominadas cianotoxinas que, de acordo com seu mecanismo de ação, podem ser divididas em três grupos: neurotoxinas (afetam o sistema nervoso central), hepatotoxinas (afetam o fígado) e dermatotoxinas (causam irritações dérmicas) (ERMEL, 2009; MEREL *et al.*, 2013).

As neurotoxinas (como a anatoxina-a, anatoxina-a(s) e PSPs – *Paralytic Shellfish Poisoning*) são alcalóides ou organofosforados e se caracterizam por sua ação rápida, causando a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição. As hepatotoxinas incluem peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas) e um alcalóide (cilindrospermopsinas), e possuem efeito tóxico mais lento (AZEVEDO, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001). As microcistinas, em altas doses, levam a intoxicações agudas ou crônicas, e podem ocasionar quadros de diarreia, cólicas, hemorragia no fígado e câncer (ESKINAZI-SANT'ANNA *et al.*, 2006). Dentre as espécies que já foram identificadas como produtoras de hepatotoxinas estão incluídas aquelas dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Planktotrix*, *Radiocystis* e *Arthrospira* (NASCIMENTO, 2011). Em relação às dermatotoxinas, estas são produzidas principalmente pela cianobactéria bentônica marinha *Lyngbya majuscula*, e incluem a aplysiatoxina, debromoaplysiatoxina e a lyngbyatoxina-a (STEWART *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2014). Estas toxinas são mais brandas no seu efeito tóxico em comparação com as neurotoxinas e

hepatotoxinas, mas ainda causam problemas como vermelhidão e lesões na pele, conjuntivite, urticária, obstrução nasal e asma (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

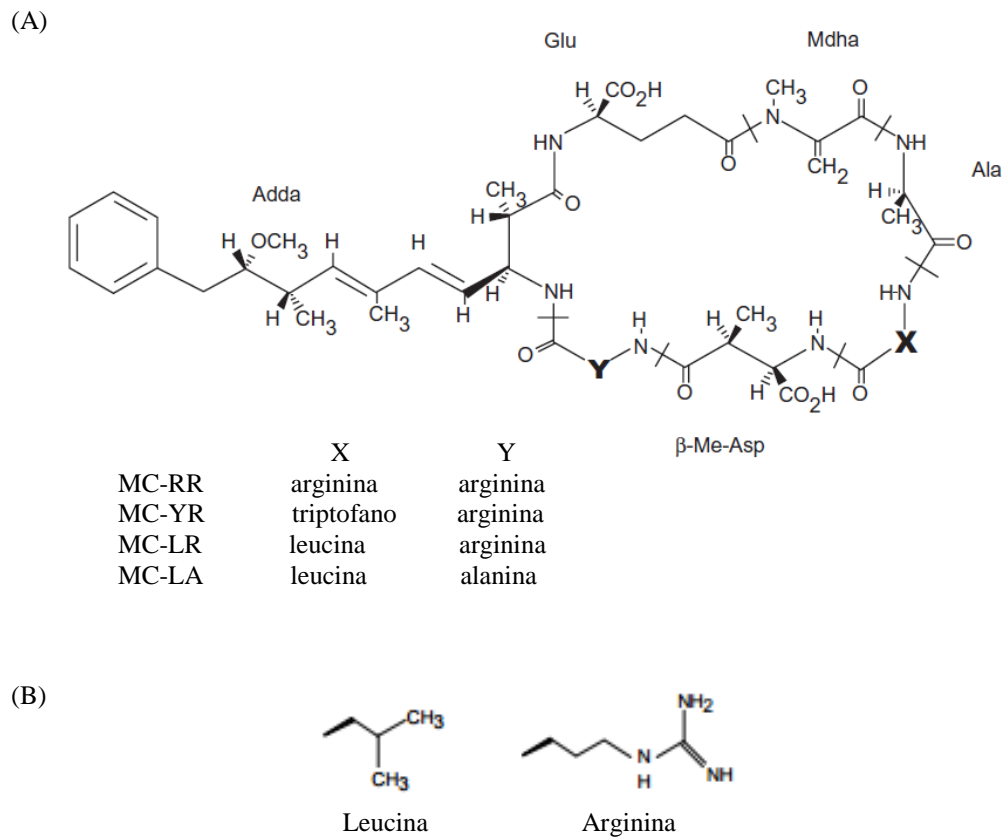
As cianotoxinas não causam apenas prejuízos à saúde humana. Sua ocorrência em sistemas aquáticos em várias partes do mundo traz como consequência a mortandade de crustáceos, peixes, aves e vários outros animais. Podem também afetar de forma negativa o sabor e o odor dos corpos d'água contaminados (MANTOVANI; MOSER; FAVERO, 2011), sendo esses compostos de difícil remoção por meio de processos convencionais de tratamento de água.

### 3.2 MICROCISTINAS

Dentre as hepatotoxinas, as microcistinas (MCs) são as mais estudadas, já que são encontradas com maior frequência em eventos de floração em corpos d'água (MANTOVANI; MOSER; FAVERO, 2011). As microcistinas são peptídeos cíclicos compostos por sete resíduos de aminoácidos, possuindo peso molecular entre 800 e 1100 g mol<sup>-1</sup> (CARNEIRO; LEITE, 2007). O aminoácido Adda (Figura 2a) é constantemente associado com a toxicidade da molécula devido ao seu dieno conjugado. As porções X e Y representam aminoácidos variáveis, os quais, em conjunto, darão nome a mais de sessenta variantes da toxina microcistina (LUCA; PEGORER; LUCA, 2010). Por exemplo, a microcistina que possui leucina (inicial L) e arginina (inicial R) (Figura 2b) nas porções X e Y será identificada como MC-LR (MEREL *et al.*, 2013). A microcistina-LR é a hepatotoxina mais tóxica e que aparece com maior frequência em água doce quando da presença de cianobactérias produtoras desta toxina (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

As MCs são moléculas estáveis e solúveis em água. Por serem de natureza hidrofílica, as MCs não conseguem ultrapassar membranas lipídicas facilmente (FERNANDES, 2008). Porém, quando dentro da célula, estas se ligam às proteínas fosfatase da família serina/treonina, principalmente PP1 e PP2A, inibindo-as (SOARES, 2009). Essa inibição pode levar a consequências graves, dependendo da dose, como ao acúmulo de proteínas fosforiladas no fígado, necrose celular, hemorragia e morte (MÜLLER, 2008; MEREL *et al.*, 2013). Algumas informações sobre a microcistina-LR podem ser visualizadas no Quadro 1 (KAMOGAE; HIROOKA, 2000; OSSWALD, 2002; JIMENES, 2003; OLIVEIRA, 2012). É importante ressaltar que, apesar das microcistinas serem caracterizadas como moléculas

hidrofílicas, quando se considera a molécula como um todo, existem grupamentos hidrofóbicos, como a porção Adda da molécula (Figura 2a) (SOARES, 2009).



**Figura 2 - Estrutura geral da microcistina, com a indicação de suas quatro principais variantes (A); e estrutura dos aminoácidos leucina e arginina, presentes na microcistina-LR (B).**

Fonte: adaptado de Carneiro e Leite (2007); Faassen e Lürling (2013).

CARACTERÍSTICAS DA MICROCISTINA-LR	
Resíduos de aminoácido nas porções X e Y	Leucina e Arginina
Fórmula química	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$
Peso molecular	$994 \text{ g mol}^{-1}$
Natureza química	Hidrofílica
Diâmetro	1,2 a 2,6 nm

**Quadro 1 - Características da microcistina-LR.**

Fonte: Kamogae e Hirroka (2000); Osswald (2002); Jimenes (2003); Oliveira (2012).

As microcistinas são consideradas moléculas resistentes à hidrólise e a oxidação em pH aproximadamente neutros, graças a sua estrutura peptídica cíclica. Quando protegidas da

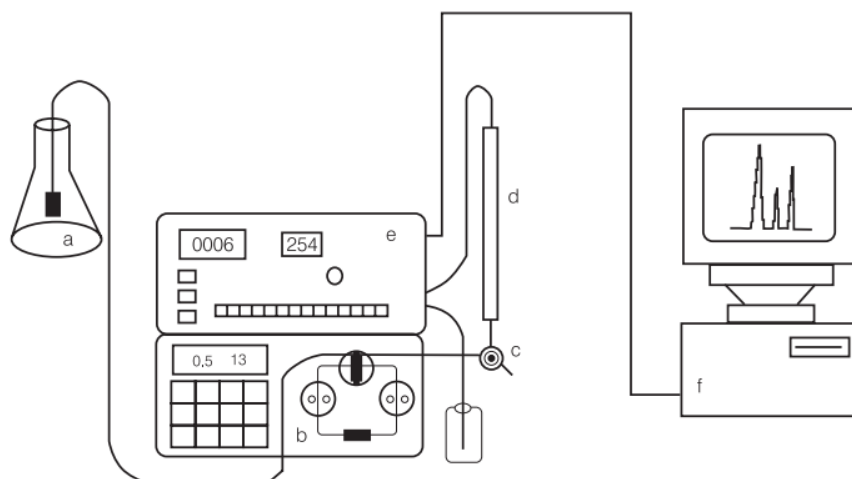
luz, a estabilidade da molécula é garantida por meses ou até anos. Existe também certa estabilidade da molécula à temperatura elevada e a pH extremos. Em estudos de degradação de microcistina a partir do pH, Müller (2008) observou que, para uma mesma temperatura de 40 °C, foram necessárias 10 semanas para se obter a degradação de 90% da microcistina quando em pH 1 e de 12 semanas para a mesma porcentagem de degradação da molécula quando em pH 9.

O aminoácido Adda é exclusivo de cianobactérias e é o responsável pelas microcistinas possuírem absorção máxima em 238 nm (banda UV) (FERNANDES, 2008). Vale ressaltar também que existem diferenças de polaridade entre as variantes de MC. A MC-LA, por exemplo, apresenta caráter mais hidrofóbico do que a MC-LR, possivelmente pelo baixo número de grupos funcionais ionizáveis (KAMOGAE; HIROOKA, 2000; OLIVEIRA, 2012).

### 3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

#### 3.3.1 *Conceitos Gerais*

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma variante da cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel líquida, eluída sob altas pressões. A HPLC e a cromatografia líquida clássica funcionam com base no mesmo princípio, porém a primeira possui velocidade de análise, eficiência, sensibilidade e facilidade de operação superiores (FERREIRA, 2013). O mecanismo de separação se baseia no fato de que diferentes analitos possuem diferentes afinidades com a fase móvel e com a fase estacionária. Analitos que possuem menor afinidade com a fase estacionária serão menos retidos, sendo conseqüentemente eluídos em menor tempo (RAMOS, 2014). O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, que pode ser visualizado na Figura 3, inclui basicamente: um reservatório de fase móvel; uma bomba de alta pressão; uma válvula de injeção; coluna; detector; e um sistema para a obtenção dos dados (CARVALHO, 2014).



**Figura 3 – Equipamento utilizado em HPLC. (a) reservatório da fase móvel; (b) bomba de alta pressão; (c) válvula de injeção; (d) coluna; (e) detector e (f) sistema para obtenção dos dados. Fonte: Degani, Cass e Vieira (1998).**

A HPLC é geralmente classificada de acordo com o mecanismo de separação, sendo: cromatografia líquido-sólido ou por adsorção; cromatografia líquido-líquido ou por partição; cromatografia por troca iônica; cromatografia por afinidade; cromatografia por exclusão; e cromatografia quiral (SKOOG *et al.*, 2006). Collins, Braga e Bonato (2006) ainda acrescentam mais um mecanismo de separação: a cromatografia líquida com fase ligada. Os autores justificam mais essa classificação já que na cromatografia com fase ligada, ambos os mecanismos de adsorção e partição ocorrem, não podendo assim ser classificada adequadamente em nenhuma das categorias citadas anteriormente. Skoog *et al.* (2006) consideram, entretanto, a cromatografia líquida com fase ligada uma subdivisão da cromatografia por partição.

O primeiro tipo principal de cromatografia líquida é a cromatografia líquido-sólido (CLS) ou por adsorção (HAGE; CARR, 2012). O mecanismo de separação baseia-se na competição entre as moléculas da amostra e da fase móvel pelos sítios ativos na superfície de um sólido. Se o adsorvente possuir uma superfície polar (por exemplo, sílica), grupos apolares terão pouca afinidade com essa superfície e, portanto, não serão retidos. No entanto, grupos polares, capazes de formar ligações de hidrogênio, terão forte afinidade com a superfície, sendo conseqüentemente retidos (FERREIRA, 2013).

O segundo tipo principal de cromatografia líquida é a cromatografia líquido-líquido (CLL) ou por partição, que faz uso de duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma a fase móvel e a outra a fase estacionária. A fase estacionária é um líquido imobilizado por adsorção na superfície das partículas do recheio. A maior ou menor solubilidade do analito em cada uma

das fases é determinada pelo seu coeficiente de partição (HAGE; CARR, 2012; LEITE *et al.*, 2005; SKOOG *et al.*, 2006). A cromatografia líquida com fase ligada (HPLC-FL), por sua vez, surgiu para resolver os problemas associados com a CLL, já que esta emprega uma fase estacionária quimicamente ligada a um suporte e elimina a solubilidade da fase estacionária na fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; HAGE; CARR, 2012).

Seja qual for o tipo de cromatografia líquida, existem partes fundamentais do processo cromatográfico, como a coluna, o detector e a fase móvel, que merecem um destaque especial. A coluna cromatográfica é o único local onde efetivamente ocorrem as separações dos componentes da amostra. As colunas são geralmente construídas em aço inoxidável e são recheadas com partículas muito pequenas (1-5  $\mu\text{m}$ ) de um material poroso, geralmente sílica (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 1974; KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). A sílica sozinha pode ser usada como fase estacionária, no caso de uma separação por adsorção, mas também pode ser ligada a diferentes grupos funcionais para a sua utilização na cromatografia por partição (SILVA, 2012). Tais grupos podem ser de natureza polar, como o grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) ou o grupo diol [ $-\text{CH}_2(\text{OH})_2$ ], e são chamados de fase normal (FN). Quando os grupos são de natureza apolar, como octil ( $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ ), octadecil ( $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ) e fenil ( $-\text{C}_6\text{H}_5$ ), são denominados de fase reversa (FR) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 1974). A escolha entre a técnica de fase normal ou fase reversa é determinada pela solubilidade dos analitos na fase móvel, já que os componentes a serem analisados devem, sem exceção, ser solúveis na fase móvel escolhida (RAMOS, 2014). Técnicas que utilizam a fase reversa possuem inúmeras aplicações, como na separação de alcalóides, alcoóis, antibióticos, aromáticos, pesticidas, vitaminas, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Um detector comumente empregado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é o detector de malha de fotodiodos ou simplesmente DAD (do inglês *Diode Array Detector*). Este detector é um avanço nos detectores UV antigos e utiliza um sistema ótico invertido: a célula contendo a amostra é iluminada com luz branca (policromática). A luz emergente da célula chega a uma rede de difração através da qual é dispersada até o elemento fotossensível, que no caso do DAD, é um conjunto de fotodiodos montados sobre um *chip* de silício (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). Isso permite que sejam obtidos espectros de varredura da amostra durante todo o tempo da corrida cromatográfica, possibilitando, por exemplo, avaliar a presença de co-eluição de substâncias ou, o monitoramento de derivados que sejam formados por degradação da molécula de interesse e que apresentem absorção na faixa UV-Vis.



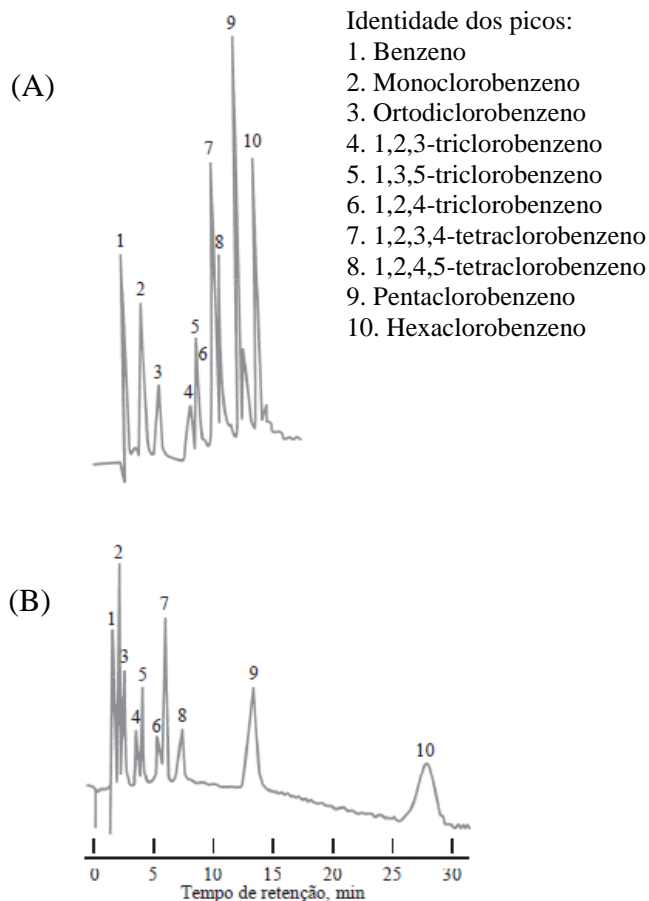
Em HPLC, a fase móvel exerce duas funções, a de arrastar a amostra através do sistema e a de participar do processo de separação. São três os critérios que devem ser considerados na seleção dos solventes a serem empregados como fase móvel: as características físico-químicas, a força cromatográfica e a seletividade. Sobre as características físico-químicas da fase móvel, esta deve: (a) ser de alto grau de pureza; (b) dissolver a amostra sem decompor seus constituintes; (c) não deteriorar a fase estacionária; (d) ter baixa viscosidade e ponto de ebulição; (e) ser compatível com o detector; e em misturas, (f) ter miscibilidade completa. Fases ligadas a base de sílica são solúveis em pH mais altos, e as ligações siloxano se decompõem sob pH ácido, devido a perda da fase estacionária quimicamente ligada. Por esta razão, recomenda-se o uso de fases móveis no intervalo de  $2 < \text{pH} < 8$  quando a fase estacionária é baseada em sílica (SILVA *et al.*, 2004; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A força cromatográfica se refere a capacidade da fase móvel em interagir com os componentes da amostra, e é determinada pela polaridade do solvente. Solventes fortes diminuem a retenção e os fracos, aumentam. A força cromatográfica do solvente é atribuída em relação à polaridade da fase estacionária. O solvente é forte quando possui grau de polaridade semelhante à fase estacionária. Em cromatografia líquida em fase normal (HPLC-FN), como a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, solventes polares são considerados fortes, e os mais apolares, fracos. Em cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-FR), como a fase estacionária é mais apolar, solventes apolares são considerados fortes, e os polares, fracos.

