



Desenvolvimento e Optimização de uma Metodologia Analítica para a Determinação de α - e β -Amanitina em urina humana por LC-MS/MS

Marta Sofia Carvalho Ferreira Malheiro Leite

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Desenvolvimento e Optimização de uma
Metodologia Analítica para a Determinação de
 α - e β -Amanitina em urina humana por LC-
MS/MS**

Marta Sofia Carvalho Ferreira Malheiro Leite

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em
Química, área de especialização em Química Forense**

Fernando Jorge Ramos

Alberto António Caria Canelas Pais

Helena Maria Sousa F. Teixeira

Setembro 2011

Universidade de Coimbra

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	i
ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
PARTE I – REVISÃO DA LITERATURA	1
CAPÍTULO I – Intoxicação por amatoxinas	3
1. <i>Introdução</i>	5
2. <i>Origem, ocorrência e mortalidade</i>	6
3. <i>Características físico-químicas</i>	8
4. <i>Mecanismo de acção</i>	10
5. <i>Toxicocinética</i>	13
6. <i>Toxicidade</i>	14
7. <i>Características clínicas</i>	15
7.1. <i>Patogénese</i>	15
7.2. <i>Percurso clínico</i>	15
CAPÍTULO II – Metodologia analítica para determinação de amatoxinas em amostras biológicas	19
1. <i>Matrizes biológicas</i>	21
1.1. <i>Urina</i>	22
2. <i>Metodologias analíticas para extracção de amatoxinas de matrizes biológicas</i>	23
2.1. <i>Precipitação de proteínas por solventes orgânicos</i>	24
2.2. <i>Extracção em fase sólida</i>	25

ÍNDICE GERAL

3. Metodologias analíticas para determinação de amatoxinas	31
3.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa .	33
3.1.1. Cromatografia líquida	33
3.1.2. Espectrometria de massa sequencial	34
CAPÍTULO III – Validação de metodologias analíticas.....	37
1. Introdução.....	39
2. Definição dos parâmetros de validação	40
2.1. Especificidade/Selectividade.....	40
2.2. Linearidade.....	40
2.3. Limiares analíticos do método de ensaio	41
2.3.1. Limite de detecção (LD)	41
2.3.2. Limite de quantificação (LQ).....	42
2.4. Recuperação	43
2.5. Precisão	43
PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL	45
CAPÍTULO I – Estudos preliminares	47
1. Introdução.....	49
2. Estudos realizados por HPLC-UV.....	49
2.1. Optimização da fase móvel	49
2.1.1. Resultados e observações	53
2.2. Procedimentos extractivos e purificativos	55
2.2.1. Resultados e observações	59
3. Estudos realizados por UPLC-MS/MS	60
3.1. Optimização da fase móvel	60
3.1.1. Resultados e observações	61
3.2. Procedimentos extractivos e purificativos	62
3.2.1. Resultados e observações	63
3.3. Padrão interno	64
3.3.1. Resultados e observações	66
CAPÍTULO II – Determinação analítica laboratorial	69
1. Introdução.....	71

ÍNDICE GERAL

2. <i>Material e reagentes</i>	72
2.1. Substâncias estudadas	72
2.2. Reagentes	72
2.3. Material laboratorial	72
2.4. Amostras biológicas	73
3. <i>Preparação de soluções</i>	74
2.1. Soluções padrão e de trabalho	74
2.2. Fase móvel	74
4. <i>Estudo experimental</i>	75
4.1. Preparação das amostras biológicas	75
4.2. Precipitação de proteínas por solventes orgânicos	75
4.2.1. Procedimento de extracção	75
4.3. Extracção em fase sólida	77
4.3.1. Procedimento de extracção	77
4.4. Caracterização da metodologia analítica usada para identificação e confirmação das substâncias em estudo nas amostras biológicas	79
4.4.1. Sistema de LC-MS/MS	79
4.4.2. Condições de detecção	80
4.4.3. Condições cromatográficas	82
4.4.4. Ensaio efectuados	83
i) Identificação das substâncias	83
ii) Estudo de parâmetros de validação	87
5. <i>Aplicação do método analítico desenvolvido em amostras de casos reais</i>	96
5.1. Introdução	96
5.1.1. Informação clínica do caso em estudo	97
5.2. Resultados e discussão	97
 CAPÍTULO III – Discussão de resultados e conclusões	 101
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 109

ABREVIATURAS

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µm – micrometro

cc – centímetro cúbico

CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CE – Electroforese Capilar

CZE – Electroforese Capilar de Zona

DM – Matéria Seca

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

e.g. – *exempli gratia* (por exemplo)

ECD – Detecção Electroquímica

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ESI – Ionização por Electrospray

eV – electrovolt

g – grama

hnRNA – RNA nuclear heterogéneo

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-EC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Electroforese

Capilar

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector

Ultra-Violeta

IAC – Cromatografia de Imunoafinidade

INML, I. P. – Instituto Nacional de Medicina Legal, I. P.

INRB-LNIV – Instituto Nacional de Resíduos Biológicos – Laboratório

Nacional de Investigação Veterinária

kV – kilovolts

L – litro

L/hr – litro por hora

LC – Cromatografia Líquida

LC-ECD – Cromatografia Líquida acoplada a detector Electroquímico

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa

Sequencial

LD – Limite de Detecção

LD₅₀ – Dose letal a 50%

LDH – Lactato desidrogenase

LLE – Extracção Líquido-Líquido

LQ – Limite de Quantificação

ABREVIATURAS

m/z – razão massa/carga
mg – miligrama
mg/g – Miligrama por grama
mg/kg – Miligrama por quilograma
min. – minuto
mL – mililitro
mL/min. – mililitro por minuto
mm – milímetro
MRM – Monitorização de Reacções Múltiplas
mRNA – RNA mensageiro
MS – Espectrometria de Massa
MS/MS – Espectrometria de Massa Sequencial
ng/mL – Nanograma por mililitro
°C – graus celsius
p.a. – *pro analysis*
PVDF –
RIA – Radioimunoensaios
RNA – Ácido Ribonucleico
RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
rpm – Rotações por minuto
rRNA – RNA ribossómico
RT – Tempo de Retenção
SIM – Monitorização Selectiva de Iões
SPE – Extração em Fase Sólida
TLC – Cromatografia em Camada Fina
TNF – Factor de Necrose Tumoral
tRNA – RNA transferência
UV – Ultra-Violeta
V – volts
λ – Comprimento de onda

