



## I-421 - IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA POR CL-EM/EM EM ÁGUA NATURAL E TRATADA

### **Daniel Valencia-Cárdenas** <sup>(1)</sup>

Engenheiro Químico pela Universidade Nacional da Colômbia. Mestre e Doutor em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pela Universidade de Brasília (UnB). Pesquisador no Ministério das Cidades.

### **Matheus Almeida Ferreira** <sup>(1)</sup>

Engenheiro Ambiental e Mestre em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pela Universidade de Brasília (UnB). Pesquisador no Ministério das Cidades.

### **Katyeny Manuela da Silva** <sup>(1)</sup>

Bacharel, Licenciada e Mestre em Química pela Universidade de Brasília (UnB). Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Antuérpia, Bélgica. Cientista na Johnson & Johnson, Bélgica.

### **Cristina Celia Silveira Brandão** <sup>(1)</sup>

Engenharia Química pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Doutora em Engenharia Ambiental pelo Imperial College London. Professora Associada do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília (UnB).

### **Yovanka Pérez Ginoris** <sup>(1)</sup>

Engenheira Química pelo Instituto Superior Politécnico José Antonio Echevarria, Cuba. Mestre em Biotecnologia Industrial pela Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Doutora em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Professora Adjunta do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília (UnB).

**Endereço** <sup>(1)</sup>: Anexo SG-12, Térreo, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília (UnB) - Asa Norte - Brasília - DF - CEP: 70.910-900 - Brasil - Tel: (61) 99997-0776 - e-mail: [dvalenciacar@gmail.com](mailto:dvalenciacar@gmail.com)

### **RESUMO**

A cilindropermopsina (CYN) é uma cianotoxina produzida por diversas espécies de cianobactérias, representando um risco à saúde humana devido à sua toxicidade para órgãos vitais. No Brasil, a CYN tem sido detectada nos mananciais usados para abastecimento de água em concentrações médias inferiores a 10 µg/L. Considerando que os limites da CYN na água para consumo humano são de 1 µg/L no Brasil e de 0,7 µg/L segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e confiáveis para a detecção e quantificação da CYN nos corpos hídricos e nos sistemas de tratamento de água. Além disso, algumas espécies de cianobactérias produzem variantes da CYN, como a 7-desoxiCYN, aumentando a complexidade e a importância do monitoramento dessas toxinas. Este estudo teve como objetivo principal implementar e validar um método de detecção e quantificação de CYN por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM). A validação do método foi conduzida separadamente para duas matrizes aquosas: água ultrapura e água superficial proveniente do lago Paranoá (Brasília/DF, Brasil). O método demonstrou ser seletivo, linear e robusto, apresentando uma faixa de trabalho adequada para os sistemas de tratamento de água e para o monitoramento da qualidade da água de corpos hídricos, atendendo aos limites de detecção e quantificação exigidos pelas diretrizes de qualidade da água. A robustez do método foi uma característica de desempenho, que foi influenciada pela concentração do modificador da fase móvel, onde a variação na sua concentração pode impactar a precisão dos resultados. Adicionalmente, o método demonstrou potencial para identificar a variante 7-desoxi-cilindropermopsina, possibilitando um controle mais abrangente e preciso das diversas variantes da cianotoxina presentes na água.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cilindropermopsina, Espectrometria de massas, Validação de método, Cianotoxinas, Qualidade da água.



## INTRODUÇÃO

A CYN é uma cianotoxina produzida por diversas espécies de cianobactérias, representando uma crescente preocupação para a qualidade da água em corpos hídricos e mananciais de abastecimento. Sua presença nesses ambientes pode acarretar riscos à saúde humana, pois apresenta toxicidade e afeta órgãos como fígado, rins, pulmões, timo e intestino delgado (Terao *et al.*, 1994; Hawkins *et al.*, 1997; Humpage e Falconer, 2003).

No Brasil, a CYN é frequentemente encontrada em níveis próximos a 5 µg/L, valor superior ao limite máximo aceitável de 1 µg/L estabelecido pelo Ministério da Saúde brasileiro (Ministério da Saúde, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu um limite ainda mais rigoroso, de 0,7 µg/L (WHO, 2020).

Diante desse cenário, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e confiáveis para a detecção e quantificação da CYN em baixas concentrações, na ordem de µg/L. Esses métodos são importantes para garantir a conformidade com as diretrizes de qualidade da água, proteger a saúde pública, monitorar, de forma precisa, a qualidade da água em mananciais de abastecimento, realizar o controle operacional de estações de tratamento de água e monitorar a qualidade da água tratada.

O estudo de Guzmán-Guillén *et al.* (2012) apresentou um método para a detecção e quantificação de CYN por CL-ES/ES. O estudo otimizou os parâmetros operacionais da espectrometria de massas e validou o método em amostras reais de água. A validação realizada pelos autores demonstrou a linearidade do método para concentrações de CYN entre 0,9 e 125 µg/L, com limites de detecção e quantificação de 0,5 e 0,9 µg/L, respectivamente. A recuperação média do método variou entre 83% e 95%. Com tudo, o estudo não avaliou a robustez da CL-ES/ES.