A seletividade é outro conceito que está associado à solubilidade dos componentes da amostra em solventes de polaridades semelhantes. Se, em alguma separação, ocorrer de dois picos se sobreporem mesmo após o ajuste da força cromatográfica, pode-se alterar a seletividade trocando-se um dos solventes. Assim, procura-se um solvente que não irá alterar a polaridade da fase móvel, mas que irá alterar a sua seletividade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A eluição pode ser de dois tipos: isocrática e gradiente. O método de eluição isocrática utiliza a mesma força cromatográfica do início ao fim da análise. Ou seja, a proporção entre as fases móveis utilizadas permanece a mesma. Um exemplo de eluição isocrática seria utilizar MeOH:H<sub>2</sub>O (metanol:água) na proporção 70:30 (v/v) do início ao fim da análise. Eluição por gradiente, por sua vez, é aquela na qual a composição da fase móvel muda ao longo da corrida cromatográfica, resultando em maior simetria para os picos cromatográficos, melhor resolução e detectabilidade, e menor tempo de análise (COLLINS; BRAGA;

BONATO, 2006). A eluição gradiente é muitas vezes necessária quando se deseja separar uma mistura complexa de compostos com uma ampla faixa de tempos de retenção, já que a eluição isocrática traz o problema de pouca resolução entre picos com tempos de retenção próximos e resolução desnecessária para os analitos com tempos de retenção maiores, como pode ser visualizado na Figura 4 (SEGATO; SILVA; JARDIM, 2009). Nela, pode-se perceber uma melhora na eficiência de separação através da utilização de uma eluição gradiente. A eluição isocrática, por sua vez, também possui algumas vantagens em relação a eluição por gradiente, como a simplicidade, repetitividade e menor custo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).



**Figura 4 - Cromatogramas obtidos para uma mistura complexa de compostos benzênicos com eluição por gradiente (A) e eluição isocrática (B).**

Fonte: adaptado de Skoog *et al.* (2005).

Comparada com a cromatografia gasosa (CG), a HPLC possui algumas vantagens: (a) permite a separação de compostos termicamente instáveis por ser feita a baixas temperaturas; (b) tanto a fase móvel quanto a fase estacionária possuem interação seletiva com a amostra, ao

contrário da CG, onde apenas a fase estacionária realiza interação com a amostra; e (c) possui uma maior variedade de fases estacionárias. Suas vantagens como técnica cromatográfica abrangem o tempo reduzido de análise, alta resolução, boa análise qualitativa, geração de resultados quantitativos, boa detectabilidade, versatilidade e mecanização. Como desvantagens da técnica, podem ser citadas o alto custo de instrumentação e operação e a falta de um detector universal (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

### ***3.3.2 Aplicação de HPLC para Detecção e Quantificação de Microcistina***

A HPLC é a técnica analítica mais comumente utilizada para a quantificação de microcistinas e nodularinas. As toxinas podem ser separadas utilizando-se coluna de fase reversa C18, coluna de amido C16 ou coluna de troca iônica, e uma fase móvel geralmente constituída de acetato de amônio, acetonitrila, água ou metanol, podendo ainda ser adicionada de ácido trifluoracético (SPOOF; KARLSSON; MERILUOTO, 2001; SPOOF *et al.*, 2003; SANCHES *et al.*, 2012). Diferentes condições de análise para diferentes variantes de microcistina são indicadas no Quadro 2.

A fase móvel permite definir se uma toxina irá se separar bem dos seus análogos. Por exemplo, as microcistinas –LR e –YR co-eluem quando se usa uma fase móvel composta de acetonitrila/acetato de amônio, mas conseguem ser separadas uma da outra com o uso de fases móveis baseadas em metanol (NICHOLSON; BURCH, 2001). A maneira mais comum para a detecção destas toxinas é por sua banda característica na região do UV. Um espectro típico de microcistina tem absorvância máxima em 238 nm (ou ocasionalmente em 222 nm no caso de microcistina contendo triptofano, como a MC-LW). Porém, um detector de arranjo de diodos (DAD), produz uma evidência muito maior da presença de microcistina na amostra. Como esse método se baseia no tempo de retenção para uma correta identificação, um padrão de microcistina deve ser usado (LAWTON; EDWARDS; CODD, 1994; NICHOLSON; BURCH, 2001; SPOOF *et al.*, 2003).

Apesar do metanol ser utilizado como um dos componentes da fase móvel em vários estudos, este traz consigo algumas desvantagens. Purdie *et al.* (2009) concluíram que o uso de metanol como fase móvel pode causar perda de resolução e aumento do tempo de retenção da MC-LR. Além disso, há perda de recuperação da toxina quando da utilização de metanol.

Outro aspecto negativo é a maior viscosidade da solução de metanol em comparação com outros solventes orgânicos na mesma proporção. Isto pode afetar de forma negativa a manutenção da pressão dentro da coluna. Por estas razões, a maioria dos estudos conduzidos com MC-LR faz uso de soluções de acetonitrila (ACN) em diferentes proporções.

Como a MC-LR é mais hidrofílica do que as outras variantes de microcistina, se torna mais adequado analisá-la através de cromatografia de fase reversa (SHAMSOLLAHI *et al.*, 2015). Um exemplo de metodologia para análise da microcistina-LR por HPLC-DAD é utilizar uma coluna de fase reversa de sílica C18, com eluição por gradiente com água e acetonitrila como fases móveis, ambas contendo 0,05% de TFA (ácido trifluoracético) (SANCHES *et al.*, 2007; GHAZALI; SAQRANE; CARVALHO, 2009; MELO; SANTOS, 2009). Se mais de uma variante de microcistina estiver sendo analisada, o gradiente deve cobrir uma gama suficiente de polaridades (por exemplo, 30-70% de acetonitrila) para permitir que todas as microcistinas sejam bem resolvidas umas das outras. Outras combinações de solvente já foram empregadas com sucesso, incluindo metanol/água e acetato de amônio/acetonitrila (CHORUS; BARTRAM, 1999; CASSINI; ANTUNES; KELLER, 2013).

O ácido trifluoracético (TFA) é adicionado à fase móvel e utilizado como modificador ácido orgânico, com o objetivo de se obter uma boa separação e alta resolução (SHAMSOLLAHI *et al.*, 2015). A adição de TFA melhora a eficiência cromatográfica já que através da manutenção de um pH ácido, evita a desprotonação de grupos carboxílicos presentes no peptídeo. É caracterizado como um agente de supressão iônica capaz de aumentar o tempo de retenção de peptídeos pouco retidos e minimizar a interação entre grupos básicos e grupos silanóis presentes na superfície da sílica (SPOOF; KARLSSON; MERILUOTO; 2001). O TFA é volátil e facilmente removido, além de possuir baixa absorção nos comprimentos de onda normalmente utilizados para detecção (MERILUOTO, 1997).

Toxina	Coluna	Fase Móvel	Bombeamento	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	T (°C)	t retenção (min)	λ (nm)	Volume de injeção (μL)	Referência
LR	Fase reversa C18	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> /ACN	I	-	-	≈2	238	-	Moreira <i>et al.</i> (2005)
LR	Fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) Marca Rexchrom S5-100-ODS	ACN/H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA	I	1,0	-	6,6	238	20	Sanches <i>et al.</i> (2007)
RR, YR, LR, LA	Kinetex™ C18 (100 x 2,1 mm x 2,6 μm)	H <sub>2</sub> O/MeOH com 0,1% TFA e MeOH 100%	I/G linear	0,25	37	RR: 22,3 YR: 24,3 LR: 25,7 LA: 29,7	238	50	Cassini, Antunes e Keller (2013)
LR	Fase reversa C18 (Lickrospher 100 RP-18, 125 mm x 4 mm x 5 μm)	ACN/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	I	1,0	-	-	238	-	Ferrão-Filho, Kozlowsky-Suzuki e Azevedo (2002)
LR	Chromolith C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm)	ACN/H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA	G	1,0	-	-	238	50	Ghazali, Saqrane e Carvalho (2009)
LR	Zorbax C18 da Agilent (250 mm x 4,6 mm x 5 μm)	ACN/H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA	G linear	1,0	25	≈ 7	238	-	Vilela (2009)
LR	C18 (150 mm x 3,9 mm x 5 μm)	ACN/H <sub>2</sub> O com 0,1% TFA	G linear	1,0	40	-	238	25	Gurbuz e Codd (2008)
LR, YR, AR	Waters μ Bondapak C18 (3,9 x 300 mm x 10 μm)	MeOH/TFA	I	1,0	-	YR: 7,0 LR: 8,1 AR: 9,3	238	-	Carmichael <i>et al.</i> (2001)
LR, LR-D-Leu	C18 Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm x 5 μm)	ACN/H <sub>2</sub> O com 0,05% TFA	G	1,0	40	LR: 7,5 LR-D-Leu: ≈ 9	238	100	Melo e Santos (2009)

**Quadro 2 - Condições cromatográficas para a análise de microcistinas por HPLC-DAD.**

Legenda: I-Isocrática; G-Gradiente; CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: Acetato de amônio; ACN: Acetonitrila; MeOH: Metanol; TFA: Ácido trifluoracético; H<sub>2</sub>O: Água ultrapura.

Fonte: Autoria própria.

### 3.4 VALIDAÇÃO

Um laboratório que deseja desenvolver um novo método analítico, implementar um método já estabelecido em novo local ou equipamento, ou ainda, modificar as condições de um método, deve assegurar-se da eficiência e adequação do novo procedimento para aquilo que se deseja analisar (BRITO *et al.*, 2003). É através do procedimento de validação do processo analítico que a confiabilidade dos resultados obtidos é assegurada (PASCHOAL *et al.*, 2008). Isto é feito através de vários parâmetros analíticos, como seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI *et al.*, 2004). Conforme indicado por Paschoal *et al.* (2008), no Brasil, existem dois órgãos responsáveis por estabelecer diretrizes e normas para procedimentos de validação: o Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), com o documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2003); e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com a Resolução RE nº 899, de 2003 (ANVISA, 2003).

Muitos são os trabalhos desenvolvidos sobre um método de quantificação de microcistinas por HPLC (SILVA, 2010; FLORES; ZARZA; GARCÍA, 2013), porém, são poucos os estudos que englobam todos ou grande parte dos parâmetros existentes para uma adequada validação do mesmo. Sanches *et al.* (2007) considerou o método validado apenas com o estudo dos parâmetros linearidade, precisão (somente a nível de repetibilidade), sensibilidade e ensaios de recuperação com cartuchos C18. Nascimento (2011) avaliou os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, ensaios de recuperação e precisão ao nível de repetibilidade, não tendo analisado o parâmetro robustez, precisão intermediária e reprodutibilidade.

#### 3.4.1 Seletividade

A seletividade garante que o pico de resposta formado na análise cromatográfica é gerado exclusivamente pelo composto de interesse. Ou seja, é possível avaliar o grau de interferência de outras espécies presentes durante a análise (como os componentes da matriz) sobre a resposta do equipamento (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

A seletividade pode ser avaliada de várias maneiras. A maneira mais usual é fazer uma comparação entre a matriz livre do composto de interesse e a matriz adicionada da substância (padrão do analito de interesse), sendo que, neste caso, nenhuma substância interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito. A segunda forma mais utilizada é através do uso de detectores modernos, como o de arranjo de diodos e o espectrômetro de massas. Estes detectores conseguem comparar o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e usa-se isto como indicação da presença do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004). Se a matriz sem o analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição de padrão com curva obtida por calibração externa preparada em água ultrapura. Para isto, preparam-se dois grupos de amostras contendo a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Prepara-se um grupo com a matriz da amostra, e o outro grupo sem a matriz da amostra. Os resultados podem ser representados em um mesmo gráfico em função da concentração de analito adicionado. Caso as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, pode-se dizer que o método é seletivo (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2007). Aragão, Veloso e Andrade (2009), validando um método para determinação de metilxantinas em HPLC-UV/Vis, determinaram a seletividade através da comparação entre duas curvas analíticas, uma construída com as soluções de trabalho mistas adicionadas à matriz e a outra sem a presença da matriz. Como as duas curvas eram paralelas (análise esta feita através da comparação dos coeficientes angulares), pode-se afirmar que o método era seletivo.

### **3.4.2 Linearidade e Faixa de Aplicação**

Quando um método é capaz de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação, diz-se que ele é linear (SANTANA *et al.*, 2007). Essa relação matemática pode ser obtida através da construção de uma curva analítica, definida através de no mínimo cinco pontos sem incluir o ponto zero da curva. As estimativas dos coeficientes da curva analítica podem ser obtidos através de uma regressão linear. Através desta técnica, é possível calcular os coeficientes de regressão linear  $a$  e  $b$ , além do coeficiente de correlação,  $r$ . Quanto mais próximo de 1 for o valor de correlação linear ( $r$ ) menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). De acordo

com o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, consideram-se aceitáveis valores maiores a 0,90 para o coeficiente de correlação calculado (INMETRO, 2003). Já na resolução RE 899 da ANVISA, são recomendados valores iguais a 0,99 (ANVISA, 2003).

Os desvios da linearidade são difíceis de serem notados visualmente, o INMETRO cita que pode ser verificada a adequação do ajuste linear por meio de cálculos dos resíduos entre os valores medidos e os calculados a partir da regressão linear. Pode-se calcular o valor de  $t$  por meio da Equação 1 (INMETRO, 2003):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}} \quad (1)$$

$$\text{resíduo} = |X_{\text{medido}} - X_{\text{calculado}}|$$

onde  $s_r$  é o desvio padrão dos resíduos e  $n$  o número de pontos. Caso o valor de  $t$  calculado para um ponto duvidoso for menor ou igual ao valor de  $t$  unilateral, para um dado nível de confiança e  $(n - 1)$  graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear (INMETRO, 2003).

Um parâmetro que pode ser determinado simultaneamente à linearidade, é a sensibilidade, que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, e pode ser expressa através da inclinação da curva de regressão linear (INMETRO, 2003).

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (2)$$

onde  $S$  é a sensibilidade,  $dx$  é a variação da resposta e  $dc$  a variação na concentração (INMETRO, 2003).



### 3.4.3 Precisão

O parâmetro precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Para se avaliar a precisão, o desvio padrão é normalmente utilizado. Mais especificamente, se utiliza a estimativa do desvio padrão absoluto ( $s$ ) (RIBANI *et al.*, 2004). Há três parâmetros para se avaliar a precisão: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRAGA; POPPI, 2004).

Repetibilidade ou precisão intracorrída, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas nas seguintes condições (FORTI; ALCAIDE, 2011): (a) mesmo procedimento; (b) mesmo analista; (c) mesmo equipamento usado sob as mesmas condições; (d) mesmo local; e (e) repetições em curto espaço de tempo.

Sugere-se efetuar sete ou mais repetições para se determinar a repetibilidade, analisada através do desvio padrão obtido. Pode ser determinada por meio do uso de padrões, material de referência ou adição do analito na amostra (fortificação), em várias concentrações na faixa de trabalho. Lanças (2004) comenta que, em análises cromatográficas, é recomendado se determinar a repetibilidade de pelo menos dois parâmetros: o tempo de retenção e a área ou altura do pico. Sanches *et al.* (2007) avaliaram a precisão a nível de repetibilidade utilizando concentrações de 0,3, 2,0 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo cada ponto avaliado em quintuplicata. Estas concentrações foram escolhidas por se encontrarem dentro da faixa linear utilizada. Os resultados obtidos para cada concentração foram avaliados através do coeficiente de variação (CV) com  $n=5$ . Cassini, Antunes e Keller (2013) avaliaram a repetibilidade do método através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) de sete replicatas de amostras de diferentes corpos d'água. As amostras coletadas foram fortificadas com microcistina-LR na concentração final de 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Em seguida, foram concentradas em cartucho SPE e analisadas por HPLC. Os autores citam que um desvio padrão relativo de até 20% é aceitável, sendo que estes obtiveram no estudo um DPR de 3,2%, indicando assim que o método é preciso.

A precisão intermediária ou precisão intercorrída, é avaliada para uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo local ou em locais diferentes, mas definindo exatamente as condições a serem variadas, tais como: (a) diferentes operadores; (b) diferentes equipamentos; e (c) diferentes tempos.

A variável reprodutibilidade, também chamada de precisão interlaboratorial, corresponde ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, analisadas sob condições variadas de medição (OTOMO, 2010; MATHIAS *et al.*, 2010). É avaliada comumente através de uma comparação interlaboratorial, onde se utilizam: (a) a mesma amostra; (b) o mesmo método; (c) operadores diferentes; (d) diferentes laboratórios; e (e) diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004).

#### 3.4.4 Exatidão

Se há concordância entre os resultados obtidos em uma análise e um valor de referência que é aceito como verdadeiro, então o método é considerado exato. Para se avaliar a exatidão de um método, podem-se utilizar materiais de referência certificados (MRC), comparação de métodos, adição de padrão e ensaios de recuperação, sendo este último o método mais utilizado para se determinar a exatidão (RIBANI *et al.*, 2004; SILVA, 2010). A recuperação é representativa do parâmetro exatidão já que relaciona a quantidade de determinado analito recuperado pelo método, em relação a quantidade real do analito na amostra (valor aceito como verdadeiro), e pode ser calculada através da Equação 3 (SILVA, 2010), onde:  $C_1$  é a concentração do analito na amostra fortificada;  $C_2$  é a concentração do analito na amostra sem fortificação; e  $C_3$  é a concentração adicionada.

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

Segundo o órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA), a exatidão também pode ser definida através do preparo de soluções do padrão em no mínimo três níveis de concentração diferentes (alto, médio e baixo) e realizando no mínimo cinco análises por concentração. É recomendado que o coeficiente de variação obtido para cada concentração seja menor ou igual a 15% em relação ao valor real da solução do padrão, exceto próximo do valor do limite de quantificação, onde desvios menores ou iguais a 20% são aceitos. O valor do desvio da média em relação ao valor real de concentração serve como medida para a exatidão (FDA, 2001).

### 3.4.5 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada pelo equipamento, mas não necessariamente quantificada. Pode ser obtido através de três métodos diferentes: método visual; método da relação sinal-ruído; e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). O INMETRO faz a distinção entre dois limites de detecção: o do equipamento e o do método. O limite de detecção do equipamento (LDE) é igual a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é determinado como “a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero” (INMETRO, 2003).

Oliveira (2003), validando um método para quantificação de microcistina-LR, determinou o LD utilizando concentrações preparadas em quintuplicata e analisando a relação sinal-ruído obtida. A menor concentração que produziu uma relação sinal-ruído ( $s/r$ ) de 2 a 3 vezes a da linha de base foi tomada como referência, tanto para o cálculo do LD, como para o cálculo do LQ (limite de quantificação). Aragão, Veloso e Andrade (2009) não fizeram uso da relação sinal-ruído, mas empregaram método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo possível a determinação do LD pela Equação 4, onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta (estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação); e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica (ou também chamada de inclinação da curva analítica).