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para a otimização da fase móvel para análise de α - e β -amanitina por HPLC-UV..	51
Tabela 2 – Procedimentos de pré-tratamento e de extracção para a análise de α - e β -amanitinas em amostras de urina	57
Tabela 3 – Condições experimentais de fragmentação do detector MS/MS para determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina.....	81
Tabela 4 – Transições iónicas características dos compostos α - e β -amanitinas.	81
Tabela 5 – Condições experimentais do sistema LC para determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina.....	82
Tabela 6 – Gradiente de eluição para a fase móvel acetonitrilo (A): acetato de amónia (B), utilizado para determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina, no sistema LC.....	82
Tabela 7 – Identificação das transições iónicas e dos tempos de retenção característicos da α - e β -amanitinas.	83
Tabela 8 – Áreas relativas dos cinco níveis de fortificação de amostras de urina com α -amanitina, para estudo da lineariedade..	90
Tabela 9 - Áreas relativas dos cinco níveis de fortificação de amostras de urina com β -amanitina, para estudo da lineariedade	91
Tabela 10 – Média e desvio padrão das áreas relativas das 10 amostras brancas	92
Tabela 11 – LDs em diferentes amostras biológicas para a determinação de α - e β -amanitinas em diferentes amostras biológicas.	93
Tabela 12 - LQs em diferentes amostras biológicas para a determinação de α - e β -amanitinas em diferentes amostras biológicas.	93
Tabela 13 – Valores de recuperação obtidos a 3 níveis de fortificação para a α -amanitina em amostras de urina.	94
Tabela 14 - Valores de recuperação obtidos a 3 níveis de fortificação para a β -amanitina em amostras de urina	94
Tabela 15 - Valores médios obtidos em urina para a precisão em termos de CV, ao nível de concentração 10 ng/mL, para a α - e β -amanitina.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da α -amanitina (retirado de Ali Ahmed, 2010).....	9
Figura 2 - Estrutura química da β -amanitina (retirado de Ali Ahmed, 2010)....	10
Figura 3 – Modelo espacial de uma molécula de amatoxina: área concâva de ligação com os átomos envolvidos indicados (retirado de Vetter, 1997).	12
Figura 4 – Exemplo de cromatogramas obtidos a partir de uma amostra sujeita a um protocolo de preparação inadequado (cromatograma superior) e de uma amostra sujeita a um protocolo otimizado de SPE (cromatograma inferior) (retirado de Waters, 2011).	26
Figura 5 – Cromatogramas exemplificativos da melhoria de resolução do sinal com analito mais concentrado após SPE (retirado de Waters, 2011).	27
Figura 6 – Cromatogramas exemplificativos do processo de supressão iónica devido a um protocolo de preparação da amostra incompleto (retirado de Waters, 2011).	27
Figura 7 – Etapas do procedimento de SPE: acondicionamento da coluna (A), retenção do analito (B), lavagem da coluna (C) e eluição (D) (retirado de Jickells, 2008).	29
Figura 8 – Co-polímero de N-vinilpirrolidona-divinilbenzeno, característico de uma coluna <i>Oasis HLB</i> (Waters, 2011).	30
Figura 9 – Representação esquemática do MS/MS do tipo triplo quadrupolo. .	35
Figura 10 – Espectros de absorção da α -amanitina (A) e da β -amanitina (B)...	53
Figura 11 – Cromatograma de uma mistura de α - e β -amanitinas a 4 $\mu\text{g/mL}$, por HPLC-UV.	54
Figura 12 – Cromatograma iónico total (TIC) da eritromicina, obtido por injeção de 20 μL de uma solução padrão a 10 $\mu\text{g/mL}$	66
Figura 13 - Cromatograma iónico total (TIC) da eritromicina, obtido por injeção de 20 μL de uma amostra fortificada com α - e β -amanitina, a 100 ng/mL , isenta de padrão interno (eritromicina).	67
Figura 14 – Cromatograma da transição iónica mais intensa da α -amanitina (919.48 > 259.13), obtido por injeção de 20 μL de uma solução padrão a 50 ng/mL , com $\text{RT}=5.20$ min.	84
Figura 15 – Cromatograma da transição iónica mais intensa da β -amanitina (920.48 > 902.44), obtido por injeção de 20 μL de uma solução padrão a 50 ng/mL , com $\text{RT}=4.82$ min.	84
Figura 16 – Espectro de massa da fragmentação da molécula protonada de α -amanitina, obtido por injeção de 20 μL de uma solução padrão de α -amanitina a 50 ng/mL , com energia de colisão de 44 eV.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 17 - Espectro de massa da fragmentação da molécula protonada de β -amanitina, obtido por injeção de 20 μ L de uma solução padrão de α -amanitina a 50 ng/mL, com energia de colisão de 42 eV.	86
Figura 18 – (A) Cromatograma obtido da análise de uma amostra branca de urina e (B) cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina fortificada a 5 ng/mL (RT = 5.08), ambos referentes à transição iónica m/z 919.48 > 901.53 da α -amanitina.	88
Figura 19 - (A) Cromatograma obtido da análise de uma amostra branca de urina e (B) cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina fortificada a 5 ng/mL (RT = 4.78), ambos referentes à transição iónica m/z 929.48 > 902.44 da β -amanitina.	89
Figura 20 – Representação gráfica da curva de calibração da α -amanitina em amostras de urina, com cinco calibradores distribuídos entre 0 e 20 ng/mL.	90
Figura 21 – Representação gráfica da curva de calibração da β -amanitina em amostras de urina, com cinco calibradores distribuídos entre 0 e 20 ng/mL.	91
Figura 22 – Cromatogramas de (A) amostra real, (B) amostra branca e (C) amostra fortificada com α -amanitina a 100 ng/mL.	98
Figura 23 - Cromatogramas de (A) amostra real, (B) amostra branca e (C) amostra fortificada com β -amanitina a 100 ng/mL.	99

RESUMO

A colheita de cogumelos silvestres é uma prática ainda muito presente nos dias de hoje, por todo o mundo. Apesar do consumo da maioria dos cogumelos silvestres existentes ser inofensiva para o ser humano, existem algumas espécies que possuem na sua constituição substâncias tóxicas, cuja penetração no organismo, via tracto digestivo, causa o desenvolvimento de efeitos nocivos em diferentes tecidos.

O envenenamento por cogumelos *Amanita* é uma rara mas séria causa de intoxicação humana fatal. As amatoxinas, um grupo de octapeptídeos bicíclicos produzidas pela espécie *Amanita phalloides*, são responsáveis pela elevada toxicidade destes fungos, sendo a α -amanitina e a β -amanitina as toxinas letais maioritárias. Estas causam necrose celular, especialmente no fígado e nos rins, conduzindo à morte por falência hepática e insuficiência renal aguda.

O presente trabalho teve como objectivo o desenvolvimento, optimização e aplicação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), após um pré-tratamento para precipitação de proteínas por solvente orgânico e procedimento de extracção em fase sólida (SPE), para a determinação das amatoxinas α - e β -amanitina, em amostras de urina humana. Os parâmetros de validação definidos para este método englobaram linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), selectividade, sensibilidade, repetibilidade e recuperação da extracção, de forma a garantir fiabilidade nos resultados analíticos obtidos.