Guzmán-Guillén *et al.* (2012), avaliaram a robustez do método de extração em fase sólida, usando cartuchos de carbono grafitizado, utilizados antes da quantificação da CYN. Além disso, o estudo não apresentou uma avaliação específica da seletividade do método de quantificação da CYN. Magnusson e Örnemark (2014) ressaltam que a robustez, além de outras características como seletividade, limites de detecção e quantificação, faixa de trabalho, viés e linearidade, são as características de desempenho, que são comumente mais avaliadas, na validação de métodos analíticos.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo principal implementar e validar um método de detecção e quantificação da CYN por CL-EM/EM. Na implementação do método foram otimizados os parâmetros operacionais tanto da cromatografia líquida quanto da espectrometria de massas, com foco na detecção da CYN e na capacidade de identificar simultaneamente a 7-desoxi-cilindrospermopsina. Na validação intralaboratorial foram avaliadas as principais características de desempenho do método.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Padrão sólido e extrato de *R. raciborskii* contendo CYN e 7-desoxi-CYN

Neste estudo foram utilizadas, como fontes de CYN, um padrão sólido com pureza superior a 95%, adquirido da Eurofins/ABRAXIS e um extrato preparado a partir de culturas de *R. raciborskii* na fase exponencial de crescimento.

As células de *R. raciborskii* (cepa CYP011K, produtora de CYN) foram cultivadas em meio ASM-1 por 14 dias, em condições controladas de temperatura (24°C), um fotoperíodo de 12 horas e mantidas com aeração mecânica constante. A densidade celular no final da fase exponencial de crescimento foi de aproximadamente 10<sup>7</sup> cel/mL. As análises por CL-EM/EM sugeriram a presença de 7-desoxiCYN nas culturas. Na literatura consultada, a cepa CYP011K não tem sido relatada como produtora desta variante da CYN, portanto, é necessário realizar uma análise com material de referência para confirmar a produção desta variante pela cepa CYP011K usada neste estudo.

O extrato de *R. raciborskii* foi preparado por gelo e degelo 3 vezes consecutivas para romper as células, seguido por homogeneização e filtração em três etapas. Inicialmente, o extrato foi filtrado em papel filtro, com tamanho de poro de 7,5 µm. Em seguida, foram utilizadas membranas de fibra de vidro, com 0,7 µm de tamanho de poro.



Para finalizar, o extrato foi filtrado em membranas de ésteres de celulose, com tamanho de poro de 0,45 µm. O extrato filtrado apresentou uma concentração de CYN entre 300 e 400 µg/L.

### Produtos químicos

A composição da fase móvel foi igual à indicada no método 545 da U.S. EPA (2015). O componente orgânico da fase móvel foi composto por metanol, com um grau de pureza de 99,9%. Na fração aquosa da fase móvel foi utilizada água ultrapura, onde foi diluído ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH, 99,7% de pureza), como modificador, em uma concentração de 0,15% v/v. Adicionalmente, isopropanol e etanol, ambos com pureza superior a 99,5%, foram utilizados para a higienização dos materiais e vidrarias utilizadas durante a realização deste trabalho.

### Instrumentação analítica

A separação cromatográfica foi feita usando um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Califórnia), equipado com bomba quaternária e desgaseificador; acoplado a um espectrômetro de massas *ion trap* 3200 Q TRAP de triplo quadrupolo híbrido, Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Toronto, Canadá), provido com uma fonte de íons de eletronebulização (*electrospray*) operada em modo positivo, usando um método de monitoramento de reações múltiplas (MRM). As análises cromatográficas foram executadas em uma coluna Kromasil 100-5-C18 de fase reversa (Akzo Nobel, Bohus, Suécia), com dimensões de 150 × 4,6 mm e tamanho das partículas de enchimento de 5 µm. A coluna cromatográfica foi acoplada à sua respectiva pré-coluna, com dimensões de 3,0 × 4,6 mm e tamanho das partículas de enchimento de 5 µm. Todas as amostras injetadas no sistema de CL-EM/EM foram filtradas em membranas filtrantes ou filtros de seringa com abertura de 0,22 µm antes de serem analisadas.

### Otimização dos parâmetros da espectrometria de massas e da cromatografia líquida

Para a otimização, foi utilizada uma solução padrão de CYN de 50 µg/L em água ultrapura. A solução foi injetada e realizou-se uma análise automática de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) para produzir fragmentos da molécula de CYN e monitorar as transições 416,1/194,3; 416,1/336,1 e 416,1/176,2, que foram selecionadas com base em trabalhos e métodos anteriores (Guzmán-Guillén *et al.*, 2012; U.S. EPA, 2015). Os parâmetros de EM/EM otimizados automaticamente foram: pressão de cortina de gás, pressão de gás nebulizante, pressão de gás secante, voltagem capilar, potencial de orifício (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP). Essa otimização gerou um método de MRM (monitoramento de transições múltiplas) para a detecção e quantificação de CYN.

O perfil de eluição, o tempo de corrida, o fluxo de fase móvel e a temperatura da fonte de íons de eletronebulização foram otimizados manualmente. O objetivo foi encontrar a combinação ideal desses parâmetros que maximizasse a intensidade e a resolução do sinal durante a análise. Testaram-se as proporções de metanol na fase móvel (perfil de eluição) entre 0% e 100%, o tempo de corrida entre 5 e 12 minutos, o fluxo de fase móvel entre 200 e 800 µL/min e a temperatura da fonte entre 120 e 700°C. A combinação desses quatro fatores que resultou na maior intensidade do sinal e na melhor resolução foi escolhida como a condição operacional otimizada para a análise de CYN por CL-EM/EM.

### Detecção de 7-desoxiCYN

A cepa de *R. raciborskii* usada para preparar o extrato mostrou indícios da produção de 7-desoxiCYN. Portanto, os parâmetros da EM/EM também foram otimizados para detectar essa variante. As transições 400,30/194,30; 362,18/194,30 e 320,17/194,30 foram monitoradas com o intuito de identificar essa molécula, conforme estudos prévios (Norris *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Seifert *et al.*, 2007). O método não foi validado para esta variante da CYN.