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (4)$$

### 3.4.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. Assim como o LD, o LQ pode ser calculado pelo método visual, pela relação sinal-ruído, ou pela relação entre o desvio

padrão da resposta ( $s$ ) e a inclinação da curva analítica ( $S$ ), em níveis próximos ao LQ, a partir da Equação 5 (VALDEMARRA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (5)$$

Para técnicas analíticas de separação, como a análise cromatográfica, é recomendado utilizar-se do método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

O FDA recomenda que o padrão de menor concentração da curva de calibração deve ser aceito como LQ se: (a) o sinal gerado para esta concentração for pelo menos cinco vezes maior do que o sinal gerado para o branco; e (b) o pico gerado for identificável, discreto e reprodutível com uma precisão de 20% e uma exatidão de 80 a 120% (FDA, 2001).

### 3.4.7 Robustez

Um método robusto é aquele que não tem seus resultados afetados por pequenas e deliberadas variações em seus parâmetros (RIBEIRO *et al.*, 2008). Em cromatografia, pode-se testar a robustez do método variando-se a concentração do solvente orgânico, pH, força iônica da fase móvel, entre outros (ALMEIDA, 2009). Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando a proporção de metanol na fase móvel em  $\pm 2\%$ , o pH da fase móvel em 0,5 unidades de pH ou a temperatura da coluna em  $\pm 2$  °C. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de precisão, exatidão e seletividade aceitáveis, então o método é considerado robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

Cassini, Antunes e Keller (2013) determinaram a robustez através da variação das temperaturas de acondicionamento da coluna e as concentrações de ácido trifluoracético (TFA) na fase móvel aquosa. As temperaturas utilizadas foram de 31, 34 e 37 °C, e as concentrações de TFA adicionadas a fase aquosa foram de 0; 0,01; 0,05 e 0,1% (v/v). Os resultados demonstraram que o método era robusto em todas as condições analisadas.

#### 4 MÉTODO DE PESQUISA

Para todas as análises, foi utilizado um padrão de microcistina-LR da marca Abraxis, com pureza acima de 99%. Todos os solventes utilizados, incluindo a acetonitrila e o metanol, eram grau HPLC. Antes de cada análise cromatográfica, a fase móvel, e também a acetonitrila e a água ultrapura utilizadas para a limpeza do equipamento eram sonicadas em um banho de ultrassom, marca UNIQUE. Soluções aquosas (água ultrapura com e sem TFA 0,05%) eram sonicadas por 30 minutos, enquanto as demais soluções (acetonitrila com e sem TFA 0,05%) eram sonicadas por 15 minutos. Todas as soluções que contivessem microcistina-LR eram mantidas, quando fora de uso, sob refrigeração à temperatura aproximada de -10 °C, em vials contendo tampa, os quais ainda eram embalados com papel alumínio para evitar uma possível degradação da toxina em função da exposição a luz. No preparo dos padrões, a diluição era realizada somente com metanol grau HPLC.

Ensaio preliminares foram realizados com um espectrômetro UV-Vis Cary-50, para se obter o espectro de absorção da MC-LR, onde foi feita uma varredura completa de 200 a 800 nm, utilizando-se um padrão na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup>.

Este trabalho teve como base o estudo realizado por Vilela (2009) que utilizou, para a quantificação da [D-Leu]-microcistina-LR por HPLC-DAD, um cromatógrafo Agilent série 1200, com uma coluna Zorbax C-18, marca Agilent (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). O autor utilizou uma eluição gradiente com fase móvel constituída de água, acetonitrila e ácido trifluoracético, como demonstrado na Tabela 1. A vazão estabelecida foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura do forno foi controlada em 25 °C e o comprimento de onda monitorado em 238 nm.

**Tabela 1 - Eluição gradiente utilizado nas análises de HPLC-DAD**

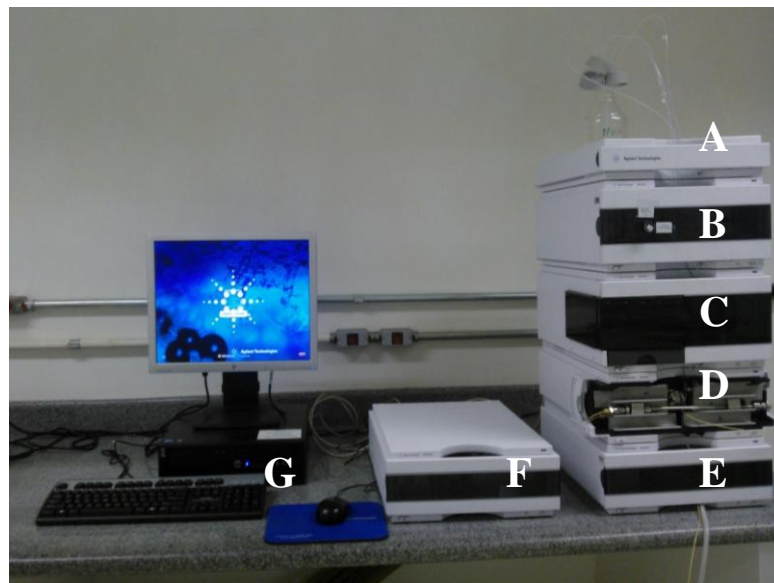
<b>Tempo (min)</b>	<b>Solvente A (TFA 0,05% em ACN) (%)</b>	<b>Solvente B (TFA 0,05% em água) (%)</b>
0,0	25	75
5,0	70	30
5,9	70	30
6,7	25	75
10	25	75

Fonte: Vilela (2009).

A partir das condições cromatográficas utilizadas por Vilela (2009), foi proposto neste estudo, a otimização do método para a determinação e quantificação de microcistina-LR, conforme descrito nas seções subsequentes.

#### 4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O estudo teve início com a otimização do método e fez uso de um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos 1260 Infinity, Agilent, que pode ser visualizado na Figura 5.



**Figura 5 - Sistema cromatográfico utilizado no estudo, constituído de: (A) local para armazenagem na fase móvel; (B) bomba; (C) injetor automático; (D) coluna; (E) detector de arranjo de diodos (DAD); (F) detector de fluorescência; e (G) sistema computacional para comando do equipamento e obtenção dos resultados.**

**Fonte: Autoria própria.**

Foi utilizada uma coluna-guarda (pré-coluna) junto à coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). As mesmas fases móveis do estudo desenvolvido por Vilela (2009) foram utilizadas, sendo estas: acetonitrila com 0,05% de TFA (ácido trifluoracético) e água com 0,05% de TFA. Todas as análises foram realizadas monitorando-se três comprimentos de onda (210, 238 e 260 nm), sem controle da temperatura da coluna, volume de injeção de 20 µL e vazão

de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Apesar do autor (VILELA, 2009) utilizar apenas o comprimento de onda de 238 nm para o monitoramento da microcistina-LR, decidiu-se utilizar um comprimento de onda abaixo e um acima deste valor (210 e 260 nm, respectivamente), para se certificar de que em 238 nm realmente ocorreria a maior absorção de radiação.

Embora Vilela (2009) tenha feito uso de eluição em gradiente, este trabalho estudou primeiramente eluições isocráticas com diferentes proporções de fase móvel, com o intuito de definir a melhor condição de análise para o equipamento utilizado. As variações testadas com o padrão de  $125,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram as seguintes: 20:80, 30:70, 40:60, 50:50 e 60:40 de ACN:H<sub>2</sub>O. A melhor proporção de fase móvel foi avaliada pela área obtida como resposta e pelo tempo de retenção do analito. Desejava-se obter um tempo de retenção satisfatório ( $\leq 20$  minutos), de modo que a análise não demorasse muito tempo, mas que também não fosse tão rápida a ponto de favorecer a co-eluição do analito com a fase móvel.

Após a definição da melhor proporção de fase móvel, foram testados sete volumes de injeção, sendo 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50  $\mu\text{L}$ , fixando-se a vazão em  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O melhor volume de injeção foi definido pela correlação da variável x (volume) *versus* y (área). Com isto foi possível observar se ocorreria um aumento proporcional da resposta do equipamento (MAU), com o respectivo aumento de volume de injeção. O volume escolhido foi aquele que gerou um pico de maior intensidade, proporcionalmente ao volume injetado.

Para a definição da melhor vazão, foram testados os valores de 0,8, 1,0 e  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ , com um volume de injeção fixo de 20  $\mu\text{L}$ . A melhor vazão foi definida pelo menor tempo de retenção que ainda permita a identificação inequívoca da microcistina, sem sobreposição de picos.

## 4.2 VALIDAÇÃO

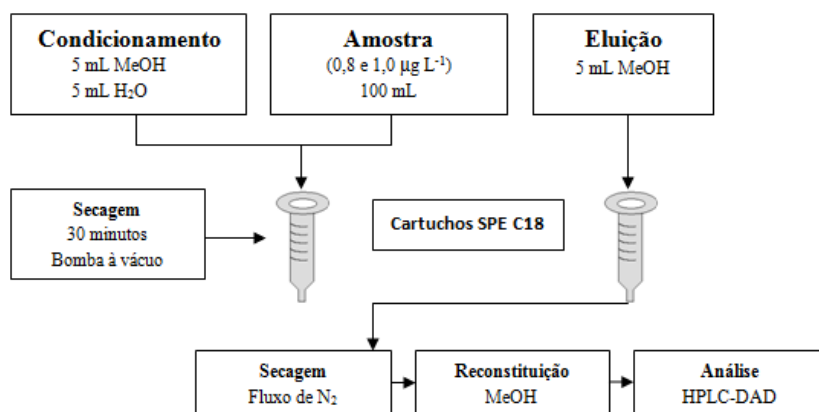
Após a determinação das melhores condições cromatográficas de análise, uma curva analítica foi construída, com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Com a equação desta curva foi possível o cálculo de uma estimativa do limite de quantificação, e a partir deste LQ, foi construída mais três curvas analíticas, nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , a fim de se determinar o LQ real. Foi através da construção das três curvas analíticas de 0,1 a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  que o LQ, LD, linearidade e sensibilidade puderam ser definidas.

#### 4.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Em paralelo com o desenvolvimento do estudo de validação, foram realizados testes para se determinar a porcentagem de recuperação da MC-LR, o que se pode obter através da extração em fase sólida (SPE), com cartuchos C18. Isto se faz necessário já que em matrizes ambientais e, mesmo em meios de cultura, a microcistina-LR se encontra em concentrações muito baixas (da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (MALE *et al.*, 2010). Além disso, o Ministério da Saúde, através da portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011, estabelece um máximo de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  como limite aceitável para a presença de microcistina-LR em corpos aquáticos.

Segundo dados da literatura, o LD para microcistina em sistemas HPLC-DAD é próximo a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo necessária assim a sua pré-concentração (PYO *et al.*, 2005; GURBUZ; CODD, 2008).

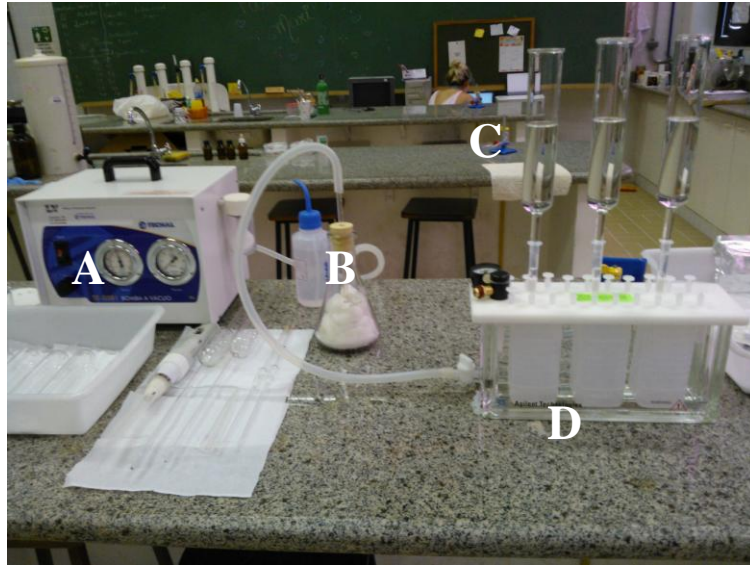
O método de extração em fase sólida foi baseado em Sanches *et al.* (2007), porém as condições foram modificadas a fim de se testar menores volumes de metanol e água para condicionamento dos cartuchos, menor tempo para secagem, sem etapa de limpeza e menor volume de metanol para a eluição, como pode ser visualizado na Figura 6. O sistema consistiu de uma bomba a vácuo, um trap de segurança, um manifold e um funil que é encaixado nos cartuchos C18, como pode ser visualizado na Figura 7.



**Figura 6 - Fluxograma do processo de extração em fase sólida (SPE).**

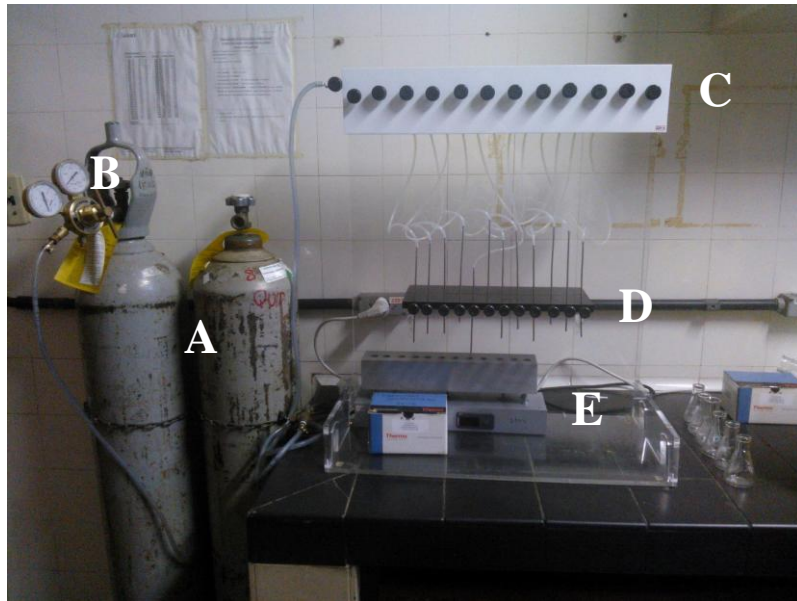
**Fonte: Autoria própria.**





**Figura 7 - Sistema utilizado para os ensaios de extração em fase sólida, constituído de: (A) bomba a vácuo; (B) trap de segurança; (C) funil para disposição da amostra durante o processo de extração; e (D) manifold.**  
**Fonte: Autorial própria.**

A metodologia, cujo fluxograma pode ser visualizado na Figura 7, consistiu em condicionar os cartuchos SampliQ<sup>®</sup> C18 (volume de 3 mL, 500 mg de adsorvente) com 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de água ultrapura, sendo encaixados na sequência, os funis para disposição das amostras. Depois de todo o volume de amostra ter passado pelo cartucho, a bomba a vácuo foi mantida ligada por 30 minutos, a fim de realizar a etapa de secagem. Com o cartucho seco, a etapa de eluição era realizada, e consistiu na passagem de 5,0 mL de metanol grau HPLC pelo mesmo. O líquido, contendo agora a MC-LR, foi seco por fluxo de N<sub>2</sub> (sistema apresentado da Figura 8), e após a secagem, finalmente ressuspendido com metanol ao volume final previamente calculado para obtenção do nível de concentração necessário para determinação pelo método cromatográfico. Estas soluções foram levadas ao cromatógrafo e, utilizando a equação da curva analítica, foi feito o cálculo da porcentagem de recuperação do analito.



**Figura 8 - Sistema de secagem por N<sub>2</sub>, constituído de: (A) cilindros de N<sub>2</sub>; (B) válvulas de controle da pressão e vazão do gás do cilindro; (C) válvulas de ajuste fino de vazão do gás para pontos independentes de amostra; (D) sistema de regulagem da altura das mangueiras; (E) bloco metálico de aquecimento.**

**Fonte: Autoria própria.**

#### 4.4 ENSAIOS COM EXTRATO DE MICROCISTINA-LR

Como o Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água (LTPA) desenvolve diversos estudos com microcistina-LR e, existindo a necessidade de quantificar esta toxina em extratos preparados a partir de células de cianobactérias cultivadas em laboratório, foram injetadas tais amostras no cromatógrafo, primeiramente nas condições já otimizadas e, após a verificação da existência de co-eluição com a toxina de interesse, partiu-se para o estudo com diferentes eluições gradiente, a fim de separar a toxina dos interferentes desconhecidos presentes na matriz. Foram testados no total 12 eluições gradiente, variando-se a proporção de fase móvel ao longo da corrida, mas mantendo-se os mesmos solventes (ACN e H<sub>2</sub>O com 0,05% de TFA), volume de injeção de 20 µL e vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> da condição já otimizada para o padrão em água ultrapura.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

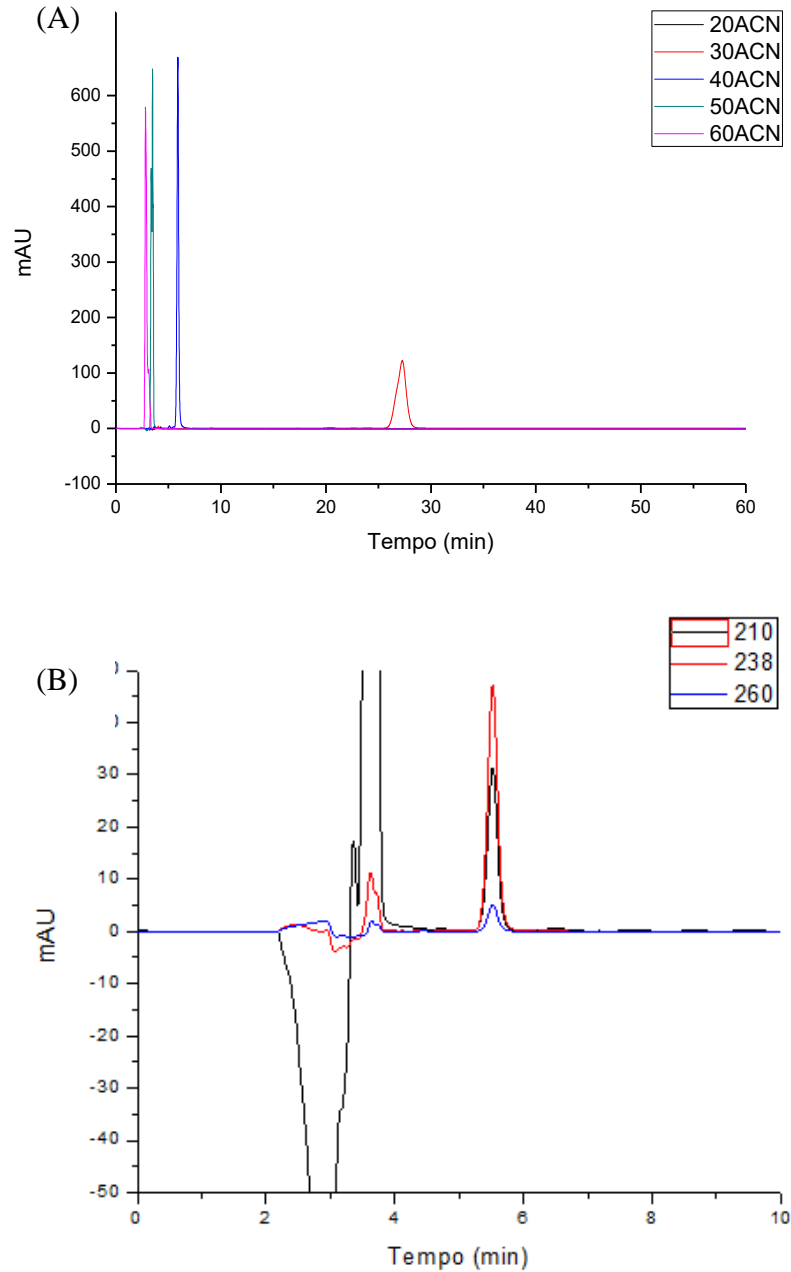
Em um primeiro momento, buscou-se na literatura estudos relacionados a determinação e quantificação de microcistina-LR. Os estudos foram selecionados de acordo com a coluna cromatográfica disponível no laboratório (Zorbax C-18 da Agilent - 250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) e uma fase móvel constituída de solventes relativamente comuns. A partir dessa premissa e dos resultados satisfatórios obtidos por Vilela (2009), o estudo realizado por este autor foi escolhido como base para a implementação do método cromatográfico, com algumas adaptações, tais como: o não controle da temperatura da coluna (por impossibilidade técnica do equipamento utilizado neste projeto) e o monitoramento em três comprimentos de onda (210, 238 e 260 nm) ao invés de apenas um (238 nm), obtendo-se assim mais uma garantia de que seria mesmo neste comprimento de onda que a microcistina-LR tem sua maior absorção.