O método desenvolvido provou ser específico e selectivo, com valores de LD e LQ para a α -amanitina de 1.93 e 3.29 ng/mL e para a β -amanitina de 1.74 e 3.16 ng/mL, respectivamente. A linearidade estudada em amostras fortificadas foi satisfatória (0.97 para a α -amanitina e 0.98 para a β -amanitina) num intervalo de 5 a 20 ng/mL. A repetibilidade foi verificada ao nível de 10 ng/mL (n=3) de α -amanitina e β -amanitina em amostras de urina fortificadas, com coeficientes de variação obtidos de 3.68 e 2.33%, respectivamente. A recuperação do método extractivo desenvolvido apresentou bons resultados para as baixas concentrações

RESUMO

analisadas, com percentagens entre os 64 e 70% para a α -amanitina, e entre os 64 e 68% para a β -amanitina.

A metodologia descrita foi, posteriormente, aplicada a uma amostra real de urina de cadáver, disponibilizada pelo Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal (INML, I.P.). A análise da amostra forense em questão visou demonstrar a capacidade da metodologia desenvolvida para aplicação e implementação em casos reais de intoxicação por amatoxinas.

A metodologia analítica desenvolvida tanto a nível de extração, como de sistema cromatográfico, é inovadora, apresentando um elevado potencial na identificação e detecção de α - e β -amanitinas em amostras de urina. O método descrito poderá ser aplicável à determinação de α - e β -amanitinas a outras amostras biológicas, como fígado e rins.

Palavras-chave: α -Amanitina; β -Amanitina; Intoxicação; SPE; LC-MS/MS.

ABSTRACT

The practice of wild mushroom harvest is still present nowadays, all over the world. Although the consumption of the majority of the existing mushroom is harmless for the human being, there are some species containing toxic substances, whose penetration in the body, via the digestive tract, causes the development of noxious effects.

The *Amanita* mushroom poisoning is a rare but severe cause of human fatal intoxication. Amatoxins, a group of bicyclic octapeptides produced by *Amanita phalloides* species, are responsible for the high toxicity in this fungus, being the main lethal toxins α - and β -amanitin. They cause cellular necrosis, especially in the liver and kidneys, leading to death by hepatic failure and renal damage.

The present study was focused on the development, optimization and application of an analytical methodology by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), after sample preparation by protein precipitation with organic solvent, and solid phase extraction (SPE) procedure, for the determination of the amatoxins, α - and β -amanitin, in human urine samples. The validation parameters defined for this method were linearity, detection and quantification limits, selectivity, sensitivity, intra-assay precision and extraction recovery, in order to guarantee reliability in the analytical results.

The developed method proved to be specific and selective, with LD and LQ values for α -amanitin of 1.93 and 3.29 ng/mL and for β -amanitin of 1.74 e 3.16 ng/mL, respectively. The linearity studied on spiked samples was satisfactory (0.97 for α -amanitin and 0.98 for β -amanitin) from 5 to 20 ng/mL. The intra-assay precision was checked at 10 ng/mL (n=3) level of α -amanitin and β -amanitin in spiked urine samples, with resulting coefficients of variation of 3.68 e 2.33%, respectively. The extraction recovery presents good results for the low concentrations analyzed, with values between 64 and 70% for α -amanitin, and between 64 and 68% for β -amanitin.

ABSTRACT

The described methodology was, subsequently, applied to a real urine sample of a corpse, provided by the *Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal (INML, I.P.)*. The forensic sample analysis aimed to prove the ability of the method for application and implementation in real cases of amatoxin poisoning.

The developed analytical method, both in what regards the extraction process and also at the chromatographic system, is innovative, presenting a high potential in the identification and detection of α - and β -amanitins in urine samples. The described methodology could be applicable to the determination of α - and β -amanitins in other biological samples, such as liver and kidneys.

Key words: α -Amanitin; β -Amanitin; Poisoning; SPE; LC-MS/MS.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernando Jorge Ramos, ao Professor Alberto António Caria Canelas Pais e à Professora Helena Maria de Sousa Ferreira e Teixeira, um agradecimento e um profundo reconhecimento por terem aceite orientar esta tese e pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Jorge Barbosa, à Andreia, ao Bruno e à Salete, do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, o meu sincero agradecimento pela forma como me acolheram no LNIV, e pela abertura possível dos meios e técnicas necessários à realização desta tese. Um especial reconhecimento por toda a disponibilidade, apoio e amizade dispensados nesta passagem atribulada, assim como pelas críticas preciosas e rigorosas que me ajudaram a ultrapassar os obstáculos encontrados.

A todos aqueles que trabalharam comigo no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia, em especial, à Priscilla, à Sara, à Sofia e à Soraia, por todo o apoio dispensado e pela amizade, alegria e carinho transmitidos.

Aos meus pais, irmãos e avós, por me terem possibilitado ser quem sou e como sou. Os meus sinceros agradecimentos por me terem acompanhado nesta importante passagem da minha vida, pela força e confiança que em mim depositaram. Por todo o apoio, paciência, sacrifícios e coragem que sempre me demonstraram e que não me fizeram desistir.

A todos os familiares e amigos que me acompanharam e apoiaram durante esta etapa atribulada, o meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos pais do Rui, Sr. Abel e D. Virgínia, o meu muito obrigado por me receberem sempre de braços abertos e por todo o apoio, compreensão, amizade e interesse demonstrados ao longo dos anos.

Ao Rui, com quem estabeleci uma relação de dedicação ao longo deste percurso, agradeço o seu companherismo, motivação e força diariamente transmitidos ao longo destes anos. Pela compreensão incondicional, paciência, esforço e sacrifícios, o meu reconhecido e carinhoso obrigado.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado.

PARTE I

REVISÃO DA LITERATURA

CAPITULO I

INTOXICAÇÃO POR AMATOXINAS

1. Introdução

Embora o consumo da maioria dos cogumelos existentes seja inofensivo para o ser humano, existem algumas espécies constituídas por substâncias tóxicas, cuja penetração no organismo, por via digestiva, provoca o desenvolvimento de efeitos nocivos nos diferentes tecidos.

Ao longo dos anos, apesar das tentativas para se definirem diferentes formas de distinguir os cogumelos comestíveis dos venenosos, nenhuma se revelou segura e, embora muitas pessoas erradamente acreditem que se podem basear em regras viáveis para estabelecer essa distinção, a única maneira de garantir que um determinado tipo de cogumelo é comestível no momento da colheita é o seu conhecimento prévio. De facto, o desconhecimento e as citadas convicções erradas, mais do que as eventuais confusões, constituem as principais causas de intoxicação por cogumelos venenosos, um problema relativamente frequente, sobretudo, nas regiões de floresta onde crescem cogumelos silvestres e onde o hábito de colheita e consumo é muito comum.