### Validação do método

Após a otimização dos parâmetros da cromatografia líquida e da espectrometria de massas sequencial, foi iniciado o processo de validação do método. Primeiro foi definido o tempo de eluição da molécula. Em seguida foram avaliadas as características de desempenho do método: Seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho, linearidade, viés e robustez. A validação do método foi realizada



separadamente para duas matrizes: água ultrapura e água natural (água do lago Paranoá – Brasília/DF, Brasil), seguindo as indicações de Magnusson e Örnemark (2014) e Barwick (2019).

Para determinar o tempo de eluição da CYN, foram injetadas, em triplicata, soluções padrão com concentrações de 1, 45 e 90 µg/L, observando o tempo de aparição do sinal para cada concentração. O tempo de eluição foi calculado como a média dos tempos de cada concentração.

Para testar a seletividade do método, foram analisadas amostras preparadas com possíveis interferências introduzidas deliberadamente em cada matriz. Na matriz de água ultrapura, as interferências incluíram: extrato de *R. raciborskii*, contendo tanto CYN quanto sua análoga 7-desoxiCYN e matéria orgânica algogênica (MOA); ácidos húmicos, devido à sua forte presença em águas naturais; e uma combinação de extrato de *R. raciborskii* com ácidos húmicos, para verificar interações entre as interferências. Na matriz de água natural, foi avaliada a diluição do extrato, além de analisar a água sem interferências, considerando sua composição natural. As amostras com interferências foram medidas inicialmente sem o analito e, posteriormente, fortificadas com uma solução padrão de CYN para uma concentração de 5 µg/L. É relevante notar que as amostras com extrato já possuíam uma concentração de fundo de aproximadamente 1 µg/L. A seletividade do método foi avaliada comparando estatisticamente as medições nas amostras com interferências ao valor de referência de 5 µg/L, por meio de uma análise de variância (ANOVA).

O limite de detecção (LD) foi avaliado para determinar o valor crítico em que o método detecta níveis de CYN significativamente diferentes de zero, enquanto o limite de quantificação (LQ) indica a concentração mínima de CYN confiável para quantificação. Para estimar o LD, foi definida uma concentração próxima ao valor mínimo desejado, 0,5 µg/L, visando verificar se o método detecta a cianotoxina em níveis inferiores aos permitidos na água para consumo humano (1 µg/L no Brasil e 0,7 µg/L segundo a OMS). Foram preparadas 10 amostras de cada matriz, fortificadas com 0,5 µg/L de CYN. As amostras foram analisadas e as medições submetidas a uma ANOVA, para identificar diferenças significativas entre as amostras. Posteriormente, foi calculado o desvio padrão corrigido (Equação 1) e, a partir dele, o LD e o LQ conforme as Equações 2 e 3.

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

$$LD = 3 \cdot S'_0 \quad (2)$$

$$LQ = 10 \cdot S'_0 \quad (3)$$

- $S'_0$  Desvio padrão corrigido
- $S_0$  Desvio padrão das leituras de cada amostra
- $n$  Número de medições feitas por amostra ( $n = 3$ )
- LD Limite de detecção
- LQ Limite de quantificação

A faixa de trabalho e a linearidade foram avaliadas simultaneamente. Dez padrões de calibração, preparados a partir do padrão sólido de CYN, em ambas as matrizes de água, com concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 75 e 90 µg/L, foram injetados, em triplicata. A linearidade do método foi testada em duas faixas: baixas concentrações (0,5 a 10 µg/L) e médias e altas concentrações (10 a 90 µg/L). Para cada faixa e matriz de água foram obtidas regressões lineares, utilizando um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior que 0,99 como critério de linearidade. A união das duas faixas definiu a faixa de trabalho do método.

Para determinar o viés, foram preparadas 20 amostras de cada matriz, 10 fortificadas com CYN, a uma concentração de 1 µg/L e 10 fortificadas com uma concentração de CYN de 20 µg/L, e analisadas em triplicata. Os resultados das medidas das amostras foram submetidos a uma ANOVA de dois fatores para identificar a principal fonte de variação das medições. Foi definido um viés máximo aceitável de  $\pm 20\%$  na recuperação aparente, calculada conforme a Equação 4.

$$R = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100\% \quad (4)$$

- $R$  Recuperação aparente [%]  
 $\bar{x}$  Média das medições das amostras [ $\mu\text{g/L}$ ]  
 $x_{\text{ref}}$  Concentração de referência [ $\mu\text{g/L}$ ]

A robustez foi avaliada com o intuito de conhecer a capacidade do método em realizar quantificações confiáveis em condições operacionais variadas. Foram selecionadas quatro possíveis mudanças operacionais: concentração do modificador da fase móvel, mudança de analista, temperatura e pH da amostra. Por meio de um experimento fatorial com 4 fatores e 2 níveis, que resultou em 16 experimentos que avaliaram todas as combinações possíveis e a resposta do método diante cada combinação. Na Tabela 1 são apresentados os quatro fatores avaliados e os dois níveis de cada um. Com os resultados do experimento fatorial foram calculados os efeitos principais e de interação dos fatores para definir os critérios de robustez do método.