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A primeira etapa da otimização consistiu em realizar uma medida espectrofotométrica, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis Cary-50, onde observou-se um pico de absorção máximo em 239,95 nm, muito próximo do comprimento de onda de 238 nm utilizado por vários autores na literatura, dando um indicativo de ser este o comprimento de onda que realmente deve ser utilizado para a análise com a toxina.

Em seguida, foram testadas eluições isocráticas com diferentes proporções de fase móvel, com o intuito de definir a melhor condição de análise para o equipamento utilizado. As variações testadas com o padrão de 125,0 mg L<sup>-1</sup> e 10,0 mg L<sup>-1</sup> foram as seguintes: 20:80, 30:70, 40:60, 50:50 e 60:40 de ACN:H<sub>2</sub>O e os resultados podem ser visualizados na Figura 9a. Na condição de 20:80 a microcistina-LR, após 60 minutos de análise não foi detectada, indicando que esta proporção não tem força suficiente para retirar o composto da coluna. Na proporção 30:70, a MC-LR apareceu com tempo de retenção ( $t_r$ ) de aproximadamente 30 minutos, o que foi considerado um tempo muito elevado para análise de um padrão, dificultando análises de rotina. Além disto, o sinal obtido nesta condição foi mais alargado do que os demais, demonstrando ter menor eficiência. Nas condições 50:50 e 60:40 de

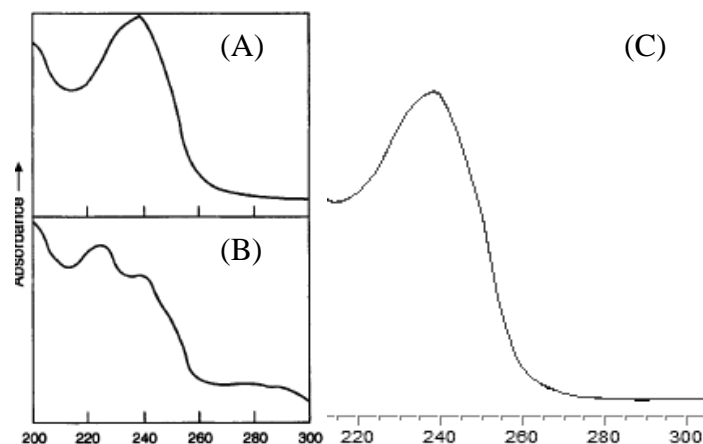
ACN:H<sub>2</sub>O, o analito foi removido junto com o volume morto. Portanto, a melhor condição, avaliada pelo  $t_r$  e pela área do pico, foi a de 40ACN:60H<sub>2</sub>O. O padrão de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de MC-LR, Figura 9b, eluiu em um  $t_r$  de 5,523 minutos e gerou uma área de 528,89 mAU\*s.



**Figura 9 - (A) Variações de FM testadas com o padrão de 125,0 mg L<sup>-1</sup>; e (B) sinal obtido com o padrão de microcistina-LR na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup> (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20  $\mu$ L; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  de 210 nm, 238 nm e 260 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

Uma ferramenta que foi utilizada para a correta identificação dos picos cromatográficos referentes à MC-LR foi o perfil de absorção na região ultravioleta. As microcistinas possuem dois perfis de absorção, um deles apresentando um máximo em 238 nm (caso da microcistina-LR e da maioria das microcistinas) e o outro, com absorção máxima em 222 nm (característico das microcistinas contendo triptofano) como pode ser visualizado na Figura 10a e 10b (LAWTON; EDWARDS; CODD, 1994). Na Figura 10c, tem-se o perfil de absorção da microcistina-LR obtido no presente trabalho, podendo-se observar um comportamento igual àquele já relatado na literatura para esta variante de microcistina. O perfil de absorção teve especial utilidade quando da injeção de amostras mais complexas, onde vários picos podiam ser visualizados. Isto porque o equipamento possui uma funcionalidade em que é possível selecionar, no software de análise dos cromatogramas, o pico desejado, e visualizar o seu perfil de absorção. Se este tem um comportamento igual ao do padrão de MC-LR, isto traz um indicativo de sua presença na amostra.

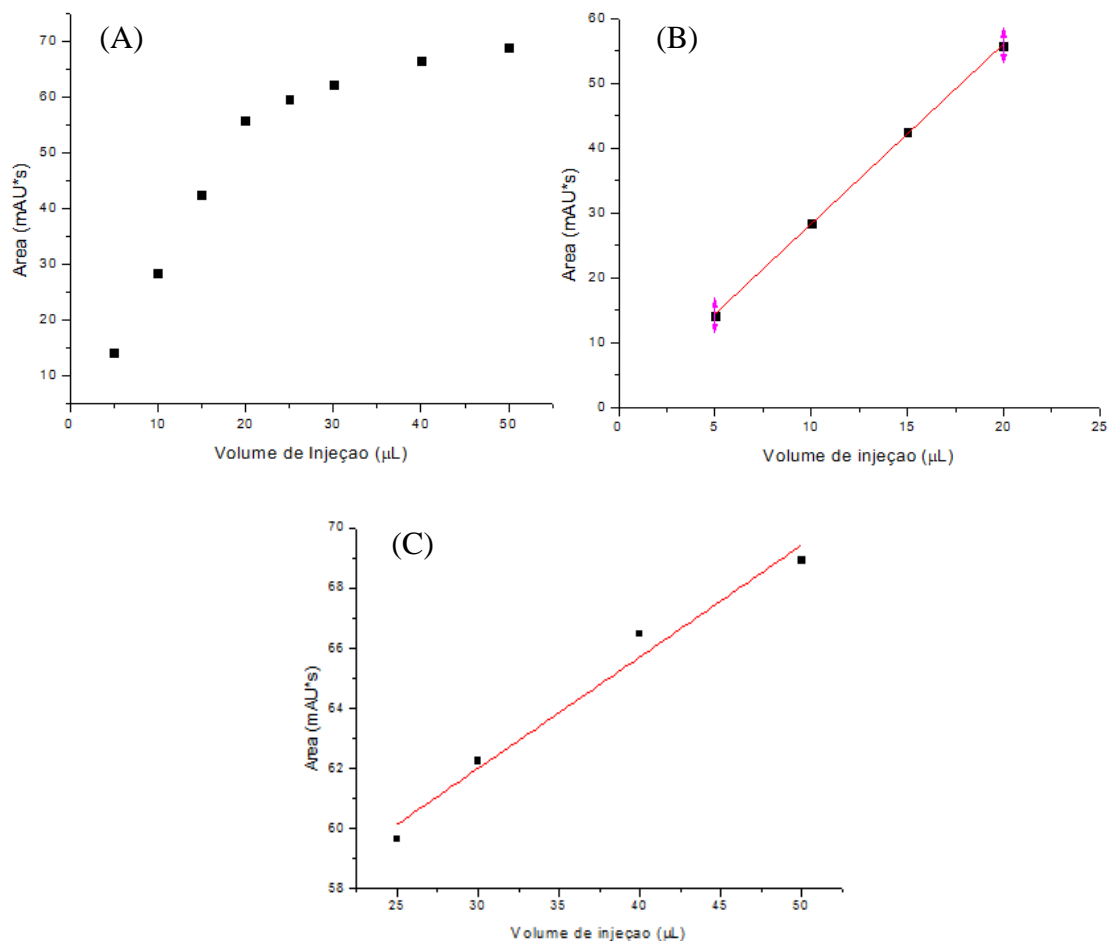


**Figura 10 - (A) Perfil de absorção da maioria das microcistinas, sendo neste exemplo a microcistina-LR; (B) Perfil de absorção das microcistinas que contém triptofano, no caso, a microcistina-WR; e (C) Perfil de absorção da microcistina-LR obtida no presente trabalho.**

**Fonte: adaptado de Lawton, Edwards e Codd (1994); HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

Após a definição da melhor proporção de fase móvel, foram testados oito volumes de injeção, com o padrão de MC-LR na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ : 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40 e  $50 \mu\text{L}$ , fixando-se aí a vazão em  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O melhor volume de injeção foi definido pela construção de um gráfico, que pode ser visualizado na Figura 11. No gráfico da Figura 11a podem ser visualizadas duas faixas lineares, uma para os volumes de 5 a  $20 \mu\text{L}$ , e a outra para os volumes de 25 a  $50 \mu\text{L}$ . A faixa linear dos volumes de 5 a  $20 \mu\text{L}$  demonstrou ter maior

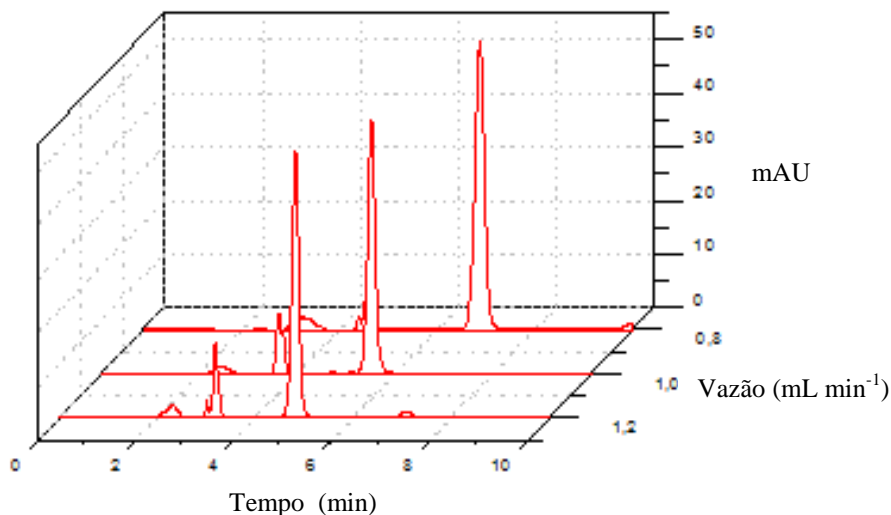
sensibilidade se comparada a faixa dos volumes de 25 a 50  $\mu\text{L}$ , isto graças a sua maior inclinação. Esta perda da sensibilidade nos volumes a partir de 25  $\mu\text{L}$  pode ser um indicativo de que está ocorrendo saturação da coluna cromatográfica, não havendo um acréscimo de resposta do equipamento proporcional ao maior volume de injeção. Para a confirmação da relação linear nas duas faixas de volumes testados, assim como as sensibilidades obtidas, foram construídos os gráficos da Figura 11(b e c). Na Figura 11b, através da relação entre os primeiros quatro volumes, obteve-se um coeficiente de correlação linear de 0,999 e sensibilidade de 2,773. Na Figura 11c foi observado um coeficiente de correlação linear de 0,967 e sensibilidade de 0,3718. Foi estabelecido assim 20  $\mu\text{L}$  como volume de injeção a ser utilizado no decorrer do trabalho, sendo este escolhido por ser o volume mais alto da faixa mais sensível obtida com os testes.



**Figura 11 – Relação entre volume de injeção e área com os volumes de 5  $\mu\text{L}$  a 50  $\mu\text{L}$  (A); ajuste linear entre os primeiros quatro volumes de injeção ( $R^2$  igual a 0,999) (B); e ajuste linear entre os quatro últimos volumes de injeção ( $R^2$  igual a 0,967) (C); (padrão de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de MC-LR).**

**Fonte: Autoria própria.**

Para a definição da melhor vazão foram testadas as condições de 0,8, 1,0 e 1,2 mL min<sup>-1</sup>, com um volume de injeção fixo de 20 µL e com o padrão de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Os cromatogramas podem ser visualizados na Figura 12.



**Figura 12 - Cromatogramas do padrão de MC-LR de 10,0 mg L<sup>-1</sup> nas vazões de 0,8, 1,0 e 1,2 mL min<sup>-1</sup> (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 µL; λ de 238 nm).**

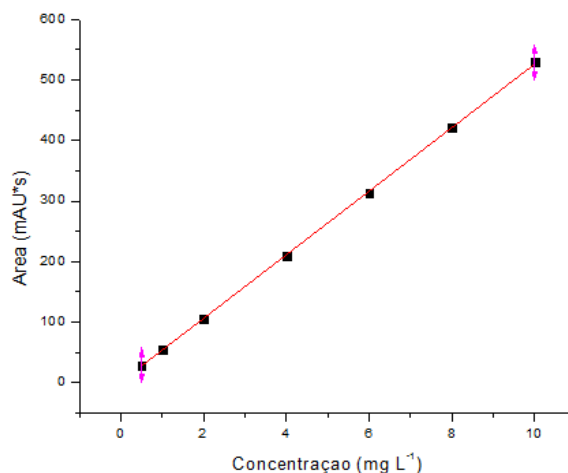
**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

Com a vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup> o *tr* foi o menor das três condições, sendo igual a 4,82 minutos. Para a condição de 0,8 mL min<sup>-1</sup> o *tr* foi igual a 6,87 minutos e para a vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> foi de 5,52 minutos. Como na vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup> o gasto com solvente é maior, o *tr* obtido com a condição de 1,0 mL min<sup>-1</sup> é considerado satisfatório, e a pressão gerada no equipamento é menor do que na vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, optou-se pela condição de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Além disso, esta também foi a vazão indicada por Vilela (2009), e por outros autores, conforme citado no Quadro 2. Desta forma, estabeleceu-se esta vazão como a ideal a ser utilizada ao longo do estudo.

## 5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para o estudo da validação, mais especificamente para os parâmetros linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e sensibilidade, primeiramente foi construída uma curva analítica com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> de MC-LR em água ultrapura e metanol.

A equação da reta obtida para esta curva, representada na Figura 13, foi igual a  $y = 1,453 + 52,49x$ , sendo obtido um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) acima de 0,99. Este valor de  $R^2$  demonstra que o método escolhido foi capaz de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, indicando uma tendência linear para esta faixa de trabalho.



**Figura 13 - Curva analítica ( $R^2$  igual a 0,9998) (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20  $\mu$ L; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  de 238 nm).  
Fonte: Autoria própria.**

O LQ estimado foi calculado através da Equação 5 (seção 3.4.6), sendo obtido o valor de 0,2767 mg L<sup>-1</sup>, ou aproximadamente 0,28 mg L<sup>-1</sup>.

Uma estimativa do limite de detecção (LD) também foi calculado através da equação da curva analítica obtida, fazendo-se uso da Equação 4 (seção 3.4.5), fornecendo um valor de 0,0913 mg L<sup>-1</sup>, ou aproximadamente 0,09 mg L<sup>-1</sup>. Este valor sugere um LD próximo a 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

Em função dos dados acima, estabeleceu-se uma nova faixa de trabalho para determinação dos valores de LD e LQ. As curvas analíticas de menores concentrações foram construídas utilizando as concentrações de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em intervalos de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Estas três curvas foram analisadas em dias diferentes, com padrões preparados no mesmo dia da análise. As equações obtidas com o ajuste linear dos pontos, para cada curva, podem ser visualizados na Tabela 2. Para a curva 1 da Figura 14a, o  $R^2$  foi de 0,9949, sendo a equação obtida igual a  $y = 0,8306 + 54,50x$ . Para a curva apresentada na Figura 14b, foi obtida uma equação igual a  $y = 1,603 + 55,41x$ , com um  $R^2$  de 0,9944. Para a curva presente na Figura 14c, uma equação igual a  $y = -0,6586 + 63,29x$  foi obtida, com um  $R^2$  igual a 0,9972. Com esta triplicata, foi possível determinar uma nova curva analítica, contendo a média e o desvio



padrão das medidas para cada concentração da faixa de trabalho testada, valores estes que podem ser visualizados na Tabela 2. A equação obtida pelo ajuste linear do gráfico construído com as médias foi igual a  $y = 0,9869 + 56,58x$ , com um  $R^2$  de 0,9979, demonstrando que o método é linear para a faixa de trabalho testada. A sensibilidade, de acordo com o DOQ-CGCRE-008, é o parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, e é representada pela inclinação da curva de regressão linear (INMETRO, 2003). Os valores de sensibilidade para cada curva construída também podem ser visualizados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Equações obtidas com o ajuste linear para cada curva analítica construída, com seus respectivos coeficientes de correlação linear e sensibilidades**

Curva	Equação linear	$R^2$	Sensibilidade
1	$y = 0,8306 + 54,50x$	0,9949	54,50
2	$y = 1,603 + 55,41x$	0,9944	55,41
3	$y = -0,6586 + 63,29x$	0,9972	63,29
Média	$y = 0,9869 + 56,58x$	0,9979	56,58

**Fonte: Autoria própria.**

Na Tabela 3 podem ser visualizados os valores de área obtidos para cada concentração utilizada na construção das curvas analíticas presentes na Figura 14, juntamente com a média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) de cada concentração testada. O coeficiente de variação dá uma estimativa, em porcentagem, da dimensão do desvio padrão em relação à média. Coeficientes de variação mais altos indicam que o desvio padrão tem um efeito significativo em relação à média obtida. Pode-se perceber na Tabela 3 que coeficientes de variação mais altos foram obtidos para as concentrações mais baixas e para as concentrações mais altas (variações maiores nas extremidades).