As toxinas dos cogumelos venenosos são produzidas naturalmente por eles, e cada espécie tem a sua própria toxina. A maioria dos cogumelos que pode causar intoxicação em humanos não perde o seu efeito tóxico por cozedura, congelamento ou outro método de processamento. A prevenção consiste em evitar o consumo de espécies tóxicas. As intoxicações ocorrem quando indivíduos recolhem cogumelos selvagens, confundindo-os com cogumelos comestíveis ou quando consomem intencionalmente cogumelos com compostos psicoactivos porque desejam estes efeitos.

Este tipo de intoxicações são geralmente agudas e manifestam-se por uma variedade de sintomas e prognósticos, dependendo da quantidade e espécie consumida. Como a constituição química de muitas toxinas é ainda desconhecida e a identificação de cogumelos, muitas vezes difícil ou impossível, estas intoxicações são geralmente classificadas pelos seus efeitos fisiológicos.

Desconsiderando os cogumelos que contêm substâncias psicoactivas, a ingestão de fungos tóxicos é invariavelmente accidental. Apenas por excepção, as intoxicações

por cogumelos são suicidas ou de origem homicida (Karlson-Striber e Persson, 2003). A dimensão médica do problema está relacionada com o facto de alguns cogumelos conterem toxinas excepcionalmente potentes. Para além disso, uma refeição normal com cogumelos pode expor um indivíduo a uma dose letal da toxina.

A maioria dos casos fatais de intoxicação por cogumelos venenosos no Mundo ocorre após a ingestão de espécies *Amanita*, primariamente da *Amanita phalloides*. Os agentes tóxicos desta espécie constituem um grupo de compostos toxicológicos denominados amatoxinas, as quais são letais num período entre 2 a 8 dias (Vetter, 1997). Estas toxinas representam uma família de toxinas de baixo peso molecular composta por nove octapeptídeos bicíclicos, com ligeiras diferenças entre elas a nível da estrutura e da actividade biológica. Os principais peptídeos desta família, e os que apresentam toxicidade mais elevada, são a α - e β -amanitina, uma vez que representam a maior percentagem de conteúdo amatotóxico na *Amanita phalloides*.

A intoxicação por estas toxinas é um problema a nível mundial, uma vez que todos os anos são reportados casos fatais por ingestão de cogumelos venenosos, sendo 90% dos casos causados pela espécie *Amanita phalloides*. Torna-se, assim, importante o desenvolvimento de um método analítico rápido, sensível e robusto para a determinação de amatoxinas, especificamente da α - e da β -amanitina, principais responsáveis pelos danos hepáticos e renais fulminantes característicos deste tipo de intoxicações.

2. Origem, ocorrência e mortalidade

Os cogumelos venenosos mais prováveis de causar fatalidades são aqueles que apresentam na sua constituição amatoxinas, uma família de ciclopeptídeos hepatotóxicos. Três famílias de fungos, *Amanitaceae* (género *Amanita*), *Agaricaceae* (género *Lepiota*), e *Cortinariaceae* (género *Galerina*), são conhecidas por conter estas toxinas hepatotóxicas, sendo esta última a família de cogumelos com menor conteúdo destes componentes (Karlson-Striber e Persson, 2003).

CAPITULO I – INTOXICAÇÃO POR AMATOXINAS

As espécies *Amanita* que contêm amatoxinas são, especificamente, a *Amanita phalloides*, *A. virosa*, *A. verna*, *A. ocreata*, *A. bisporigera*, *A. suballiacea*, *A. tenuifolia*, e *A. hygroskopica*. Os conteúdos de toxina são variáveis entre diferentes espécies e também numa mesma espécie em particular. Das espécies enumeradas, a *Amanita phalloides* é a que apresenta o mais elevado conteúdo/peso de toxina. Por outro lado, as espécies *Lepiota* com conteúdo amatotóxico apresentam igualmente uma toxicidade elevada, mas estão mais raramente envolvidas em intoxicações humanas que as espécies *Amanita* (Karlson-Stiber e Persson, 2003).

A distribuição e as mudanças na concentração de toxinas nos cogumelos são factores muito importantes. Segundo a literatura, existe uma elevada variabilidade no conteúdo de toxinas entre espécies recolhidas na mesma região. De acordo com Vetter (1997), a *Amanita phalloides* na Europa contém uma média de 2.2 e 2.6 mg/g DM (*dry matter*) de α - e β -amanitina, respectivamente, enquanto que na América do Norte contém 1.6 e 1.7 mg/g, respectivamente.

Evidências históricas sugerem que pelo menos três imperadores romanos e um Papa estão entre as vítimas de intoxicação por cogumelos (Li e Oberlies, 2005). Mesmo nos tempos modernos, foi estimado que cerca de 90% dos casos letais publicados por intoxicação causada por consumo de cogumelos, especialmente na Europa Central e América do Norte, são devidas a uma das espécies mais venenosas do género *Amanita*, o notório chapéu da morte (*Amanita phalloides*). A mortalidade é bastante elevada, mas têm vindo a decrescer gradualmente ao longo das décadas.

A incidência de intoxicações por cogumelos varia muito por todo o Mundo dependendo das tradições locais, estilos de vida, factores nutricionais, clima e ocorrência de cogumelos selvagens. Existem diferenças geográficas consideráveis quando se prende com a ocorrência de intoxicações por amatoxinas.

Este tipo de intoxicações é mais prevalente na Europa, com diversos relatos de casos já publicados. Num estudo com 205 casos de intoxicação por amatoxinas tratados na Europa Central no período de 1971 a 1980, a mortalidade global rondou os 22.4%, e, em crianças com idade inferior a 10 anos, os 51,3% (Karlson-Stiber *et al*, 2003). Em França, de 45 pacientes tratados nos anos de 1984 a 1989, a mortalidade global foi de 17.8% e, em crianças com idade inferior a 10, de 33.3%

(Jaeger *et al*, 1993). Uma taxa de mortalidade global muito superior (40%) foi observada num estudo búlgaro incluindo 25 pacientes tratados num período entre 1991-1998 (Iliev *et al*, 1999).

Apesar deste fungo existir principalmente na Europa, alguns dados têm sido publicados sobre a sua ocorrência e incidência de intoxicações noutras partes do Mundo, *e.g.*, Tailândia, Sul de África, Malásia, Chile, México, Índia, Austrália e América do Norte (Vetter, 1997; Karlson-Stiber *et al*, 2003).

3. Estrutura e propriedades físico-químicas

A investigação química das toxinas da espécie *Amanita* parece remontar a 1899. Contudo, as análises estruturais dos compostos isolados desta espécie, especialmente os peptídeos, apenas se tornaram conhecidos décadas depois, provavelmente devido aos avanços nas técnicas modernas de espectroscopia e espectrometria (Li e Oberlies, 2005). As estruturas dos compostos publicados da *Amanita* até à data podem ser subdivididos em seis categorias: peptídeos, amavidina, isoxazolatos, aminoácidos simples e derivados, esteróis, e ceramidas.