**Tabela 1: Fatores e níveis adotados no experimento fatorial para avaliar a robustez do método de detecção e quantificação de CYN por CL-EM/EM neste trabalho**

Fator	Nível 1	Nível 2
Concentração do modificador da fase móvel	0,10% v/v	0,20% v/v
Mudança de analista	Analista 1	Analista 2
Temperatura da amostra	4°C	20°C
pH da amostra	4	8

## RESULTADOS

### Otimização dos parâmetros da espectrometria de massas e da cromatografia líquida

A análise automatizada, assistida pelo software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments), otimizou os parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas para a produção dos fragmentos da molécula de CYN, resultando nas transições 416,1/194,3; 416,1/336,1 e 416,1/176,2. Os valores otimizados, no modo de MRM, dos parâmetros foram: pressão da cortina de gás de 20 psi, pressão do gás nebulizante de 40 psi, pressão do gás secante de 40 psi e voltagem capilar de 5000 V. A transição 416,1/194,3 foi selecionada para quantificação devido à sua maior intensidade do sinal, enquanto as transições 416,1/336,1 e 416,1/176,2 foram utilizadas para confirmação da detecção de CYN. Para cada uma das transições monitoradas, foram otimizados o potencial de orifício (DP), a energia de colisão (CE) e o potencial de saída da célula de colisão (CXP). Todas as transições apresentaram um DP otimizado de 56 V. O CXP foi definido em 4,00 V para as transições 416,1/194,3 e 416,1/176,2, e 6,00 V para a transição 416,1/336,1. Os valores de CE foram estabelecidos em 45,00 eV, 43,00 eV e 29,00 eV, para as transições 416,1/176,2; 416,1/194,3 e 416,1/336,1, respectivamente.

O perfil de eluição, o tempo de corrida, o fluxo de fase móvel e a temperatura da fonte de íons de eletronebulização foram ajustados manualmente até a obtenção do sinal simétrico com a maior intensidade. Após diversos testes, o tempo de corrida definido foi de 12 minutos, o fluxo da fase móvel foi estabelecido em 550  $\mu\text{L}/\text{min}$  e a temperatura da fonte de íons de eletronebulização em 450°C. O perfil de eluição com melhor desempenho está descrito na Tabela 2.

### Deteção de 7-desoxiCYN

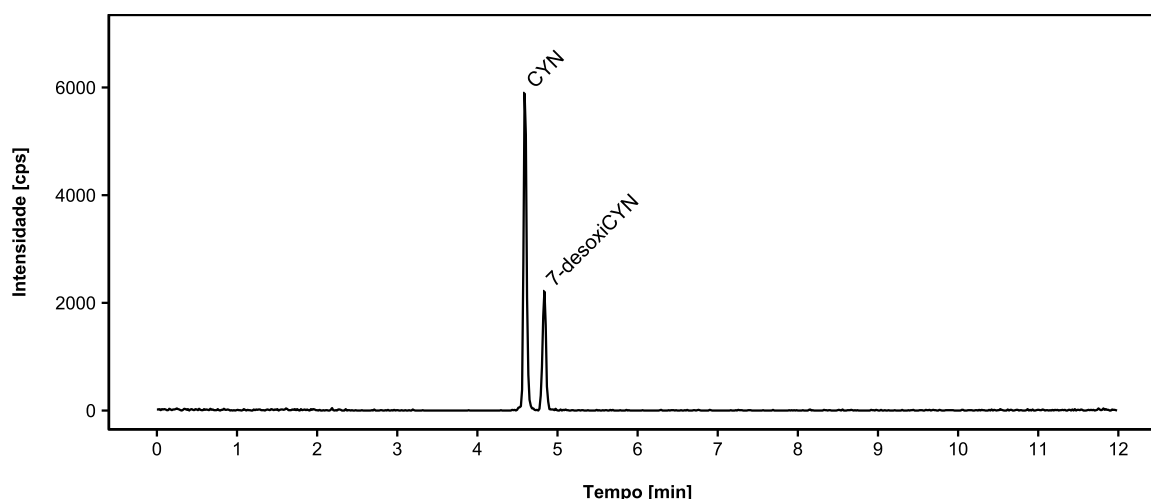
Além da CYN, o método identificou um sinal que sugere a potencial detecção de 7-desoxiCYN. A confirmação com material de referência ainda é necessária para a confirmação de detecção desta variante. A possível identificação de 7-desoxiCYN foi satisfatória, com uma separação considerável dos sinais de ambas as substâncias no cromatograma. O sinal atribuído à 7-desoxiCYN foi detectado aproximadamente aos 4,8 minutos, enquanto a CYN foi observada em média aos 4,635 minutos. A Figura 1 apresenta um cromatograma onde ambos os sinais estão separados durante a análise de uma amostra de extrato de *R. racibosrskii*.



**Tabela 2: Perfil de eluição otimizado manualmente para a detecção e quantificação de CYN por CL-EM/EM neste trabalho**

Tempo [min]	Fase aquosa		Fase orgânica
	Água ultrapura + CH <sub>3</sub> COOH 0,15%v/v		Metanol
0,0		90%	10%
0,5		70%	30%
8,0		10%	90%
10,0		10%	90%
10,5		90%	10%
12,0		90%	10%

**Figura 1: Cromatograma obtido na análise de amostras de extrato de células de *R. raciborskii*, contendo CYN com indícios da presença de 7-desoxiCYN pelo método implementado, com os parâmetros da fonte de ionização e o perfil de eluição otimizados.**