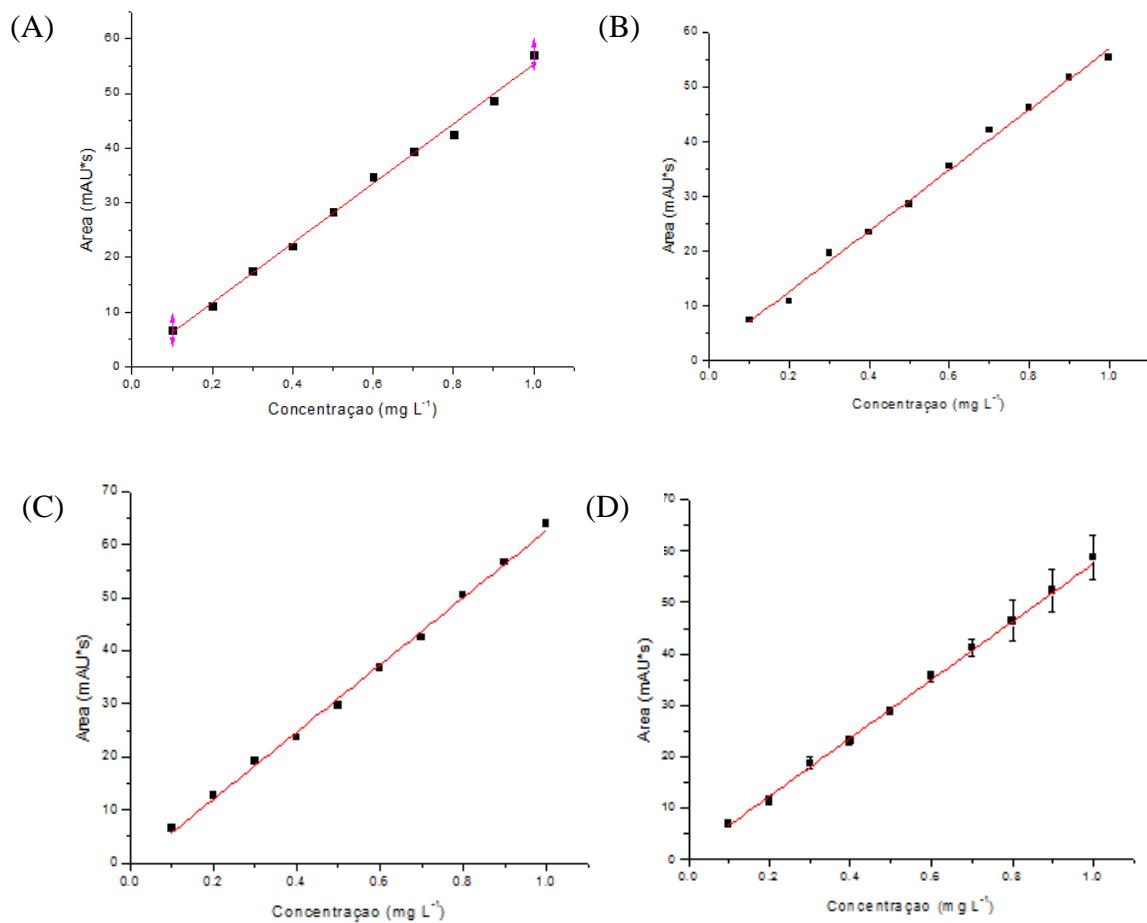


Figura 14 - Curvas analíticas 1 (A) 2 (B) 3 (C) e curva analítica construída com a média e desvio padrão da triplicata (D) nas concentrações de 0,1 mg L<sup>-1</sup> a 1,0 mg L<sup>-1</sup> (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 238 nm).

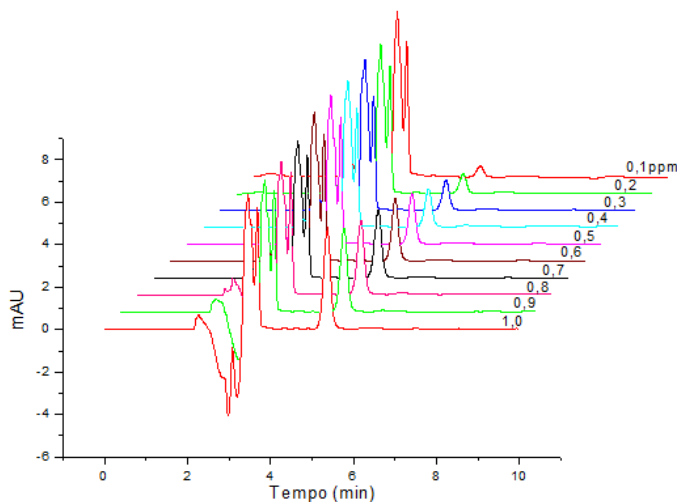
Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Valores de área obtidos para as curvas analíticas entre 0,1 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) obtidos para cada concentração

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Área (mAU.s)			Média (mAU.s)	Desvio padrão (mAU.s)	CV (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0,1	6,72261	7,36598	6,45723	6,84861	0,467293	6,82
0,2	11,14542	10,81621	12,62991	11,53051	0,966230	8,38
0,3	17,45123	19,64398	19,12765	18,74095	1,146381	6,12
0,4	22,08361	23,42418	23,66782	23,05854	0,853054	3,70
0,5	28,32067	28,58653	29,57355	28,82692	0,660126	2,28
0,6	34,79300	35,50366	36,72654	35,67440	0,978012	2,75
0,7	39,31663	42,11766	42,45554	41,29661	1,723015	4,17
0,8	42,49685	46,26042	50,42877	46,39535	3,967681	8,55
0,9	48,60886	51,72867	56,58037	52,30597	4,016988	7,68
1,0	57,12628	55,34783	63,85649	58,77804	4,49004	7,64

Fonte: Autoria própria.

O acréscimo na resposta do equipamento com o aumento da concentração de microcistina-LR, correspondente à curva de calibração da Figura 14a, pode ser visualizada na Figura 15.



**Figura 15 - Acréscimo na resposta do equipamento com o aumento da concentração de microcistina-LR injetada no HPLC-DAD (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20  $\mu$ L; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  de 238 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

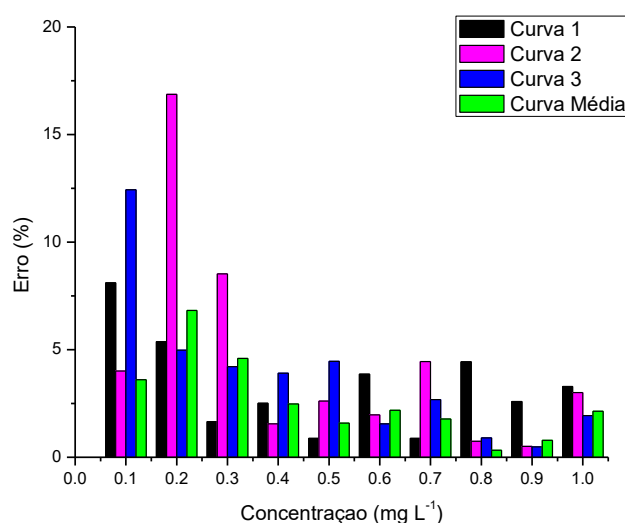
Para se determinar o erro obtido com a construção das curvas analíticas da Figura 14, foi utilizado o procedimento já citado anteriormente. Utilizando-se o valor da área do ponto de 0,5 mg L<sup>-1</sup> da curva 1, igual a 28,32067 mAU\*s, na equação da curva 1 ( $y = 0,8306 + 54,50x$ ), obtem-se como concentração o valor de 0,50438 mg L<sup>-1</sup>. Fazendo a diferença entre o valor de 0,50438 e o de 0,5, obtem-se o valor de 0,00438 mg L<sup>-1</sup>. Considerando o valor de 0,5 mg L<sup>-1</sup> como 100%, tem-se que esta diferença equivale a um erro de 0,88%. Este procedimento foi repetido para todos os pontos, obtendo-se os valores da Tabela 4.

**Tabela 4 - Erro calculado para as curvas 1, 2, 3 e a curva média**

Concentração ( mg L <sup>-1</sup> )	Curva 1 (%)	Curva 2 (%)	Curva 3 (%)	Curva Média (%)
0,1	8,11	4,01	12,4	3,61
0,2	5,37	16,9	4,98	6,82
0,3	1,65	8,53	4,21	4,60
0,4	2,51	1,55	3,91	2,47
0,5	0,88	2,61	4,46	1,59
0,6	3,86	1,97	1,55	2,18
0,6	0,88	4,45	2,68	1,78
0,8	4,44	0,74	0,90	0,32
0,9	2,60	0,51	0,49	0,78
1,0	3,29	3,01	1,94	2,14

**Fonte: Autoria própria.**

Com os dados da Tabela 4, foi possível a construção do gráfico da Figura 16, onde nota-se uma tendência de diminuição do erro com o aumento da concentração de padrão utilizado. Isto pode ser resultado do fato de que, em concentrações muito pequenas, erros durante a preparação da solução padrão, como perda de volume ou variações do volume aferido com uma micropipeta afetam de forma mais pronunciada a concentração final de uma solução em concentrações muito baixas.



**Figura 16 - Erros obtidos para as curvas 1, 2, 3 e curva média.**  
**Fonte: Autoria própria.**

Utilizando o coeficiente angular e linear da curva analítica da Figura 14d, construída com a média das áreas obtidas com a triplicata, o LD pôde ser estabelecido, através da Equação 3, sendo obtido o valor de  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ .

O LQ foi definido através da Equação 4, utilizando-se o mesmo coeficiente angular e linear do LD, sendo obtido o valor de  $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 5.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Para a realização dos ensaios por extração em fase sólida, foram preparadas primeiramente duas soluções com água ultrapura, contendo 0,8 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de MC-LR, sendo os ensaios realizados como descrito na seção 4.3.

Tomando-se como base os estudos conduzidos por Sanches *et al.* (2007), o condicionamento dos cartuchos SampliQ<sup>®</sup> C-18 (volume de 3 mL, 500 mg de adsorvente) foram feitos com 5 mL de metanol grau HPLC e 5 mL de água ultrapura. A segunda etapa consistiu na passagem de 100 mL das soluções de 0,8 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de MC-LR pelos cartuchos de SPE. A bomba a vácuo foi mantida ligada por aproximadamente 30 minutos a fim de realizar a etapa de secagem dos cartuchos, quando então a toxina foi eluída com 5 mL de metanol para dentro de tubos de vidro. O solvente em excesso foi removido por completo utilizando-se um fluxo suave de nitrogênio e, após isto, a toxina foi ressuspensa com 0,5 mL de metanol. Estas soluções foram analisadas no equipamento de HPLC-DAD, porém nenhum pico cromatográfico gerado durante a corrida apresentou um perfil de absorção correspondente à toxina, indicando assim que esta não estava presente na solução ou estava presente em concentrações muito baixas, não podendo ser detectada. Devido a este resultado negativo, testou-se novamente o mesmo método de extração, mas variando-se o volume de amostra passada pelo cartucho (200 mL e 300 mL), além do volume de metanol utilizado para realizar a ressuspensão (300  $\mu\text{L}$  e 400  $\mu\text{L}$ ). O objetivo ao passar um maior volume de amostra e ressuspender a MC-LR em um menor volume de metanol era concentrar a toxina, a fim de que seu sinal pudesse ser detectado no equipamento. Porém, novamente não foi obtido sinal da toxina durante as corridas cromatográficas.

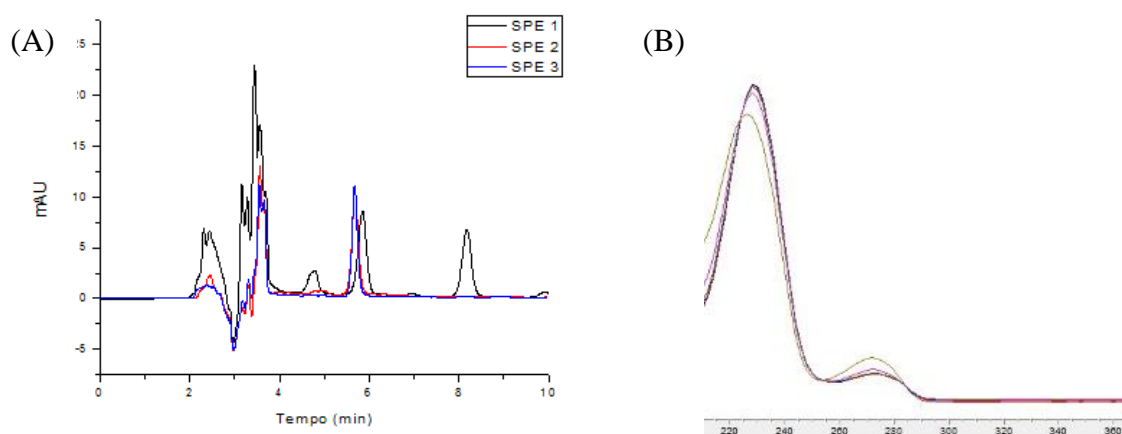
A terceira tentativa consistiu em preparar 2 litros de uma solução de 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de MC-LR, a fim de preparar uma triplicata, passando-se 500 mL desta solução por cada cartucho C-18. A recuperação foi feita com 0,5 mL de metanol, de modo a concentrar a solução mil vezes. Inserindo os valores na curva analítica da Figura 13,  $y = 1,453 + 52,49.x$ , onde  $y$  é a área do pico e  $x$  a concentração, foram obtidos os resultados da triplicata demonstrados na Tabela 5. O padrão de 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  utilizado para a preparação da solução de 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  também foi injetado, com o intuito de verificar a concentração do mesmo. A área obtida para o padrão foi de 556,91058 mAU.s, o que corresponde a uma concentração de 10,58  $\text{mg L}^{-1}$ , demonstrando assim estar em uma concentração adequada. Era esperado que a concentração final das soluções obtidas a partir de SPE ficassem em torno de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , porém

concentrações maiores foram obtidas. Os picos cromatográficos tiveram tempos de retenção similares ao do padrão (em torno de 5,6 minutos), como pode ser visualizado na Figura 17a, porém o perfil de absorção foi modificado (Figura 17b), o que pode indicar que houve co-eluição de algum outro composto no mesmo tempo de retenção da MC-LR. As três amostras foram preparadas simultaneamente, porém, mesmo utilizando-se o mesmo sistema de preparação, um dos cartuchos apresentou problemas com a secagem, demonstrando não estar completamente seco mesmo após 30 minutos com a bomba à vácuo ligada, o que também pode ter afetado negativamente os resultados obtidos.

**Tabela 5 - Concentrações do teste com solução de MC-LR realizado em triplicata, obtidas através dos ensaios por SPE com cartuchos SampliQ<sup>®</sup> C-18 (volume de 3 mL, 500 mg de adsorvente), Agilent**

Amostra	Área (mAU.s)	Pureza	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
SPE 1	210,34084	994,121	3,98	398
SPE 2	106,84481	996,627	2,01	201
SPE 3	97,42604	933,594	1,83	183

Fonte: Autoria própria.



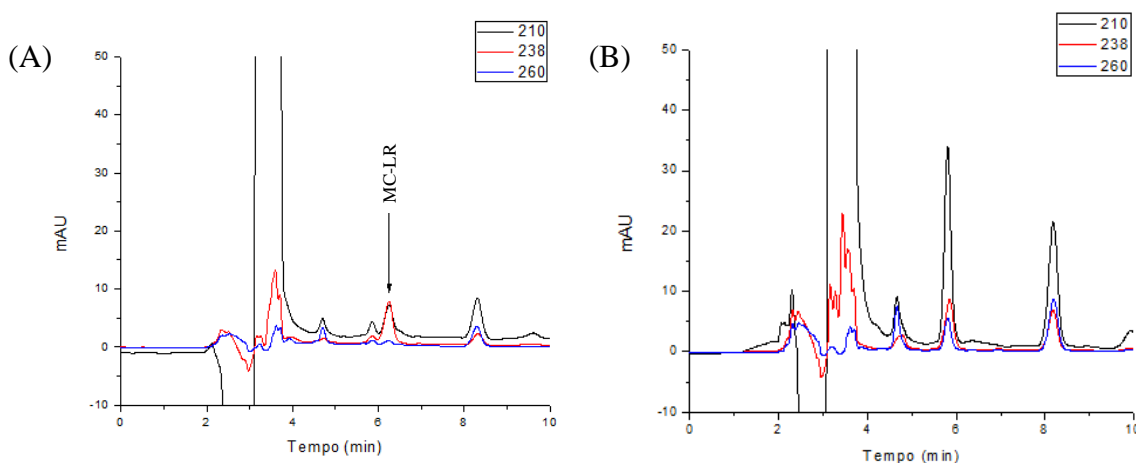
**Figura 17 - (A) Cromatograma da recuperação por SPE da MC-LR testando-se cartuchos SampliQ<sup>®</sup> C-18 (volume de 3 mL, 500 mg de adsorvente) e (B) perfil de absorção do pico cromatográfico, de mesmo tempo de retenção do padrão (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20  $\mu$ L; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  de 238 nm).**

Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.

Como não foram obtidos resultados satisfatórios na etapa anterior, sendo obtidas concentrações maiores do que a esperada, uma nova tentativa foi feita, modificando-se desta vez o cartucho utilizado. Nesta etapa optou-se por utilizar cartuchos CHROMABOND<sup>®</sup> C-18 ec (end-capped), com tamanho de partícula de 45  $\mu$ m.

O processo de capeamento ou *endcapping*, tem por objetivo reduzir o número de grupos silanóis residuais ou outros hidróxidos da superfície da sílica utilizada como fase estacionária. Isto aumenta o recobrimento do suporte e também a hidrofobicidade da mesma, o que afeta, por consequência, a interação do analito com o material do cartucho. O capeamento é feito através de uma reação de silanização com um ou mais organossilanos de tamanho reduzido, tais como trimetilclorossilano (TCMS) e/ou hexametildissilazano (HDMS) (SILVA, 2013).

Testou-se também eluir a toxina com metanol, e metanol contendo 0,1% TFA (v/v). Para tanto, foi preparado um litro de solução contendo  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  de MC-LR. Passou-se 500 mL da solução em cada cartucho, sendo a eluição realizada em um dos cartuchos com 5 mL de metanol e no outro com 5 mL de metanol e 0,1% TFA, e a ressuspensão foi feita com 0,5 mL de metanol. Como a toxina estaria sendo concentrada em mil vezes, esperava-se que a mesma gerasse uma concentração final próxima de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Os cromatogramas podem ser visualizados na Figura 18. A amostra que foi preparada utilizando-se somente metanol na etapa de eluição gerou um resultado satisfatório (Figura 18a), já que a concentração obtida foi de  $1,9771 \text{ mg L}^{-1}$ , correspondendo a uma recuperação de 98,85%. A amostra eluída com metanol e 0,1% TFA (Figura 18b) não gerou nenhum pico correspondente à toxina. Pode-se visualizar que neste cromatograma, os picos presentes demonstraram ter uma absorção maior em 210 nm, o que não é visualizado para a MC-LR.