Os tipos estruturais dos compostos da *Amanita phalloides* englobam peptídeos, esteróis e aminoácidos simples (Li *et al*, 2005), tendo sido publicados, pelo menos, 22 componentes químicos. Os agentes tóxicos desta espécie são octapeptídeos, os quais formam dois grupos de compostos toxicologicamente diferentes: as amatoxinas e as falotoxinas (Karlson-Stiber *et al*, 2003), sendo as primeiras 10 a 20 vezes mais tóxicas (Li *et al*, 2005). De facto, uma vez que as falotoxinas não exercem nenhuma toxicidade aguda após ingestão pois não são provavelmente absorvidas, os seus efeitos em intoxicações humanas são irrelevantes (Karlson-Stiber *et al*, 2003), concluindo-se que as amatoxinas são provavelmente os compostos responsáveis pelas intoxicações fatais (Wieland *et al*, 1978) e as únicas com importância clínica pós-ingestão.

Estes peptídeos constituem um dos primeiros grupos de toxinas a ser identificado, e, desde então, diferentes amatoxinas foram isoladas, sendo as

CAPITULO I – INTOXICAÇÃO POR AMATOXINAS

principais, a α - e β -amanitinas. Estas são termoestáveis e não podem ser removidas ou destruídas por aquecimento (Karlson-Stiber *et al*, 2003). Himmelman *et al* (2001) descreveram um caso fatal de intoxicação com *Amanita phalloides* a partir de cogumelos conservados no congelador durante 7-8 meses, o que revela a estabilidade das amanitinas sob tais condições. Maurer *et al* (2000) mediram, ainda, a estabilidade das amatoxinas em amostras de urina congeladas por mais de 6 meses.

Estruturalmente, as amatoxinas são caracterizadas como peptídeos bicíclicos, os quais contêm um resíduo de triptofano substituído na posição 2 do anel indol por um átomo de enxofre, o qual estabelece a ligação no composto biciclíco, e alguns aminoácidos hidroxilados pouco comuns (Vetter, 1997; Li *et al*, 2005).

As únicas diferenças estruturais entre α - e β -amanitina encontram-se num grupo substituído, em que a α -amanitina possui um grupo $-\text{NH}_2$ e a β -amanitina, por seu lado, possui um grupo $-\text{OH}$ (ilustrações 1 e 2); por esta razão, a α -amanitina é neutra, enquanto que a β -amanitina é acídica.

As estruturas da α - e β -amanitina estão representadas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

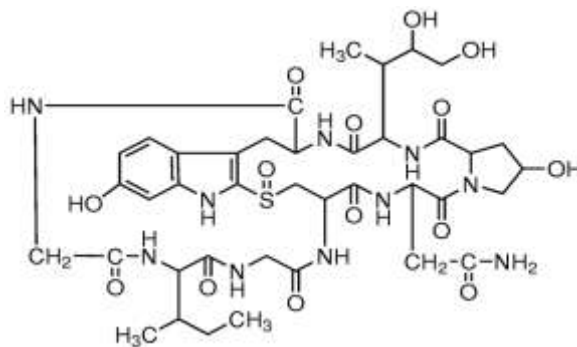


Figura 1 – Estrutura química da α -amanitina (retirado de Ali Ahmed, 2010).

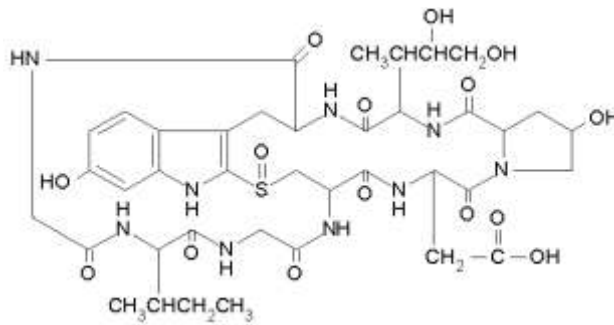


Figura 2 - Estrutura química da β -amanitina (retirado de Ali Ahmed, 2010).

4. Mecanismo de acção

Das diversas toxinas isoladas de extractos de cogumelos venenosos, as amatoxinas são os venenos mais potentes a ter em conta para os efeitos tóxicos nas células do epitélio intestinal e nos hepatócitos, e provavelmente a causa única das intoxicações humanas fatais, uma vez que foi descrito que os sintomas comuns destas intoxicações podem ser mimetizados com amatoxinas puras (Piqueras, 1989).

Hoje em dia, está bem estabelecido que as amatoxinas interferem com o processo de transcrição do DNA por inibição da RNA polimerase II em células eucarióticas, com uma constante de inibição de 2×10^{-4} (Wieland *et al*, 1991). Em estudos experimentais, foi observado que 10 ng/mL de amanitina inibe a actividade da RNA polimerase II em 60-70% (Vetter, 1997). Em consequência, ocorre um decréscimo progressivo no conteúdo de Ácido Ribonucleico mensageiro (mRNA) durante as primeiras 24 horas de intoxicação, resultando numa marcada inibição da síntese proteica e subsequentemente induzindo perturbações a nível nuclear e citoplasmático, com morte celular (Wieland, 1983). Este dano irá primeiramente atacar as células que fornecem um dispositivo de transporte, e os órgãos-alvo principais são – por ordem cronológica – a mucosa intestinal, os hepatócitos do fígado e os túbulos proximais dos rins. A lesão mais crítica é a necrose celular, evidenciando-se mudanças celulares que causam a fragmentação e segregação de todos os componentes nucleares (Vetter, 1997).

Os vários tipos de RNA polimerases de organismos eucarióticos diferem largamente na sua sensibilidade a estas toxinas. As RNA polimerases do tipo II, existentes no núcleo de todas as células eucarióticas e responsáveis pela transcrição do DNA para formar o RNA nuclear heterogéneo (hnRNA), designado de mRNA após processamento, interagem fortemente com as amatoxinas, formando um complexo firme e rigoroso (Karlson-Stiber e Persson, 2003). Por outro lado, as enzimas de transcrição do tipo I, as quais transcrevem a subunidade 45S do RNA, precursor das subunidades 18S e 28S do RNA ribossómico (rRNA), não apresentam qualquer resposta à acção das amatoxinas, mesmo na presença de elevadas concentrações de toxina. As RNA polimerases III, as quais são responsáveis pela síntese de RNA transferência (tRNA), especificamente das subunidades 4.5S e 5S, e de RNA de baixo peso molecular, por contraste, são 10^3 a 10^4 vezes menos sensíveis às amatoxinas. Em células procarióticas, assim como nas mitocôndrias, cloroplastos, e vírus, as RNA polimerases II, tal como as RNA polimerases III em células eucarióticas, não são susceptíveis à acção destas toxinas (Wieland *et al*, 1991; Vetter, 1997). Nos fungos, foi determinado que estas enzimas são 50 vezes menos sensíveis, sendo a *Amanita phalloides* resistente ao seu próprio inibidor (Vetter, 1997).