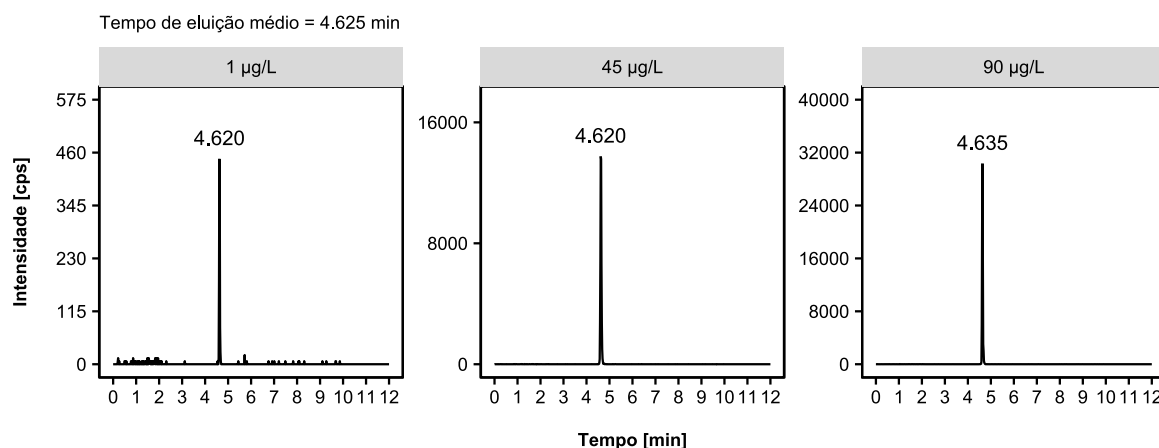
### Validação do método

A validação começou com a definição do tempo de eluição da CYN. A Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos para cada concentração de solução padrão utilizada. De acordo com esses cromatogramas, o tempo de eluição médio da CYN foi de 4,625 minutos. Dado que sinais em tempos diferentes indicam possíveis interferências, desajuste dos parâmetros de cromatografia ou espectrometria de massas sequencial e/ou degradação da CYN durante o armazenamento; o tempo de eluição foi usado como referência para a detecção ao longo do processo de validação.

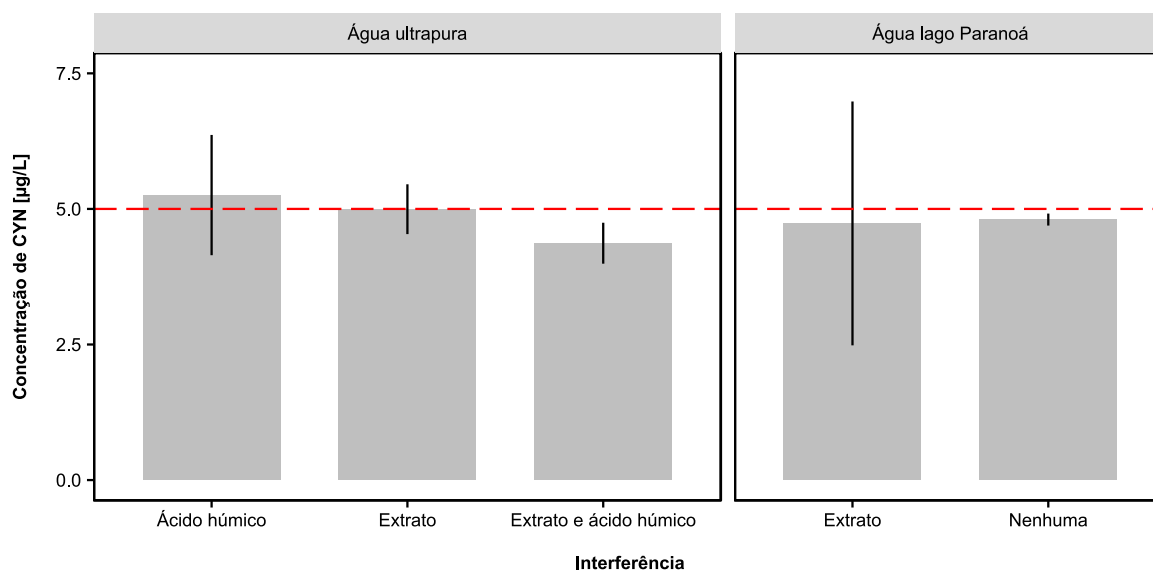
A seletividade foi testada para verificar se o método responde unicamente ao analito, mesmo na presença de outras substâncias nas amostras. A Figura 3 apresenta a precisão das medidas realizadas em cada matriz aquosa com suas respectivas interferências. As concentrações medidas em cada amostra oscilaram em torno do valor de referência de 5 µg/L, com uma média geral de 4,831 µg/L. A ANOVA, com um valor *p* de 0,934, indicou que as diferenças entre a média geral, a média de cada amostra e o valor de referência não foram estatisticamente significativas. Esses resultados mostraram que o método analítico demonstrou seletividade, respondendo especificamente à CYN, apesar das interferências e da matriz aquosa em que o analito estava diluído. Essa constatação valida a capacidade do método de identificar a cianotoxina mesmo na presença de possíveis interferências e da diversidade das amostras analisadas.