**Figura 18 - Cromatogramas das recuperações por extração em fase sólida da microcistina-LR testando-se cartuchos CHROMABOND<sup>®</sup> C-18 ec (end-capped) e eluição com metanol (A) e com metanol e 0,1% TFA (B) (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ ; vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 210, 238 e 260 nm).**

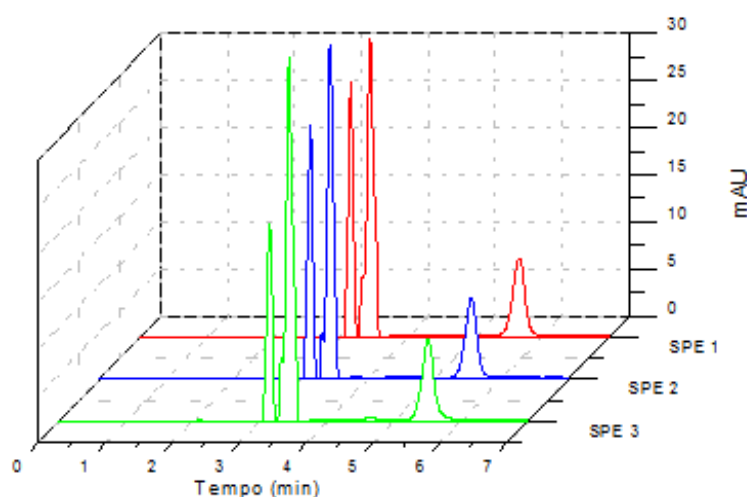
**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

Devido ao resultado satisfatório obtido nos testes utilizando o cartucho end-capped, com eluição feita somente com metanol, a próxima etapa consistiu em preparar uma triplicata, repetindo todo o processo, para garantir assim que a metodologia testada realmente estaria gerando bons resultados. As concentrações obtidas para esta triplicata, juntamente com as respectivas recuperações, podem ser visualizadas na Tabela 6. Pode-se perceber que a metodologia testada gerou bons resultados novamente, sendo esta estabelecida como procedimento a ser seguido quando da necessidade de concentrar amostras contendo MC-LR. Os cromatogramas obtidos para a triplicata podem ser visualizados na Figura 19.

**Tabela 6 - Concentrações e respectivas recuperações da MC-LR nos testes com cartuchos CHROMABOND® C-18 ec (end-capped)**

Amostra	Área (mAU.s)	Pureza	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
SPE 1	104,88605	997,435	1,97	98,51
SPE 2	101,99787	999,401	1,91	95,76
SPE 3	107,75868	997,705	2,02	101,3
			<b>Média ± Desvp</b>	<b>98,51 ± 2,74</b>

Fonte: Autoria própria.



**Figura 19 - Cromatogramas das recuperações por extração em fase sólida da microcistina-LR (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 238 nm).**

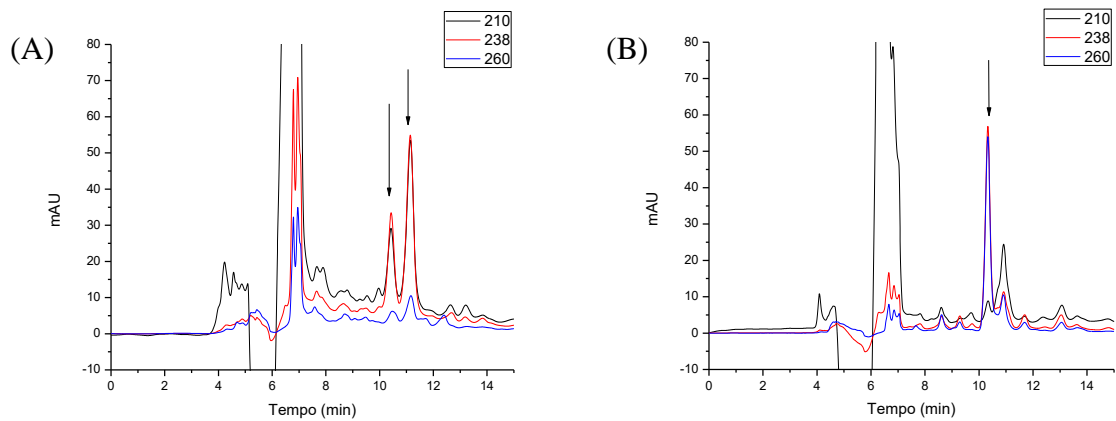
Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.



#### 5.4 ENSAIOS COM EXTRATO DE MICROCISTINA-LR

No Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água (LTPA), vários estudos envolvendo cianotoxinas são realizados e em muitos casos, a toxina quantificada é obtida a partir de um meio contendo células de cianobactérias cultivadas em laboratório, tendo-se portanto, um extrato pré-purificado. Por não ser uma solução padrão, outros compostos além de variantes de microcistina (não definidas) podem estar presentes e interferir a quantificação a partir de análises cromatográficas. Dessa forma, o objetivo nesta etapa do estudo foi averiguar se a técnica cromatográfica já otimizada era aplicável a esta amostra mais complexa e, se seria possível, também quantificar a microcistina-LR, caso esta esteja presente na amostra. É importante salientar que, devido ao extrato ser preparado de um cultivo de cianobactérias, há a possibilidade de se obter, no final de todo o processo de extração, uma solução que não contem toxina. Isto ocorre pois não é sempre que as cianobactérias presentes no cultivo irão produzir e estocar as cianotoxinas, pelo menos não em concentrações apreciáveis.

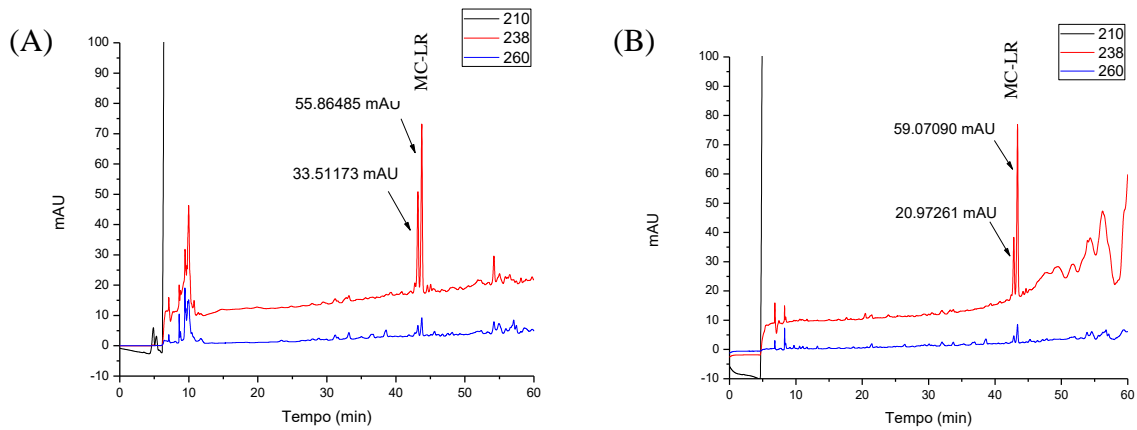
Os cromatogramas obtidos para os extratos 1 e 2 (a partir de procedimentos de extração em períodos distintos) podem ser visualizados na Figura 20. A condição cromatográfica utilizada foi a mesma já otimizada com os testes realizados com o padrão em água ultrapura e metanol (FM 60H<sub>2</sub>O:40ACN, 20 µL de injeção, 1,0 mL min<sup>-1</sup>). Na Figura 20a notou-se a existência de dois picos (indicados por flechas) que possuíam um perfil de absorção similar ao da MC-LR. O cromatograma da Figura 20b apresentou um pico com alta intensidade (aproximadamente 60 mAU), mas que não possuía o mesmo perfil de absorção da toxina, assim como nenhum dos picos gerados durante a corrida desta amostra. Esta análise trouxe um primeiro indicativo da existência da toxina no extrato 1, e de sua inexistência no extrato 2.



**Figura 20 - Cromatograma do extrato 1 (A), onde dois picos com perfis de absorção similares ao da MC-LR estão indicados por flechas; e cromatograma do extrato 2 (B) (FM 40ACN:60H<sub>2</sub>O com 0,05% TFA; volume de injeção de 20  $\mu$ L; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  de 210, 238 e 260 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

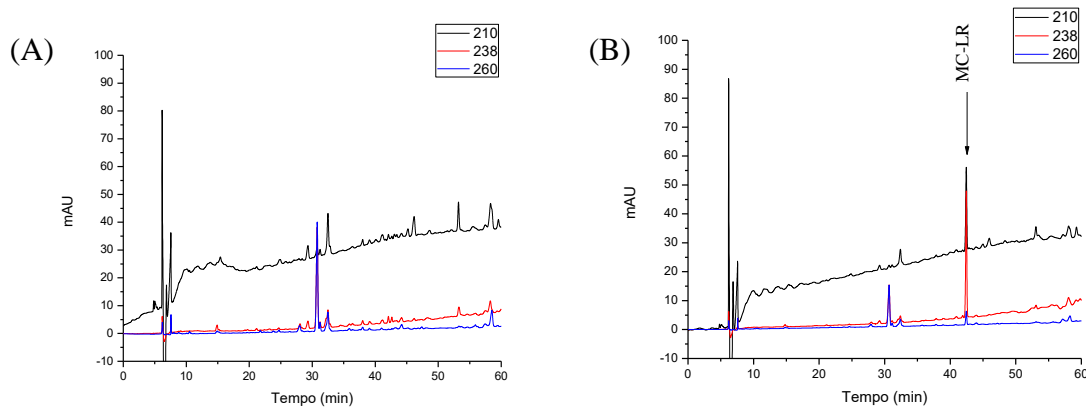
Para confirmação destas conclusões, optou-se por utilizar o método de fortificação, onde uma concentração conhecida do padrão é adicionada às amostras. Nesta etapa do estudo também se optou por começar a testar diferentes eluições gradiente, pois os picos presentes no extrato 1, sendo um deles provavelmente gerado pela MC-LR, estava co-eluindo com outro. Os cromatogramas apresentados nas Figuras 21 e 22 foram obtidos já se testando um primeiro gradiente (5%ACN:95%H<sub>2</sub>O até 60%ACN:40%H<sub>2</sub>O em 60 minutos) para o extrato 1 e o extrato 2, respectivamente. Com a fortificação do extrato 1, esperava-se que o pico referente à MC-LR mantivesse aproximadamente a mesma intensidade, e que os outros picos tivessem suas intensidades reduzidas. Pela intensidade demonstrada nos cromatogramas da Figura 21, percebe-se que este foi realmente o caso, confirmando assim o pico mais intenso como referente à toxina.



**Figura 21 - Cromatogramas do extrato 1 sem fortificação (A) e fortificado (50% extrato 1 e 50% padrão de MC-LR 10 mg L<sup>-1</sup>) (B) (FM 5%ACN:95%H<sub>2</sub>O até 60%ACN:40%H<sub>2</sub>O em 60 minutos; volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 210, 238 e 260 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

O cromatograma do extrato 2, que pode ser visualizado na Figura 22a, apresentou um pico intenso em aproximadamente 30 minutos, sendo que foi confirmado que este não era a MC-LR pois na fortificação, Figura 22b, o pico referente à toxina apresentou um tempo de retenção maior que 40 minutos (indicado pela flecha).



**Figura 22 - Cromatogramas do extrato 2 sem fortificação (A) e fortificado (50% extrato 2 e 50% padrão de MC-LR 10,0 mg L<sup>-1</sup>) (B) (FM 5%ACN:95%H<sub>2</sub>O até 60%ACN:40% H<sub>2</sub>O em 60 minutos; volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 210, 238 e 260 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

Todas as eluições gradiente que foram testadas, com o intuito de separar os dois picos existentes no cromatograma do extrato 1, além do tempo de retenção obtido para a toxina em cada caso, estão resumidas na Tabela 7.

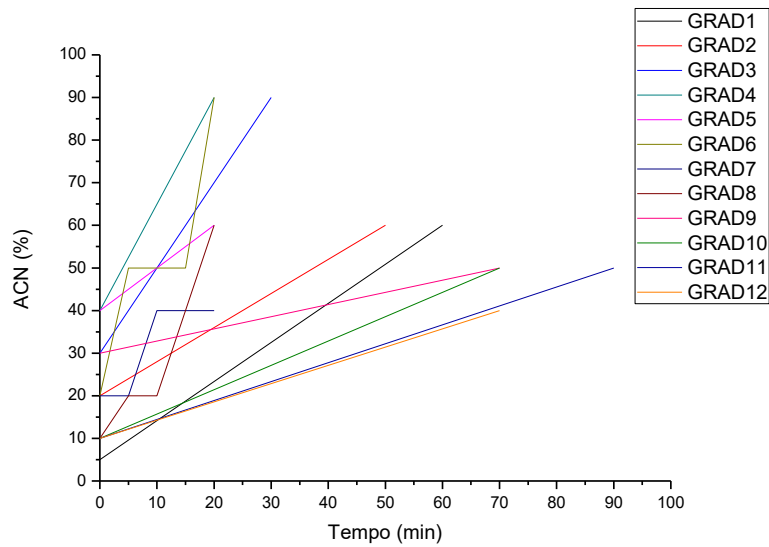
**Tabela 7 - Eluições gradiente testadas para análise do extrato 1 e os respectivos tempos de retenção obtidos para a MC-LR**

<b>Eluição gradiente</b>	<b>Condição (% ACN:H<sub>2</sub>O e tempo)</b>	<b>Tempo de retenção MC-LR (min)</b>
1	5:95 até 60:40 em 60 minutos	43,0
2	20:80 até 60:40 em 50 minutos	26,7
3	30:70 até 90:10 em 30 minutos	9,4
4	40:60 até 90:10 em 20 minutos	4,9
5	40:60 até 60:40 em 20 minutos	5,1
6	20:80 até 50:50 em 5 minutos, 50:50 de 5 até 15 minutos, 50:50 até 90:10 de 15 a 20 minutos	8,2
7	20:8 em 5 minutos, de 20:80 até 40:60 de 5 até 10 minutos, de 40:60 de 10 a 20 minutos	15,2
8	10:90 até 20:80 em 5 minutos, 20:80 de 5 a 10 minutos, 20:8 de 10 a 20 minutos	19,8
9	30:70 até 50:50 em 70 minutos	17,8
10	10:90 até 50:50 em 70 minutos	59,2
11	10:90 até 50:50 em 90 minutos	69,0
12	10:90 até 40:60 em 70 minutos	69,6

**Fonte: Autoria própria.**

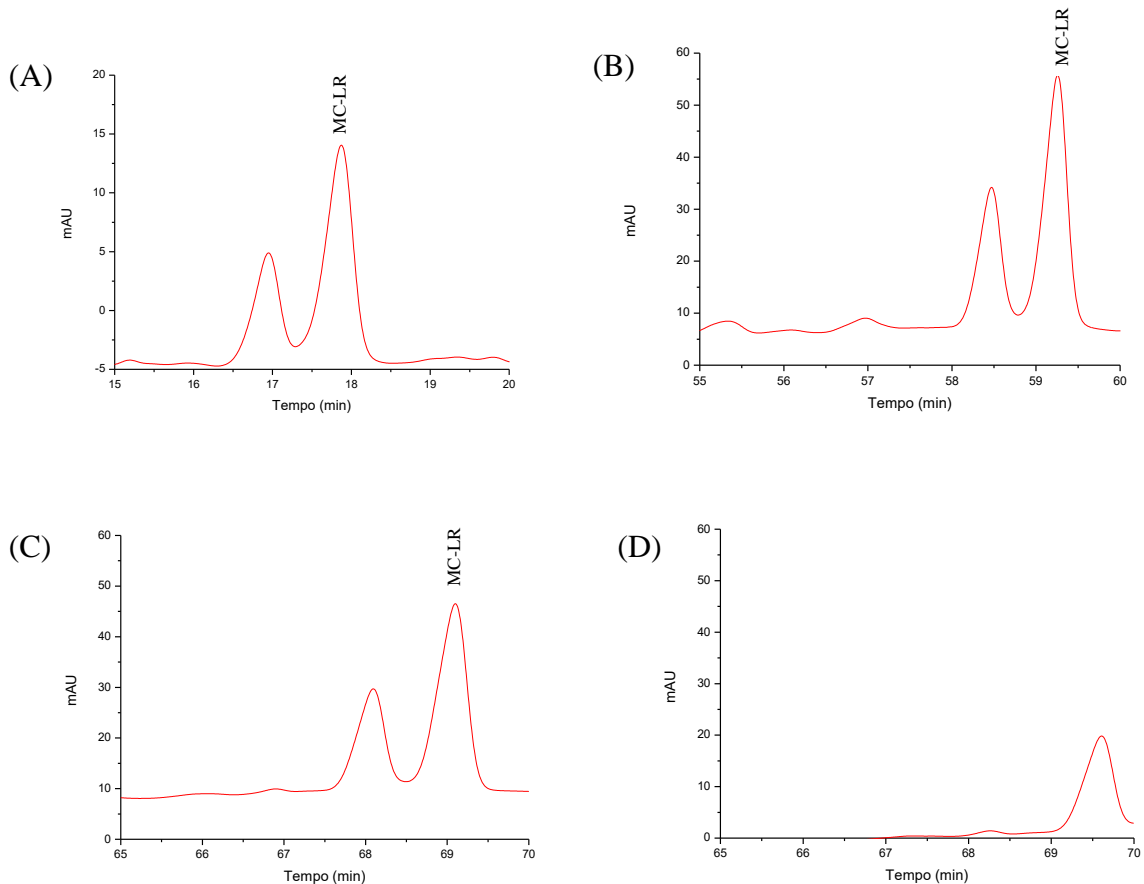
As diferentes eluições gradiente testadas também podem ser visualizadas na Figura 23, em que são demonstradas as diversas proporções e variações utilizadas, na tentativa de separar o pico co-eluído com a MC-LR.

Pelos cromatogramas apresentados na Figura 24, percebe-se que nas condições com variações mais lentas, caracterizadas pela menor variação de FM em um tempo mais longo, a MC-LR demorou a sair da coluna cromatográfica, tendo tempos de retenção maiores do que 55 minutos (Figura 24b, c e d), sem no entanto separar completamente os dois picos. Na Figura 24a (A) tem-se o cromatograma referente à eluição gradiente 9 (Tabela 7), que demonstrou ser a condição que melhor separou os picos, sem ter um tempo de retenção tão elevado como obtido nas condições 10, 11 e 12.