O mecanismo molecular de acção das amatoxinas foi primeiramente descrito por Luigi Fiume e seus colegas em Bolonha, Itália, em meados de 1960, onde estes observaram um contínuo decréscimo do conteúdo de RNA do núcleo celular do parênquima hepático de ratos intoxicados com α -amanita (Wieland *et al*, 1991). Posteriormente, verificou-se, em estudos realizados igualmente em células isoladas de núcleos de fígado, que a justificação para este facto se devia a uma forte inibição da síntese de RNA (Wieland *et al*, 1991), do tipo não competitivo (Vetter, 1997). Vinte anos mais tarde, Wieland *et al* (1981) descobriram que o processo de ligação entre as amatoxinas e a RNA polimerase II ocorre primariamente através de um dos lados da molécula de amatoxina, especificamente o lado concavo do macrociclo de 24 membros. Os grupos de interacção deste local de ligação, de acordo com essas experiências, são o grupo γ -hidroxilo (05) da γ,δ -dihidroxi-leucina-3, a molécula de oxigénio (08) da 2-hidroxi-prolina, as moléculas de oxigénio dos grupos carbonilo

(O7 e O11), e os carbonos metilícos C35 e C37 da 6-isoileucina (Vetter, 1997), como visualizado na figura 3. A ligação entre uma única molécula de amatoxina e a RNA polimerase II é suficiente para inibir o processo de transcrição.

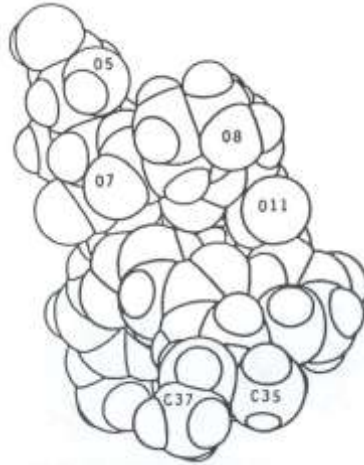


Figura 3 – Modelo espacial de uma molécula de amatoxina: área concâva de ligação com os átomos envolvidos indicados (retirado de Vetter, 1997).

Uma investigação detalhada dos passos individuais do processo de transcrição revela que as amatoxinas inibem o passo de alongação. Tal conclusão surgiu pelo facto da enzima, na presença de amanitina produzir dinucleótidos, mas já não possuir a capacidade de formar trinucleótidos (Wieland *et al*, 1991). Evidentemente, a ligação da amanitina à RNA polimerase II bloqueia o movimento da proteína ao longo da molécula de DNA de cadeia única.

No desenvolvimento deste tema, outros mecanismos de toxicidade têm vindo a ser propostos. Foi documentada a existência de uma interacção sinérgica entre a α -amanitina e citocinas endógenas (*e.g.* factor de necrose celular), a qual causa o aumento do complexo TNF-mRNA hepático com subsequente indução da apoptose a nível dos hepatócitos (Leist *et al*, 1997; Karlson-Stiber *et al*, 2003).

5. Toxicocinética

As amatoxinas são rapidamente absorvidas e foram num caso de intoxicação humana detectadas na urina num período de 90-120 min. pós-ingestão (Homann, *et al.*, 1986). A distribuição para outros compartimentos é também ela relativamente rápida com um tempo de semi-vida no plasma, em cães, de 27-50 min. e com uma dose excretada pela urina de 80% num período de 6 horas (Faulstich *et al.*, 1985). Em intoxicações humanas, as amatoxinas são apenas, por excepção, detectadas no plasma após 36 a 48 horas, e, posteriormente, de forma geral, devido a um factor de comprometimento como a insuficiência renal (Vesconi, 1985; Jaeger *et al.*, 1993).

As toxinas não se ligam a proteínas plasmáticas, circulando livremente no plasma, e no caso dos cães o volume de distribuição corresponde ao do espaço extracelular (Faulstich *et al.*, 1985). Em estudos experimentais, não foram detectados quaisquer metabolitos, não existindo metabolismo conhecido destas toxinas (Faulstich *et al.*, 1985; Filigenzi, 2007).

A via mais importante de eliminação é a via renal, e a excreção pode continuar durante 2-3 dias. Pelo facto de as amatoxinas serem detectadas na urina após não serem mais detectadas no plasma deve-se a um considerável *uptake* das toxinas que se encontram ligadas ao tecido renal. Em fases precoces da intoxicação, as concentrações de urina são 10 a 100 vezes superiores na urina do que no sangue, e a eliminação renal total das amatoxinas pode quantificar-se em 5 mg (Jaeger *et al.*, 1993).

São encontrados elevados níveis de toxinas no fluido gastroduodenal, mas, como o volume total de fluido não é significativo, esta via de eliminação torna-se menos importante (Jaeger *et al.*, 1993). Verifica-se, por outro lado, uma reciclagem enterohepática das toxinas, o que pode levar a implicações terapêuticas. Quantidades elevadas de toxina são igualmente localizadas nas fezes durante alguns dias. No entanto, isto poderá dever-se, parcialmente, à passagem de toxina não absorvida (Jaeger *et al.*, 1993).

Foi, ainda, estabelecido a presença de altas concentrações de amatoxinas nos tecidos do fígado e rim num período tão tardio como 9 e 22 dias pós-ingestão

(Jaeger *et al.*, 1993), sendo que os níveis de toxinas a nível do fígado são muito mais elevados comparativamente aos níveis encontrados nos rins.

6. Toxicidade

As amatoxinas são venenos altamente poderosos, e uma quantidade tão pequena como 0.1 mg/kg de peso corporal pode ser uma dose letal para adultos humanos (Faulstich, 1980). A ingestão de um cogumelo maduro da espécie *Amanita phalloides* de 20-25 g significaria uma exposição a 5-8 mg de amatoxinas, o que poderá ser fatal. As crianças são consideradas como um grupo mais sensível a estas toxinas, o que se deverá apenas a uma questão de relação dose/peso corporal.

A LD₅₀ das amatoxinas é de 0.3-0.7 mg/kg após administração a ratos brancos comparada com o valor correspondente de LD₅₀ das falotoxinas de 1.5-3 mg/kg (Wieland, 1983). Outros autores consideram que para algumas espécies animais este valor é de 0.4-0.8 mg/kg para as amatoxinas (Vetter, 1997). Especificamente, a LD₅₀ para a α -amanitina assume um valor de 0.3 mg/kg, enquanto que a β -amanitina apresenta um valor de 0.5 mg/kg (Vetter, 1997).