**Figura 2: Cromatogramas obtidos para diferentes concentrações de CYN pelo método de detecção e quantificação por CL-EM/EM com os parâmetros da fonte de ionização e o perfil de eluição otimizados.**



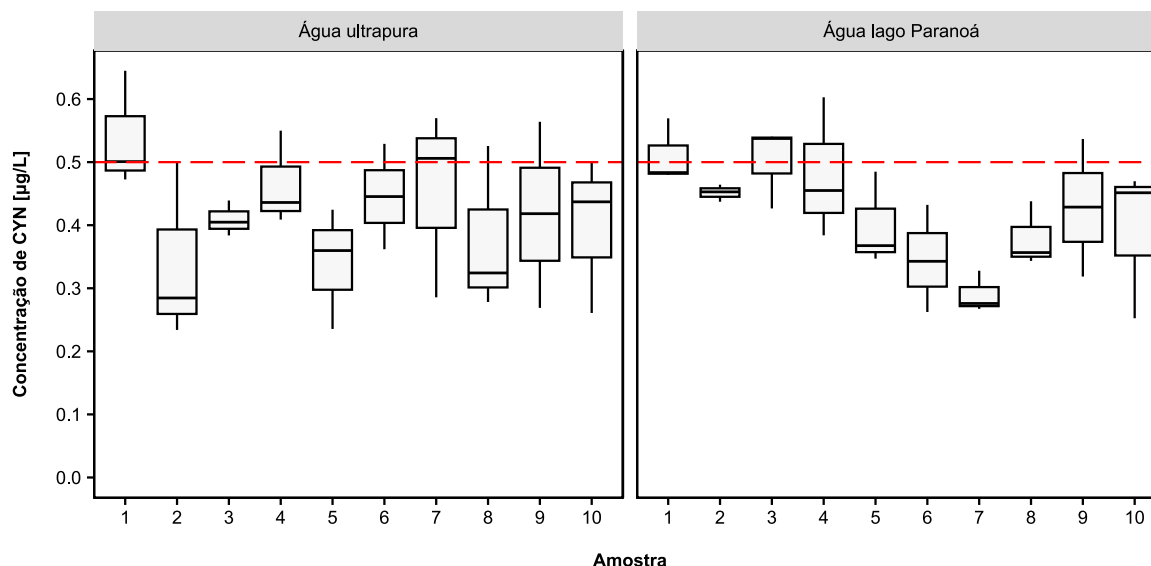
**Figura 3: Média da concentração de CYN nas amostras com as interferências selecionadas para a avaliação da seletividade do método em cada uma das matrizes de água avaliadas neste estudo.**



Após demonstrar a seletividade do método para a CYN, foram definidos o LD e o LQ. A Figura 4 apresenta os gráficos *box-plots* com as concentrações medidas de cada uma das 10 amostras fortificadas, preparadas para cada matriz avaliada. As concentrações medidas nas amostras apresentaram oscilações próximas ao valor de referência de 0,5 µg/L. A ANOVA apontou diferenças significativas na matriz de água do lago Paranoá, com um valor  $p$  de 0,05. Como a ANOVA mostrou um valor de  $\alpha$  na margem de não significância, o teste de Tukey não identificou diferenças entre as amostras analisadas, sendo consideradas iguais entre si. Com esses resultados estatísticos, destacou-se a importância de realizar um maior número de injeções, pois aumenta a precisão das medições.



**Figura 4: Concentração medida pelo método para cada solução de CYN preparada a 0,5 µg/L em cada uma das matrizes aquosas testadas neste trabalho para a determinação do LD e do LQ.**



Com as amostras consideradas semelhantes, foram calculados o LD e o LQ, apresentados na Tabela 3. Os valores atenderam às necessidades de detecção e quantificação deste estudo e às exigências internacionais de controle de qualidade da água, situando-se abaixo de 0,7 µg/L e sendo similares aos relatados por Guzmán-Guillén *et al.* (2012). Contudo, a aplicação do método em outros corpos hídricos requer uma nova validação.

**Tabela 3: Cálculo dos parâmetros estatísticos para a determinação LD e do LQ do método utilizado neste estudo.**

Matriz	$S_0$	$S'_0$	LD [µg/L]	LQ [µg/L]
Água ultrapura	0,0609	0,0351	0,11	0,35
Água natural	0,0705	0,0407	0,12	0,41

$S'_0$  Desvio padrão corrigido

$S_0$  Desvio padrão das leituras de cada amostra

LD Limite de detecção

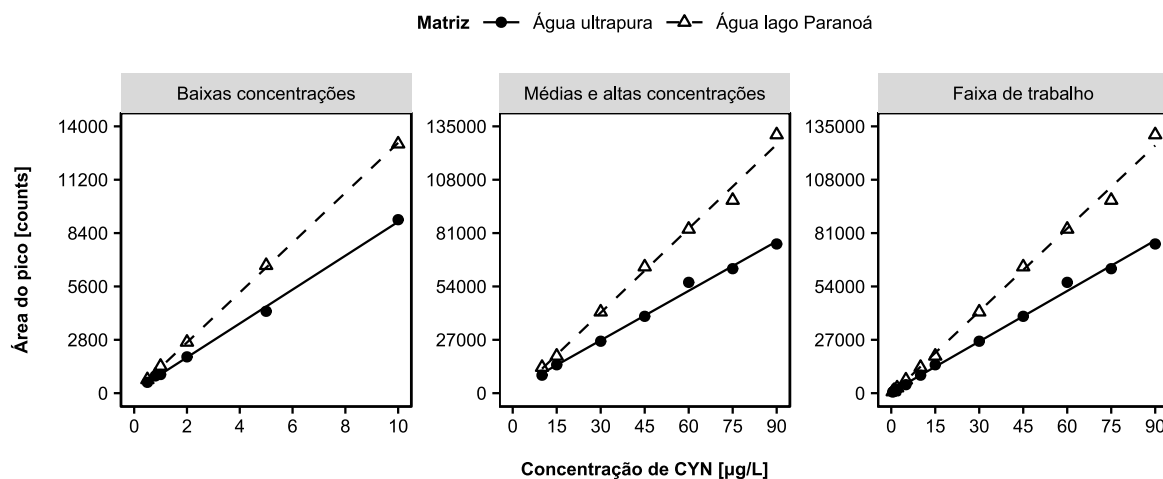
LQ Limite de quantificação

A Figura 5 mostra as relações lineares entre a concentração de CYN e a área do pico obtida em cada faixa de concentração testada. A comparação das matrizes revelou que, para a mesma concentração, a área do pico é maior na matriz de água natural, possivelmente devido aos compostos presentes que podem intensificar o sinal. A linearidade foi testada em momentos diferentes para cada matriz, o que pode ter causado variações na separação cromatográfica devido à volatilização do  $\text{CH}_3\text{COOH}$  da fase móvel.