**Figura 23 - Eluições gradiente testadas, demonstrando o tempo de variação da condição, em minutos, pela porcentagem de ACN utilizada (Y), onde a respectiva proporção de H<sub>2</sub>O na fase móvel é dada por (100-Y).**

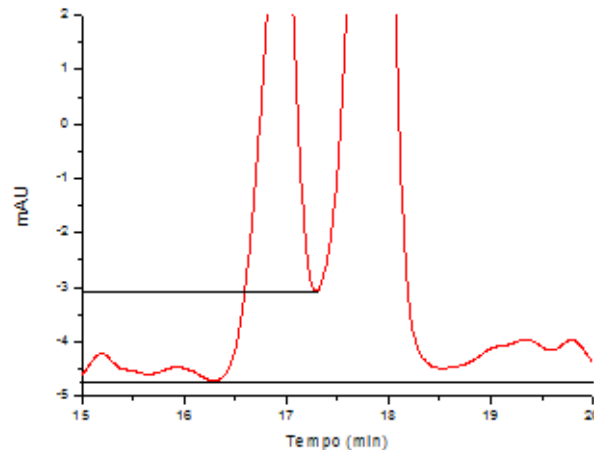
**Fonte: Autoria própria.**



**Figura 24 - Cromatogramas do extrato 1 com a eluição gradiente 9 (30:70 a 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O em 70 minutos) (A), gradiente 10 (10:90 a 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O em 70 minutos) (B), gradiente 11 (10:90 a 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O em 90 minutos) (C) e gradiente 12 (10:90 a 40:60 ACN:H<sub>2</sub>O em 70 minutos) (D) (volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 238 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

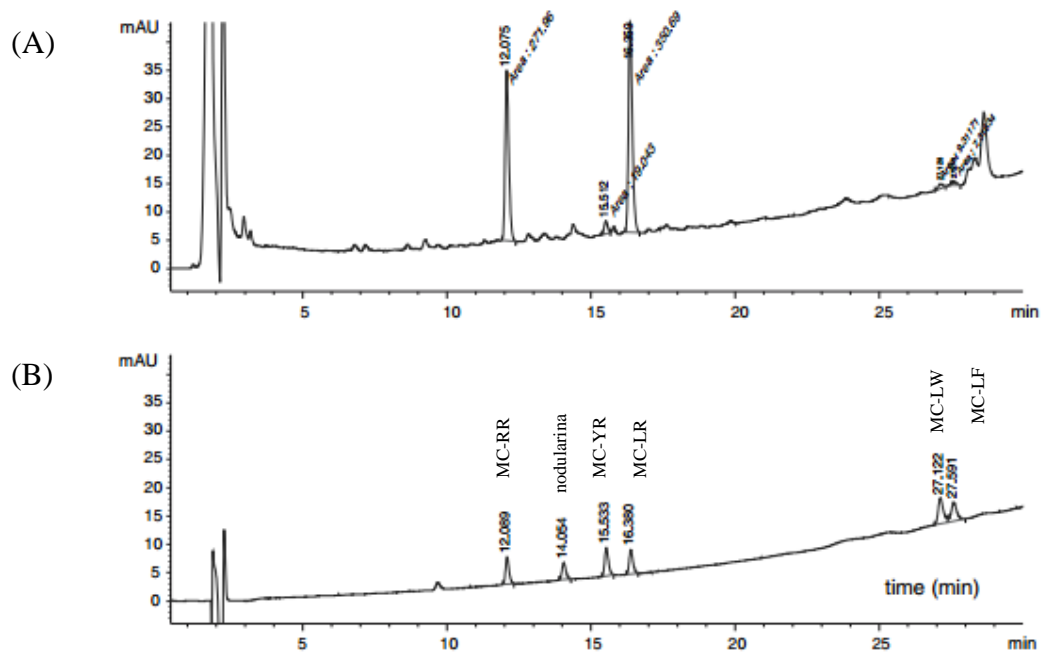
A condição 9 (30:70 até 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O em 70 minutos) foi considerada a mais adequada para se utilizar com o extrato, já que a diferença entre a linha considerada como linha base, e o ponto de mínimo entre os dois picos foi a menor de todas as outras testadas, sendo igual a aproximadamente 2 mAU, como pode ser visualizada na Figura 25.



**Figura 25 - Cromatograma do extrato 1 com a eluição gradiente 9, indicando a diferença entre a linha base e o ponto de mínimo entre os dois picos cromatográficos (volume de injeção de 20  $\mu$ L; vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ ;  $\lambda$  de 238 nm).**

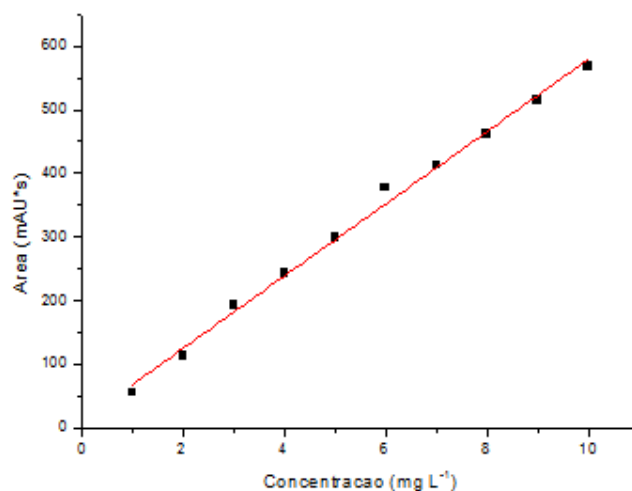
**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

Suspeitou-se de que o pico existente nos cromatogramas do extrato 1, co-eluído com a MC-LR, pudesse ser outra toxina produzida pelas cianobactérias do meio de cultivo utilizado. Por isto, buscou-se na literatura dados de qual cianotoxina comumente elui próxima e anteriormente à MC-LR. Na Figura 26a pode ser visualizado os cromatogramas referentes à análise de um extrato de cianobactérias contendo cianotoxinas, e na Figura 26b a injeção de vários padrões, respectivamente, MC-RR, nodularina, YR, LR, LW e LF. Os cromatogramas foram obtidos com um HPLC-DAD utilizando uma coluna Supelcosil ABZ + Plus (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) com uma eluição gradiente composta de (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA e (B) ACN + 0,1% TFA (gradiente linear onde a fase B variou de 20% a 59% de 0 até 30 minutos), vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$  e monitoramento em 238 nm (BLÁHOVÁ *et al*, 2007). Pode-se perceber por estes cromatogramas que a cianotoxina que elui anteriormente à toxina MC-LR ( $t_r$  16,360 min), é a variante contendo tirosina (Y) e arginina (R), denominada de MC-YR ( $t_r$  15,533 min). Esta variante de cianotoxina, juntamente com a -LR e a -RR, está entre os análogos mais tóxicos e de aparecimento mais frequente (SANTOS; BRACARENSE, 2008).



**Figura 26 – Cromatogramas em 238 nm, de um extrato de água contendo cianobactérias (A) e padrões, respectivamente, de MC-RR, nodularina, YR, LR, LW e LF (B).  
Fonte: Retirado de Bláhová *et al.*, (2007).**

Com o intuito de poder quantificar a MC-LR nos extratos produzidos no LTPA, foram construídas curvas de calibração utilizando a eluição gradiente 9, nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente para os testes com padrão em água ultrapura e metanol. A curva obtida para as concentrações entre 1,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> de MC-LR em água ultrapura e metanol, que pode ser visualizada na Figura 27, foi igual a  $y = 12,46 + 56,67x$ , e apresentou um R<sup>2</sup> de 0,9942. Com esta equação e tendo sido obtida uma área de 415,02 mAU.s para o extrato 1 com a eluição gradiente 9, determinou-se a estimativa da concentração de MC-LR desta preparação, igual a 7,10 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 27 - Curva de calibração utilizando-se o gradiente 9, nas concentrações de 1,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> com variação de 1,0 em 1,0 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> de 0,9942) (volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 238 nm).**

**Fonte: Autorial própria.**

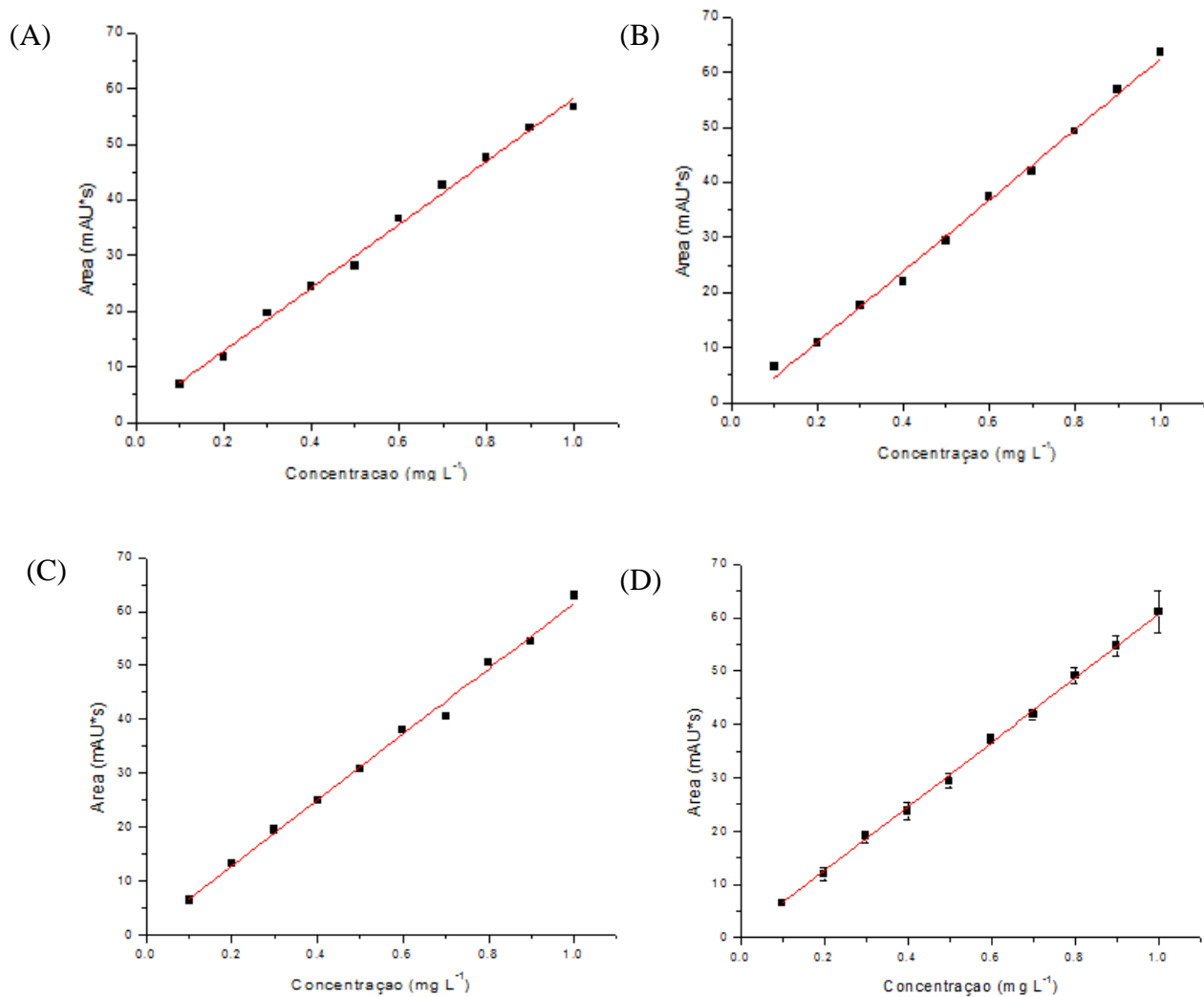
Na Figura 28 estão representadas as curvas de menor concentração, que variaram de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de MC-LR em água ultrapura e metanol, tendo sido preparadas soluções independentes para cada curva testada. Para a curva 1 foi obtida uma equação de  $y = 1,442 + 56,87x$ , com um R<sup>2</sup> de 0,9948. O ajuste linear para os pontos da curva analítica 2, presente na Figura 28b, foi igual a  $y = -1,888 + 64,39x$ , com um R<sup>2</sup> de 0,9962. Para a curva 3, o ajuste obtido foi igual a  $y = 0,5361 + 61,12x$ , com um R<sup>2</sup> de 0,9952. Com esta triplicata, foi possível a construção de uma quarta curva, com os valores da média e desvio padrão para cada concentração testada. O ajuste linear para esta curva gerou um resultado igual a  $y = 0,5239 + 60,18x$ , com um R<sup>2</sup> de 0,9989, demonstrando assim que o método é linear, dentro da faixa de trabalho testada. As equações obtidas, juntamente com as sensibilidades podem ser visualizadas na Tabela 8. A sensibilidade média obtida foi igual a 60,18 para o método empregando eluição gradiente, enquanto que o método isocrático, exemplificado anteriormente, apresentou uma sensibilidade média de 56,58. Quanto maior o valor obtido, mais sensível é considerado o método utilizado. Portanto, a metodologia empregando eluição gradiente demonstrou ser mais sensível do que a que empregou eluição isocrática.



**Tabela 8 - Equações obtidas com o ajuste linear para cada curva analítica construída, com seus respectivos coeficientes de correlação linear e sensibilidades**

Curva	Equação linear	R <sup>2</sup>	Sensibilidade
1	$y = 1,442 + 56,87x$	0,9948	56,87
2	$y = -1,888 + 64,39x$	0,9962	64,39
3	$y = 0,5361 + 61,12x$	0,9952	61,12
Média	$y = 0,5239 + 60,18x$	0,9989	60,18

Fonte: Autoria própria.



**Figura 28 - Curvas analíticas 1 (A) 2 (B) 3 (C) e curva analítica construída com a média e desvio padrão da triplicata (D) nas concentrações de 0,1 mg L<sup>-1</sup> a 1,0 mg L<sup>-1</sup>; gradiente 9 (30:70 até 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O em 70 minutos) (volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 238 nm).**

Fonte: Autoria própria.

Os valores de área para cada curva da Figura 28, assim como a média, o desvio padrão das áreas e o coeficiente de variação podem ser visualizados na Tabela 9.

**Tabela 9 - Valores de área obtidos para as curvas analíticas entre 0,1 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) obtidos para cada concentração, com a eluição gradiente 9**

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Área (mAU.s)			Média (mAU.s)	Desvio padrão (mAU.s)	CV (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0,1	6,92097	6,41850	6,39171	6,5771	0,2981	4,53
0,2	11,72623	10,89142	13,26317	11,9603	1,2031	10,1
0,3	19,64132	17,61093	19,49490	18,9157	1,1323	5,99
0,4	24,50442	22,00693	24,79016	23,7672	1,5311	6,44
0,5	28,03942	29,31833	30,77547	29,3777	1,3690	4,66
0,6	36,63281	37,32494	38,06271	37,3402	0,7151	1,92
0,7	42,58982	42,03780	40,60730	41,7450	1,0232	2,45
0,8	47,63927	49,27544	50,65294	49,1892	1,5087	3,07
0,9	52,89388	56,74818	54,53300	54,7250	1,9343	3,53
1,0	56,62770	63,64901	62,95673	61,0778	3,8694	6,34

Fonte: Autoria própria.

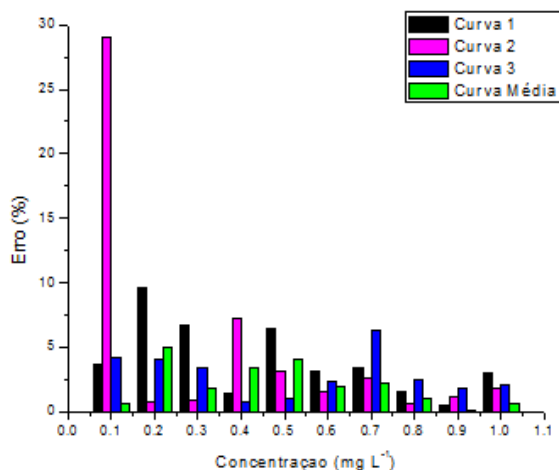
Para se determinar o erro obtido com a construção das curvas analíticas da Figura 28, foi utilizada a equação da regressão linear para cada curva, juntamente com a área obtida para cada ponto. Por exemplo, a partir do valor da área do ponto 0,5 mg L<sup>-1</sup> da curva média, igual a 29,3777 mAU.s, na equação  $y = 0,5239 + 60,18x$ , obteve-se como concentração equivalente o valor de 0,4794 mg L<sup>-1</sup>. Fazendo a diferença entre o valor de 0,4794 e o de 0,5, obtem-se o valor de 0,0205 mg L<sup>-1</sup>. Considerando o valor de 0,5 mg L<sup>-1</sup> como 100%, tem-se que esta diferença equivale a um erro de 4,11%. Este procedimento foi realizado repetidas vezes, resultando nos valores encontrados na Tabela 10. Percebe-se na Tabela 10 que foram obtidos erros para a curva média, em geral menores do que aqueles obtidos para a curva média do método isocrático, presentes na Tabela 5.

**Tabela 10 - Erros calculados para as curvas 1, 2, 3 e a curva média para os testes com a eluição gradiente 9**

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Curva 1 (%)	Curva 2 (%)	Curva 3 (%)	Curva Média (%)
0,1	3,67	29,00	4,20	0,58
0,2	9,59	0,77	4,11	4,99
0,3	6,67	0,94	3,39	1,86
0,4	1,38	7,23	0,80	3,45
0,5	6,47	3,08	1,05	4,11
0,6	3,13	1,49	2,33	1,96
0,7	3,36	2,55	6,34	2,15
0,8	1,54	0,68	2,49	1,08
0,9	0,52	1,18	1,84	0,07
1,0	2,96	1,78	2,13	0,61

Fonte: Autoria própria.

A partir dos valores de erro apresentados na Tabela 10, foi construído o gráfico da Figura 29, onde percebe-se uma tendência de diminuição do erro com o aumento da concentração do padrão utilizado.