Em termos gerais, a absorção destas toxinas pelo tracto intestinal varia entre diferentes espécies animais, sendo que os roedores não são afectados de todo enquanto que os seres humanos, os cães e os porcos-da-índia rapidamente absorvem a toxina (Wieland, 1983).

As amatoxinas causam necrose de órgãos susceptíveis: o fígado em todos os animais, e os túbulos proximais nos rins de ratos. A necrose celular é consequência da cessação da síntese proteica devido à inibição da síntese de RNA, não por interacção com a molécula de DNA molde, mas por interacção com a própria enzima responsável pelo processo de transcrição. As mudanças estruturais induzidas no núcleo celular tratado com amatoxinas foram descritas por diversos autores, não apenas para o fígado e para os rins, mas também para células fasciculadas adrenais de ratos, isto é, fragmentação e segregação de todos os componentes celulares, condensação da cromatina e aparecimento de grânulos pericromatídeos. O núcleo é

quebrado em muitos fragmentos, 30 min. após administração de amanitinas. No entanto, a causa para estas mudanças nucleares não é claramente percebida (Vetter, 1997).

De forma conclusiva, apenas as amatoxinas revelam interesse para a investigação química, uma vez que as falotoxinas não apresentam qualquer papel nas intoxicações humanas por cogumelos venenosos por não serem absorvidas pelo tracto gastrointestinal (Jaeger *et al*, 1993). Por outro lado, as amatoxinas são a causa mais importante para os efeitos tóxicos a nível das células gastrointestinais e dos hepatócitos neste tipo de intoxicações, sendo responsáveis pela maioria da morbidade e mortalidade registrada por intoxicação com cogumelos venenosos (Broussard *et al*, 2001).

7. Características clínicas de intoxicação

7.1. Patogénese

Os efeitos citotóxicos conhecidos das amatoxinas explicam duma forma lógica as características clínicas da intoxicação. Em princípio, as células que fornecem um dispositivo de transporte são sujeitas a um dano tóxico. Enquanto são absorvidas, as amatoxinas interferem com a síntese proteica nas células da mucosa intestinal com um subsequente ataque tardio de gastroenterite severo. O *uptake* das toxinas pelos hepatócitos é elevado e o fígado é o órgão-alvo. Também as células tubulares renais sofrem lesão, e um dano renal adicional irá reforçar a severidade da intoxicação.

7.2. Percurso clínico

Os sintomas da intoxicação por amatoxinas são bastante característicos e o diagnóstico relativamente fácil, uma vez suspeitando-se dessa mesma intoxicação.

Como as toxinas não são em si irritantes, não existem sinais de perturbações gastrointestinais numa relação próxima com a refeição composta por cogumelos. Em

PARTE I – REVISÃO DA LITERATURA

vez disso, existe um período de latência de 8 a 24 horas, e, em casos extremos, até 36 horas, antes do súbito aparecimento dos sintomas gastrointestinais violentos (Karlson-Stiber *et al*, 2003).

Os sintomas da fase inicial de intoxicação são tipicamente diarreias intensas, aquosas comparadas com as originadas pela cólera; as dores abdominais e os vômitos são também comuns. Estes sintomas normalmente persistem por um ou dois dias, mas, por vezes, mais. Se não for tratado de forma apropriada, o paciente poderá nesta fase ficar severamente desidratado, o que culmina num choque hipovolémico com subsequente instabilidade circulatória, oligúria e uma insuficiência renal funcional. Podem-se, ainda, desenvolver desordens metabólicas como hipoglicémia, distúrbios electrolíticos – em particular, hipocalémia – e acidose metabólica, o que poderá ser letal em raros casos (Vetter, 1997).

Apesar dos pacientes sentirem uma melhoria quando a doença gastrointestinal termina, surgem lesões hepáticas. Após 36 a 48 horas, ou, no caso de uma intoxicação massiva ainda mais precocemente, os sinais bioquímicos surgem com um aumento gradual de transaminases hepáticas, LDH e bilirrubina no soro. Juntamente com o aumento destas enzimas, a coagulação sanguínea é severamente perturbada, o que pode causar sangramento interno. Os sintomas clínicos de dano hepático, incluindo icterícia e um fígado ligeiramente avulto e tenro, podem, consequentemente, surgir 3 a 4 dias pós-ingestão.

Na fase final de intoxicação, as enzimas hepáticas no soro continuam a aumentar. À falência hepática aguda pode seguir-se a hiperbilirrubinémia pronunciada, desordens na coagulação e sangramento, hiperamonémia, acidose metabólica, hipoglicémia e encefalopatia, por vezes seguida de coma. Elevados valores de creatinina e ureia indicam dano adicional às células renais (coma hepático com falência renal). Nesta fase, a instabilidade circulatória pode tornar-se novamente um problema, relacionado com a falência múltipla de órgãos e, por vezes, com o sangramento. A hemorragia massiva não é apenas devida à fraca síntese de factores de coagulação mas também devido a uma coagulação intravascular disseminada (CID). Quando o dano hepático é reversível, o fígado

CAPITULO I – INTOXICAÇÃO POR AMATOXINAS

normalmente sara relativamente rápido e completamente. Em casos fatais, os pacientes, geralmente, falecem após 6 a 16 dias.

Durante a fase inicial, a perda massiva de fluido pode, como anteriormente mencionado, causar uma incapacidade a nível da função renal, a qual poderá ser irreversível, se o paciente não for adequadamente reidratado. Contudo, mais tarde, outro tipo de disfunção renal poderá ocorrer, relacionado ou com a falha da função hepática (síndrome hepatorenal) ou com um dano renal tóxico directo. Os sinais e sintomas desta disfunção renal recorrente surgem três a cinco dias pós-ingestão e indicam um prognóstico fraco, reflectindo uma exposição tóxica aguda.

A dimensão médica do problema está essencialmente relacionada com o facto de que as amatoxinas são excepcionalmente potentes, uma vez que uma refeição normal que contenha cogumelos venenosos pode expôr uma pessoa a uma dose letal da toxina.

CAPITULO II

METODOLOGIA ANALITICA

1. Matrizes biológicas

A Toxicologia Forense é uma ciência que visa excluir, detectar, identificar e quantificar substâncias tóxicas, tanto no vivo, como no cadáver, com a finalidade de esclarecer factos que envolveram uma determinada intoxicação ou a causa de morte. Tal informação é obtida a partir de análises químico-toxicológicas de amostras biológicas, sendo que a escolha adequada da amostra a ser analisada é um passo crítico para a investigação toxicológica, uma vez que cada matriz apresenta peculiaridades, quer a nível bioquímico e farmacodinâmico como a nível farmacocinético (Moreau *et al*, 2009).