Apesar das diferenças na relação concentração  $\times$  área do pico, ambas as matrizes apresentaram um ajuste linear com coeficiente de determinação superior a 0,99, demonstrando que o método é linear para uma faixa de trabalho entre 0,5 e 90 µg/L. A Tabela 4 apresenta os coeficientes de determinação para cada faixa de concentração e para cada matriz aquosa.



**Figura 5: Regressões obtidas na verificação da linearidade do método em diferentes faixas de concentração de CYN para as matrizes de água ultrapura e de água natural superficial avaliadas.**



**Tabela 4: Coeficientes de determinação das regressões lineares obtidas para cada faixa de trabalho e para cada matriz avaliada neste estudo.**

Faixa de concentrações	Matriz	
	Água ultrapura	Água natural
De 0,5 a 10 µg/L	0,9984	0,9996
De 10 a 90 µg/L	0,9940	0,9930
De 0,5 a 90 µg/L	0,9968	0,9963

O viés do método foi avaliado para verificar as diferenças entre a concentração medida e a concentração de referência. Uma ANOVA de dois fatores identificou a principal fonte de variação dos dados, que pode influenciar o viés do método.

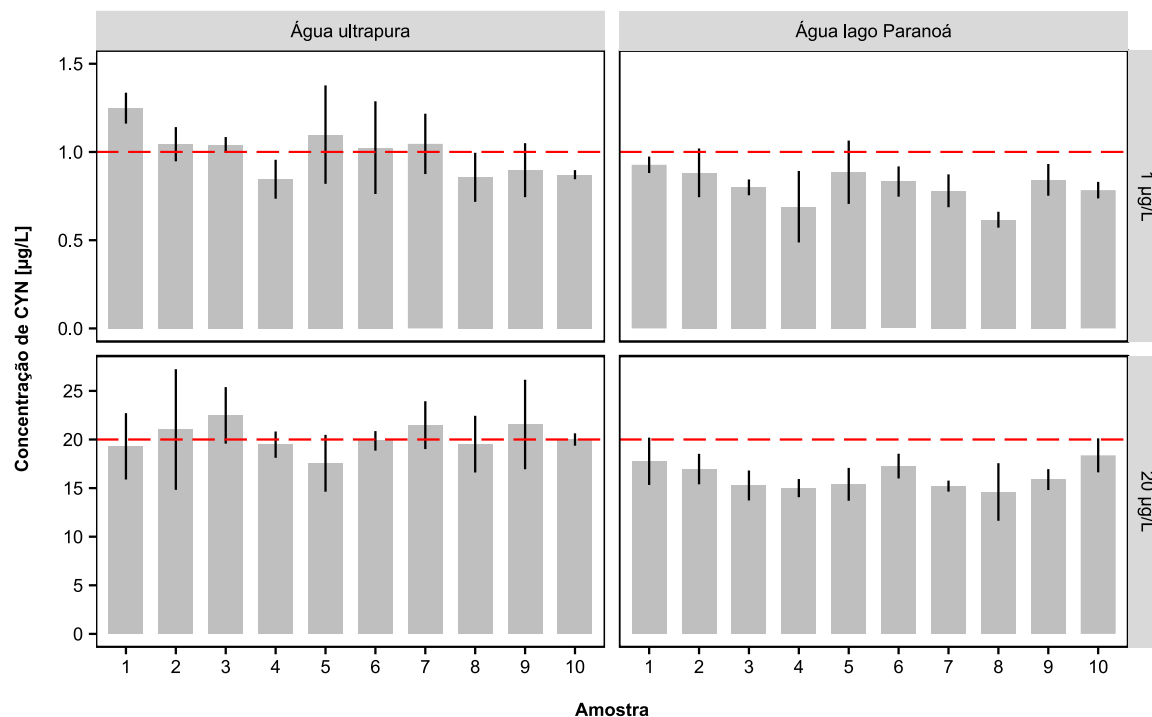
A Figura 6 apresenta as concentrações medidas em cada amostra, separadas por matriz e por faixa de concentração. Os resultados mostraram que as medições na matriz de água ultrapura estavam mais próximas do valor de referência. As concentrações médias das amostras da matriz de água natural superficial foram inferiores ao referencial, possivelmente devido ao tempo decorrido entre as análises e a fatores como mudança da fase móvel e limpeza da coluna de cromatografia.

A ANOVA de dois fatores (Tabela 5) revelou que a principal fonte de variação foi a concentração de CYN na amostra, responsável por 93,53% da variação total, sugerindo que a precisão do método está mais relacionada à faixa de concentração do que à matriz aquosa.

A recuperação aparente foi superior a 80% em todos os casos, superando o limite de 20% estabelecido para o viés, conforme Guzmán-Guillén *et al.* (2012). A matriz de água ultrapura teve maior recuperação, com valores de 99,72% e 101,12% para as concentrações de 1 e 20 µg/L, respectivamente, enquanto a matriz de água natural teve recuperação entre 80% e 81%, mantendo um viés inferior a 20%.