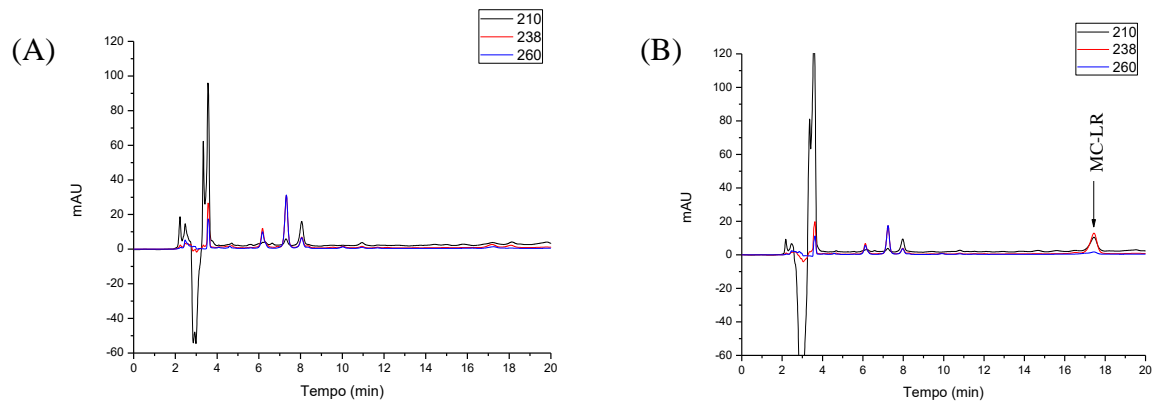


**Figura 29 - Erros obtidos para as curvas 1, 2, 3 e curva média para os testes com a eluição gradiente 9.**

**Fonte: Autoria própria.**

Utilizando o coeficiente angular e linear da curva analítica da Figura 28d, construída com a média das áreas obtidas com a triplicata, o LD pôde ser estabelecido, através da Equação 4, sendo obtido o valor de  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ . O LQ pode ser definido através da Equação 5, utilizando-se o mesmo coeficiente angular e linear do LD, sendo obtido o valor de  $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ . O LD e o LQ para o método isocrático foram de  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Portanto, para o método gradiente, foram obtidos valores menores se comparado com o método isocrático anteriormente testado.

Devido ao fato de o extrato 2 não ter apresentado MC-LR e, devido a necessidade de uma preparação que contivesse MC-LR para outros estudos realizados no LTPA, mais um procedimento foi realizado, obtendo-se o extrato 3. Os cromatogramas deste extrato podem ser visualizados na Figura 30. Na Figura 30a está o cromatograma obtido para o extrato 3, utilizando-se a eluição gradiente 9, onde percebeu-se a existência de vários picos entre 6 e 8 minutos, porém nenhum referente à MC-LR, sendo que já se esperava que esta apresentasse um  $t_r$  de aproximadamente 17 minutos. Este comportamento foi confirmado pela fortificação do extrato 3 com um padrão de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 30b), tendo sido preparado adicionando-se 50% do extrato e 50% do padrão de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , e obtendo-se um  $t_r$  de 17,447 minutos.



**Figura 30 - Cromatogramas do extrato 3 (A) e extrato 3 fortificado com padrão de 10 mg L<sup>-1</sup> (B) utilizando condição gradiente 9 (30:70 até 50:50 ACN:H<sub>2</sub>O em 70 minutos) (volume de injeção de 20 µL; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ de 210, 238 e 260 nm).**

**Fonte: HPLC-DAD 1260 Infinity, Agilent.**

A MC-LR presente no extrato 3 apresentou uma área de 41,20937 mAU.s e, utilizando-se a curva analítica de  $y = 0,5239 + 60,18x$  (menores concentrações) obteve-se uma concentração de 0,68 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações obtidas para cada extrato, juntamente com a equação linear utilizada para cada caso podem ser visualizadas na Tabela 11.

**Tabela 11 – Concentrações obtidas para cada extrato e respectivas equações lineares utilizadas**

Extrato	Equação Linear	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
1	$y = 12,46 + 56,67x$	7,10
2	Não quantificada	Não quantificada
3	$y = 0,5239 + 60,18x$	0,68

**Fonte: Autoria própria.**

Com estes resultados, percebe-se a possibilidade da utilização da técnica cromatográfica aqui testada, para quantificar a toxina em um extrato semi-purificado obtido a partir de células de cianobactérias. Lawton, Edwards e Codd (1994) também utilizaram a HPLC-DAD para quantificar MC-LR (coluna C18 - 300 mm x 3,9 mm – Millipore), através da injeção de 25 µL de amostras extraídas tanto de células de cianobactérias retidas nos filtros utilizados durante a extração, quanto da água filtrada resultante do processo.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho obteve sucesso em otimizar uma metodologia para quantificação de MC-LR. Para os primeiros testes realizados, com padrão em água ultrapura, foram encontradas como melhores condições uma eluição isocrática composta por 60H<sub>2</sub>O:40ACN com 0,05% TFA, volume de injeção de 20 µL, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e monitoramento nos comprimentos de onda 210 nm, 238 nm e 260 nm. Os parâmetros linearidade, limite de quantificação e limite de detecção foram determinados, estabelecendo-se que o método é linear para a faixa de trabalho testada (0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>), obtendo-se um LD de 0,06 mg L<sup>-1</sup> e um LQ de 0,17 mg L<sup>-1</sup>.

Uma metodologia para concentração da MC-LR também foi estabelecida, através da técnica de extração em fase sólida utilizando-se cartuchos CHROMABOND<sup>®</sup> C-18 end-capped, sendo que recuperações de 98,51 ± 2,74% foram obtidas.

Testes envolvendo extratos obtidos a partir de cultivo de cianobactérias também foram executados. Um dos extratos, denominado de extrato 1, demonstrou ter uma concentração estimada de MC-LR da ordem de 7,10 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que o extrato 2 não apresentou ter toxina. Como a MC-LR co-eluiu com outro pico cromatográfico, foram testadas diversas eluições gradiente a fim de separá-los, estabelecendo-se a condição gradiente 9 (30ACN:70H<sub>2</sub>O até 50ACN:50H<sub>2</sub>O em 70 minutos) como a que melhor separou ambos os picos, com o volume de injeção de 20 µL, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e monitoramento em três comprimentos de onda (210 nm, 238 nm e 260 nm). Para avaliar a linearidade, limite de detecção e de quantificação do método, na condição gradiente 9, três curvas analíticas foram preparadas nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> com variação de 0,1 em 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Determinou-se que o método é linear para a faixa de trabalho testada (0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>), obtendo-se um LD de 0,03 mg L<sup>-1</sup> e um LQ de 0,09 mg L<sup>-1</sup>.

Pelo fato de o extrato 2 não ter apresentado toxina, uma nova preparação foi realizada, obtendo-se assim o extrato 3. Esta preparação demonstrou conter MC-LR, com uma concentração de 0,68 mg L<sup>-1</sup>.

Para finalização completa da validação do método, ainda serão estabelecidos, em ensaios futuros, os parâmetros repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Com a análise de mais estes parâmetros, um método de quantificação de MC-LR por HPLC-DAD poderá ser estabelecido e utilizado por todos os pesquisadores que atualmente trabalham no Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água (LTPA).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. V. **Desenvolvimento e validação de metodologia para radiofármacos de tecnécio-99m empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.
- ANCIUTTI, M.; COCHÔA, A. Identificação de cianobactérias tóxicas em um corpo hídrico no interior de Tangará, SC. **Unoesc & Ciência – ACBS**, v. 1, n. 1, p. 29-36, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE Nº 899: Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, **ANVISA**, p. 1-15, 2003.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARAGÃO, N. K. C. V.; GOMES, C. T. S.; LIRA, G. A. S. T.; ANDRADE, C. M. Estudo da comunidade fitoplantônica no reservatório do Carpina-PE, com ênfase em cyanobacteria. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 240-248, 2007.
- AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Revista Virtual de Medicina**. v. 1, n. 3, Ano I, p. 1-16, 1998.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
- BRANDÃO, E. T. P. **Cianobactérias e saúde pública no Brasil**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- BLÁHOVÁ, L.; BABICA, P.; ADAMOVSKÝ, O.; KOHOUTEK, J.; BLAHOŠLAV, M.; BLÁHA, L. Analyses of cyanobacterial toxins (microcystis, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. **Environmental Chemical Letters**, 2007.
- CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: RiMa, 2006.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O.; AN, J. S.; MOLICA, R. J. R.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CARNEIRO, T. G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, n. 32, 2007.

CARVALHO, A. J. P. **Implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação de vitamina E por HPLC**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar), Universidade Nova de Lisboa, 2014.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1208-1213, 2013.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. **E & FN Spon**. London and New York, 1999.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise instrumental. **Interciência**, Rio de Janeiro, 2000.

CLARO, A. C. B. **Estudo dos efeitos da irradiação ultra-sônica na inibição do crescimento de cianobactérias do gênero *microcystis* spp.** 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Editora **Unicamp** - Campinas, SP, 2006.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

ELIAS, L. M. **Análises moleculares, químicas e ecotoxicológicas de cianobactérias presentes em florações de lagoas do estado de São Paulo**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ERMEL, A. V. B. **Análise da lise de células de *Microcystis aeruginosa* e de *Cylindrospermopsis raciborskii* e da liberação e degradação de cianotoxinas em função do tempo de armazenamento do lodo em decantadores**. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Universidade de Brasília, 2009.

ESKIZANI-SANT’ANNA, E. M.; PANOSSO, R. F.; ATTAYDE, J. L.; COSTA, I. A. S.; SANTOS, C. M.; ARAÚJO, M. F. F. Águas potigüares: oásis ameaçado. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 233, p. 68-71, 2006.

FAASSEN, E. J.; LÜRLING M. Occurrence of the microcystins mc-lw and mc-lf in dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2643-2654, 2013.

- FERNANDES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B.; SOUZA, B. D'A. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, 2009.
- FERNANDES, S. S. **Biodisponibilidade de cianotoxinas em bivalves**. 2008. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2008.
- FERRÃO-FILHO, A. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquatic Toxicology**, v. 59, p. 201-208, 2002.
- FERREIRA, A. S. **Validação da determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- FLORES, M. A.; ZARZA, M. S.; GARCÍA, P. R. Validación de una metodología para la cuantificación de microcistina Lr en agua mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. **XXIVº Congreso Nacional del Agua**, San Juan, 2013.
- FONSECA, A. M. **Cianobactérias e cianotoxinas em áreas recreacionais do reservatório de Salto Grande, Americana-SP**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: bioanalytical method validation. **U.S. Department of Health and Human Services**, p. 1-22, 2001.
- FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC. **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, São José dos Campos, 2011.
- GHAZALI, I. E.; SAQRANE, S.; CARVALHO, A. P.; QUAHID, Y.; OUDRA, B.; DEL CAMPO, F. F.; VASCONCELOS, V. Compensatory growth induced in zebrafish larvae after pre-exposure to a microcystis aeruginosa natural bloom extract containing microcystins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 133-146, 2009.
- GUERRA, A. B. **Avaliação em escala de bancada do emprego de carvão ativado granular na remoção de microcistina-LR na potabilização de águas eutrofizadas do semiárido nordestino**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2012.
- GURBUZ, F.; CODD, G. A. Microcystin removal by a naturally-occurring substance: pumice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 3, p. 323-327, 2008.
- HAGE, D. S.; CARR, J. D. Química analítica e análise quantitativa. **Pearson Prentice Hall**, 1. ed., São Paulo, 2012.



INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. rev. 1. Rio de Janeiro: **INMETRO**, p. 1-36, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. rev. 2. Rio de Janeiro: **INMETRO**, p. 1-24, 2007.

JIANG, W.; TAN, S.; HANAKI, Y.; IRIE, K.; UCHIDA, H.; WATANABE, R.; SUZUKI, T.; SAKAMOTO, B.; KAMIO, M.; NAGAI, H. Two new lyngbyatoxin derivatives from the cyanobacterium, *Moorea producens*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 5788-5800, 2014.

JIMENES, G. C. **Mecanismo de transporte iônico, em íleo de coelho, induzido por microcistina-lr de *Microcystis aeruginosa*: participação de macrófagos,  $il1\beta$ ,  $tnf\alpha$  e mediadores pro-inflamatórios**. 2003. 272 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2003.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E. Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 5, p. 1189-1200, 2000.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. HPLC for pharmaceutical scientists. **Wiley & Sons Inc.**, 2007.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: **RIMA**, 2004.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. **Analyst**, v. 119, n. 7, 1994.

LEAL, A. C.; SOARES, M. C. P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37 (Suplemento II), 2004.

LEITE, A. C.; CABRAL, E. C.; SANTOS, D. A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Isolamento do alcalóide ricina das folhas de *Ricinus communis* (euphorbiaceae) através de cromatografias em contracorrente. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LIZ, M. V. **Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea ( $TiO_2$  e  $ZnO$ ) e dos processos fenton para remediação de águas contaminadas pelos estrogênios estrona,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol**. 2013. 196 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LUCA, S. J.; PEGORER, M. G.; LUCA, M. A. Oxidação de microcistinas-LR em águas pelo íon ferrato (VI). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 5-10, 2010.

MANTOVANI, D.; MOSER, A. S.; FAVERO, D. M. Cianobactérias em reservatórios brasileiros e seus prejuízos à saúde pública. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 4, n. 1, p. 145-155, 2011.

MATHIAS, L. A.; CORBELLINI, L. G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K. F.; PAULIN, L. M. S.; SAMARTINO, L. E.; SERQUEIRA, M. A.; FILHO, P. M. S.; SOUZA, M. M. A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

MALE, K. B.; TOM, R.; DUROCHER, Y.; GREER, C.; LUONG, J. H. T. Noninvasive probing of inhibitory effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR using cell-based impedance spectroscopy. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 17, p. 6775-6781, 2010.

MATSUZAKI, M.; MUCCI, J. L. N.; ROCHA, A. A. Comunidade fitoplanctônica de um pesqueiro na cidade de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 679-686, 2004.

MELO, J. R. S.; SANTOS, M. L. F. Implantação e validação de metodologia para quantificação de microcistinas por CLAE. **XVII Congresso de Iniciação Científica**, 2009.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, v. 59, p. 303-327, 2013.

MERILUOTO, J. Chromatography of microcystins. **Analytica Chimica Acta**, v. 352, n. 1-3, p. 277-298, 1997.

MENDONÇA, J. M. S.; **Avaliação da toxicidade de florações naturais e de cultura de cianobactérias: efeitos sobre *Ceriodaphnia silvestrii* (crustacea, cladocera)**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

MOREIRA, A. A.; VON SPERLING, E.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARDIM, F. A. Métodos analíticos para avaliação e comparação de cianotoxinas em três reservatórios que abastecem a região metropolitana de Belo Horizonte. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Campo Grande, 2005.

MÜLLER, C. C. **Avaliação da utilização de carvão ativado em pó na remoção de microcistina em água para abastecimento público**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

NASCIMENTO, M. M. **Remoção de microcistinas por meio de oxidação química com hipoclorito de sódio e validação do método de análise por cromatografia líquida com detector de massas**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

NICHOLSON, B. C.; BURCH, M. D. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to australian drinking water guidelines. **Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment** – National Health and Medical Research Council of Australia. Water Services Association of Australia, 2001.

OLIVEIRA, E. J. A. **Desenvolvimento de métodos para determinação de microcistina-Lr em água**. 2003. 139 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

OLIVEIRA, M. M.; FILHO, M. V. S.; BASTOS, J. C.; NEVES, M. H. C. B. Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, v. 4, n. 1, p. 57-80, 2010.

OLIVEIRA, S. N. **Remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina-Lr por coagulação, floculação, sedimentação e filtração seguida de coluna de carvão ativado granular**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

OSSWALD, J. F. F. C. M. **Estudo da toxicidade de cianobactérias diazotróficas da albufeira do Maranhão (Portugal)**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Hidrologia) – Universidade do Porto, 2002.

OTOMO, J. I. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP**. 2010. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear – Materiais), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2010.

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

PURDIE, E. L.; YOUNG, F. M.; MENZEL, D.; CODD, G. A. A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase. **Toxicon**, v.54, n. 6, p. 887-890, 2009.

PYO, D.; PARK, G.; CHOI, J.; OH, C. Microcystin detection characteristics of fluorescence immunochromatography and high performance liquid chromatography. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 268-272, 2005.

RAMOS, R. R. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise sara de petróleo**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

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.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SANCHES, S. M.; PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 2012.

SANCHES, S. M.; VIEIRA, E. M.; PRADO, E. L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-Lr em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Eclética Química**, v. 32, n. 4, p. 43-48, 2007.

SANTANA, A. K. M.; NUNES, L. C. C.; MEDEIROS, F. P. M.; SILVA, M. J.; LAVRA, Z. M. M.; ROLIM-NETO, P. J. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 38, n. 2, p. 177-183, 2007.

SANTOS, T. R. **Reserva nitrogenada no gênero *Beijerinckia* isolada da rizosfera de cana-de-açúcar**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, A. P. M. E.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Hepatotoxicidade associada à microcistina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 417-430, 2008.

SEGATO, M. P.; SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 431-440, 2009.

SHAMSOLLAHI, H. R.; ALIMOHAMMADI, M.; NABIZADEH, R.; NAZMARA, S.; MAHVI, A. H. Measurement of microcystin-LR in water samples using improved HPLC method. **Global Journal of Health Science**, v. 7, n. 2, p. 66-70, 2015.

SILVA, C. G. A. **Desenvolvimento de fases estacionárias C18 termicamente imobilizadas sobre sílica e sílicas metalizadas e suas caracterizações químicas, físicas e cromatográficas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia com fluido supercrítico (CFS)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Unicamp, Campinas, 2013.

SILVA, F. M. D.; IDERIHA, E. T.; NETTO, E. J. Desenvolvimento de sistema óptico para unidade de fototerapia neonatal. **II Congresso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica**, Habana, Cuba, 2001.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SILVA, J. C. C. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de microcistina-LR e agrotóxicos em águas superficiais, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas**. 2010. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

SILVA, P. D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

SIQUEIRA, D. B.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 3, n. 1, p. 109-127, 2005.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. Tradução da 8. ed. norte-americana, Editora **Thomson**, São Paulo, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3. ed., **Hoboken: Wiley**, 1974.

SOARES, R. M. Toxicologia de cianotoxinas: microcistinas as estrelas do tema. *Oecologia Brasiliensis*, v. 13, n. 2, p. 259-271, 2009.

SPOOF, L.; VESTERKVIST, P.; LINDHOLM, T.; MERILUOTO, J. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, v. 1020, n. 1, p. 105-119, 2003.

SPOOF, L.; KARLSSON, K.; MERILUOTO, J. High-performance liquid chromatography separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C<sub>18</sub> and amide C<sub>16</sub> sorbents. *Journal of Chromatography*, v. 909, n. 2, p. 225-236, 2001.

STEWART, I.; CARMICHAEL, W.; SADLER, R.; MCGREGOR, G. B.; REARDON, K.; EAGLESHAM, G. K.; WICKRAMASINGHE, W. A.; SEAWRIGHT, A. A.; SHAW, G. R. Occupational and environmental hazard assessments for the isolation, purification and toxicity testing of cyanobacterial toxins. *Environmental Health*, v. 8, n. 52, p. 1-12, 2009.

TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO*, v. 27, n. 3, p. 244-253, 1993.

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

VICENTE, G. H. L. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos diclofenaco, nimesulida e paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos-SP**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VILELA, W. F. D. **Estudo da Degradação da [D-Leu]-Microcistina-LR por Fotocatálise Heterogênea Solar**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ZAT, M. **Remoção de compostos odoríferos de águas de abastecimento através de processos de aeração, dessorção gasosa e nanofiltração**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado

em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.