



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

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Determination of anatoxin-a in-water samples using SPME-GC/MS

Paula Alexandra Martins Pereira

Orientadores: Doutora Ana Gago - Martínez

Departamento de Química Analítica y Alimentaria da Universidade de Vigo

Doutor José Manuel Leão Martins

Departamento de Química Analítica y Alimentaria da Universidade de Vigo

Doutora Dulce Geraldo

Departamento de Química da Universidade do Minho

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Resumo

A anatoxina-a é uma neurotoxina produzida por várias espécies de cianobactérias, tais como, *Anabaena*, *Planktothrix* (a anterior *Oscillatoria*), *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* e *Microcystis* spp. Esta toxina atua como um inibidor do neurotransmissor de acetilcolina que irreversivelmente bloqueia o recetor nicotínico de acetilcolina (NACHR), afetando o funcionamento do sistema nervoso. Estudos experimentais tem demonstrado que em apenas alguns minutos após o consumo de água contaminada, animais apresentam sintomas típicos de intoxicação por anatoxina-a, como fasciculação ofegante, convulsões violentas que levam à morte através de paragens respiratória. A dose estimada como necessária para produzir a morte a 50 % dos ratos expostos (LD50) após administração interperitoneal é de apenas 200 µg/kg. A anatoxina-a foi pela primeira vez detetada no Canadá (nos anos 1960) e desde então tem sido responsável por uma serie de mortes de animais e humanos, em diferentes partes do mundo. A procura de um método analítico eficiente e viável no controlo deste tipo de cianotoxina revela ser cada vez mais urgente, devido á sua recente descoberta e elevada distribuição mundial. O presente trabalho, resume o desenvolvimento de um método automatizado combinado com a microextração em fase sólida (SPME) com a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) para a determinação rápida e sensível da anatoxina-a em amostras de água. O método tem por base a derivatização direta do analito adicionando isobutilcloroformato na amostra em condições alcalinas. A anatoxina-a derivatizada é extraída por SPME com uma fibra PDMS num vial âmbar durante 20 minutos sob agitação magnética. A técnica GC/MS é utilizada na identificação e quantificação do analito em modo SIM recorrendo ao ião quantificador com a razão m/z 265 e ainda a partir dos fragmentos com m/z de 191e 164. Os parâmetros que afetam a extração, tais como, concentração de sal, quantidade de derivatizante, tempo de extração, tempo de reação e velocidade de agitação foram estudados.

Realizou-se a validação do método na análise da anatoxina-a tendo em conta os diversos parâmetros de

desempenho, nomeadamente, linearidade, sensibilidade, limiares analíticos e precisão através da repetibilidade e reprodutibilidade.

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

Abstract

Anatoxin-a is a neurotoxin produced by various species of cyanobacteria such as *Anabaena*, *Planktothrix* (formerly *Oscillatoria*), *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, and *Microcystis* spp. This toxin acts as a mimic of the neurotransmitter acetylcholine and irreversibly binds the nicotinic acetylcholine receptor (NACHR) therefore affecting the functioning of the nervous system.

Experimental studies have shown that in few minutes after drinking contaminated water, animals presented typical symptoms of anatoxin-a intoxication such as muscle fasciculation, gasping, violent convulsions, and death due to respiratory arrest. The estimated dosage needed to produce death in 50% of exposed mice (LD50) after interperitoneal administration of approximately 200 µg/kg. Anatoxin-a was first detected in Canada (1960's) and since then has been responsible for a number of animal and human fatalities, in different parts of the world. The search for efficient and reliable analytical methods for the control of such cyanotoxins is becoming more and more urgent due to their recent appearance and worldwide distribution. The present work, summarizes the development of an automated method combining Solid Phase MicroExtraction (SPME) with Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS) for fast and sensitive determination of Anatoxin-a in water samples. This method is based on the direct derivatization of the analyte by isobutylchloroformate addition to the sample extract in alkaline conditions. The derivatized anatoxin-a was extracted by SPME procedure, submersing a PDMS fiber in an amber vial for 20 minutes under magnetic stirring. GC/MS is used to identify and quantify the analyte in the SIM mode following the quantification ion of m/z 265 and other fragments of m/z 191 and 164. Parameters affected extraction such as: salt concentration, amount of derivatized agent, time of extraction, time of reaction and stirring speed, were evaluated.

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

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