**Figura 6: Resultados das medições de concentração de CYN nas amostras para a determinação do viés do método em diferentes faixas de concentração para cada matriz aquosa avaliada.**



**Tabela 5: Resultado da ANOVA de dois fatores para a identificação da fonte de variação dos dados na análise do viés do método utilizado neste trabalho**

Efeito	Percentual da variação total	Valor $p$	Significância ( $p < 0,05$ )
Matriz de água	1,41%	$2,31 \times 10^{-9}$	****
Concentração de CYN na amostra	93,53%	$6,23 \times 10^{-83}$	****
Matriz de água × Concentração de CYN na amostra	1,17%	$3,84 \times 10^{-8}$	****

\*\*\*\* Diferença altamente significativa em um nível de confiança excepcionalmente alto

A robustez foi avaliada para medir a capacidade do método em realizar medições confiáveis diante de mudanças nas condições operacionais. Uma ANOVA de quatro fatores identificou e classificou a influência de cada condição operacional testada. A concentração do modificador da fase móvel teve um papel significativo na robustez do método, influenciando 13,20% da variabilidade total, com um valor  $p$  de 0,011. Esta influência foi relevante na avaliação do viés, onde o tempo entre as análises pode ter alterado a concentração do modificador devido à volatilização do  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Os demais fatores e suas interações tiveram contribuições menores, cada um responsável por menos de 6% da variação total. Em síntese, o método demonstrou robustez frente às variações de temperatura e pH das amostras, bem como em sua aplicação por diferentes analistas. Contudo, é importante adotar cuidados na preparação da fase móvel, pois variações na concentração do  $\text{CH}_3\text{COOH}$  podem comprometer a robustez do método.

## CONCLUSÕES

O método de detecção e quantificação de CYN por CL-EM/EM demonstrou ser seletivo, linear e robusto na validação realizada neste estudo. O método implementado apresentou uma faixa de trabalho adequada para as necessidades dos sistemas de tratamento de água e para o monitoramento da qualidade da água de corpos hídricos, atendendo aos limites de detecção e quantificação exigidos.



A robustez do método foi uma característica de desempenho, que se destacou pela influência do modificador da fase móvel. Observou-se que a variação na concentração deste componente pode impactar a precisão dos resultados obtidos, sendo recomendável a utilização da fase aquosa o mais fresca possível, para minimizar possíveis variações e garantir a confiabilidade das medições. Essa recomendação é especialmente relevante para laboratórios que realizam análises contínuas e ao longo de períodos extensos de tempo, em que a qualidade dos reagentes é essencial para manter a precisão das análises.

Adicionalmente, o método também mostrou potencial para identificar a variante 7-desoxiCYN. A capacidade de detectar esta variante amplia a aplicabilidade do método, permitindo um monitoramento mais abrangente das diferentes variantes da cianotoxina, que podem estar presentes no ambiente aquático, em sistemas de tratamento de água e na água tratada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BARWICK, V.J. (ed.). Planning and reporting method validation studies – Supplement to Eurachem guide on the fitness for purpose of analytical methods 1ed. Teddington, Middlesex, UK: LGC, 2019. 26 p.
- 2 GUZMÁN-GUILLÉN, R., PRIETO ORTEGA, A.I., GONZÁLEZ, A.G., SORIA-DÍAZ, M.E., CAMEÁN, A.M. Cyindrospermopsin determination in water by LC-MS/MS: optimization and validation of the method and application to real samples. *Environ Toxicol Chem*, v.31, n.10, p. 2233-2238, Oct 2012.
- 3 HAWKINS, P.R., CHANDRASENA, N.R., JONES, G.J., HUMPAGE, A.R., FALCONER, I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon*, v.35, n.3, p. 341-346, 1997.
- 4 HUMPAGE, A.R., FALCONER, I.R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol*, v.18, n.2, p. 94-103, Apr 2003.
- 5 LI, R., CARMICHAEL, W.W., BRITTAIN, S., EAGLESHAM, G.K., SHAW, G.R., MAHAKHANT, A., NOPARATNARAPORN, N., YONGMANITTHAI, W., KAYAF, K., WATANABE, M.M. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*, v.39, n.7, p. 973-980, 2001.
- 6 MAGNUSSON, B., ÖRNEMARK, U. (ed.). Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. 2 ed. Teddington, Middlesex, UK: LGC, 2014. 62 p.
- 7 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. : Diário Oficial da União. 888/2021: 21 p. 2021.
- 8 NORRIS, R.L., EAGLESHAM, G.K., PIERENS, G., SHAW, G.R., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K., SEAWRIGHT, A.A., MOORE, M.R. Deoxycylindrospermopsin, an Analog of Cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, v.14, n.1, p. 163-165, 1999.
- 9 SEIFERT, M., MCGREGOR, G.B., EAGLESHAM, G.K., WICKRAMASINGHE, W., SHAW, G.R. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*, v.6, n.1, p. 73-80, 2007.
- 10 TERAOKA, K., OHMORI, S., IGARASHI, K., OHTANI, I., WATANABE, M.F., HARADA, K.-I., ITO, E., WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*, v.32, n.7, p. 833-843, 1994.
- 11 U.S. EPA. Determination of cylindrospermopsin and anatoxin-a in drinking water by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). : United States Environmental Protection Agency. 545: 34 p. 2015.
- 12 WHO. Cyanobacterial toxins: cylindrospermopsins. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO). WHO/HEP/ECH/WSH/2020.4: 31 p. 2020.