Actualmente, existe uma grande variedade de amostras biológicas que pode ser analisada em toxicologia forense. Nas análises toxicológicas *post mortem*, as amostras biológicas disponíveis incluem sangue, fluidos como a saliva, humor vítreo e bÍlis, assim como Órgãos, incluindo o fÍgado, pulmão, rim ou cÉrebro, os quais se apresentam como uma alternativa quando a substância tÓxica tem uma localização particular (Karch, 1998). Nas amostras colhidas *in vivo*, a urina é a principal matriz, incluindo-se, ainda, sangue, saliva, vÓmito ou aspirado gÁstrico e o cabelo (Moreau *et al*, 2009).

Uma análise toxicológica correcta requer amostras bem seleccionadas. De facto, nem todas as amostras são indicadas para a pesquisa de uma substância tÓxica, porque alguns métodos são mais executáveis em determinadas amostras, bem como a quantidade de tÓxico pode ser maior em determinados tecidos-alvo (Chamberlain, 1995). Assim, ao seleccionar a amostra ou amostras para análise é importante considerar a histÓria de causa de morte ou de intoxicação, a especificidade do caso, o tipo de análise pretendida e a disponibilidade tÉcnico-científica para cada um deles, assim como ter conhecimento do comportamento toxicocinético do composto suspeito.

As amostras biológicas utilizadas para a detecção e determinação de amatoxinas, de acordo com a literatura, é diversa, incluindo soro (Filigenzi *et al*, 2007; Jehl *et al*, 1985; Belliaro *et al*, 1983), plasma (Tanahashi *et al*, 2010 ; Rieck *et al*, 1988), urina (Bidnychenko *et al*, 2008; Robinson-Fuentes *et al*, 2008; Maurer

et al, 2000; Defendenti *et al*, 1998; Maurer *et al*, 1997; Jehl *et al*, 1985; Coccini *et al*), conteúdo gástrico (Jehl *et al*, 1985), bem como diversos órgãos, entre os quais, o fígado (Filigenzi *et al*, 2007) e os rins (Filigenzi *et al*, 2007).

A escolha da amostra biológica para determinação de Amatoxinas nesta dissertação foi a urina, uma vez que se apresenta como uma amostra de fácil colheita, que se encontra disponível tanto em cadáveres como, sobretudo, em vivos e é uma matriz analiticamente bem processada pelas características que apresenta.

1.1. Urina

A urina constitui o principal líquido de excreção do organismo, sendo considerada uma das matrizes biológicas apropriadas para a identificação e análise quantitativa não só de compostos tóxicos como dos seus metabolitos (Guyton, 1996). É um fluido biológico extensamente utilizado em análises toxicológicas, e torna-se muito útil em técnicas como imunoenaios ou análises cromatográficas sendo considerada a matriz biológica de eleição para *screening* toxicológico (Moreau *et al*, 2009), uma vez que é um meio adequado para a utilização de métodos de triagem rápidos para diversos grupos de compostos. Devido às suas características, permite a realização de uma grande variedade de ensaios preliminares e a fácil aplicação de diversas técnicas extractivas. A confirmação da presença de uma substância tóxica ou dos seus metabolitos na urina permite orientar a sua pesquisa no sangue, otimizando o processo extractivo (Calabuig, 1998).

A vantagem desta amostra biológica para fins analíticos é ser uma das matrizes com menor número de interferentes, uma vez que é constituída principalmente por água (98%, em média), e ao contrário do plasma ou do soro, é geralmente livre de proteínas e lípidos, apresentando somente em estados patológicos níveis significativos destes componentes (Chamberlain, 1995). Para além disso, comparativamente ao sangue, apresenta concentrações mais altas de substâncias tóxicas e/ou os seus produtos de biotransformação (Moreau *et al*, 2009).

A urina apresenta-se, ainda, como uma matriz homogénea pois apresenta parâmetros fisiológicos que variam dentro de limites estreitos, podendo ser obtida

facilmente e em quantidade suficiente, à excepção de alguns cadáveres, sendo geralmente uma amostra que contém concentrações elevadas dos tóxicos, permitindo, desta forma, a sua detecção (Calabuig, 1998).

Em suma, a urina é uma amostra biológica homogénea, isenta de proteínas, o que conduz a que as interferências da matriz sejam mínimas, possibilitando um bom procedimento analítico.

2. Metodologias analíticas para preparação e/ou extracção de amatoxinas de matrizes biológicas

A preparação da amostra é um procedimento chave das análises toxicológicas, pois é nesta fase que se procede ao isolamento e recuperação do analito com a intenção de lhe serem aplicadas as técnicas de análise instrumental (Jickells *et al*, 2008).

Uma matriz biológica apresenta, na sua constituição, diversos componentes que podem ser desde grandes moléculas proteicas a simples sais orgânicos, sendo cada um destes compostos potenciais interferentes numa determinação analítica. Desta forma, é essencial realizar uma preparação e/ou extracção correcta da amostra, com o fim de minimizar esses potenciais interferentes intrínsecos à matriz, os quais podem influenciar os resultados analíticos, nomeadamente ao nível da sensibilidade e especificidade do método (Moreau *et al*, 2009). A necessidade de obter resultados quantitativos fiáveis e de determinar baixos limites de detecção, conduzem à execução de uma técnica de preparação e/ou extracção correcta da amostra.

Os objectivos principais da preparação/extracção de uma determinada substância de matrizes biológicas são isolar o analito da matriz, concentrar e estabilizar o analito antes da análise e transferir o analito para um solvente apropriado para introdução no sistema cromatográfico (Flanagan, 2007). Pretende-se com este tipo de procedimento obter o mínimo de perda da amostra com uma boa recuperação dos analitos de interesse, remover eficientemente o máximo de potenciais compostos interferentes, obter resultados independentes da variabilidade

da matriz e converter os analitos numa forma adequada de detecção. Este procedimento deve constituir um processo conveniente e rápido, em que haja compatibilidade entre o extracto final e os sistemas de cromatografia e os métodos de detecção, em especial os de espectrometria de massa. Este processo é sempre necessário quando existam impurezas na matriz que possam prejudicar o tempo de vida das colunas cromatográficas.

Os tipos de preparação de amostras mais comumente utilizados são a extracção líquido-líquido (LLE), a centrifugação, a precipitação proteica e a extracção em fase sólida (SPE). Quando se pretende desenvolver um método de determinação por LC-MS, as técnicas mais adequadas são a LLE e a SPE. Interessa, assim, obter uma amostra pura após extracção, de forma a que esta permita uma correcta separação cromatográfica.

No presente trabalho, foi seleccionada como preparação de amostras a precipitação proteica e a centrifugação com posterior extracção por SPE.

2.1. Precipitação de proteínas por solventes orgânicos

A solubilidade das proteínas em solventes orgânicos é menor do que em água (Rosenberg, 2005).

Numa solução contendo, exclusivamente, água e moléculas proteicas temos interacções água-proteína e proteína-proteína. Neste caso, o primeiro tipo de interacção irá prevalecer sobre o segundo uma vez que a água possui uma constante dieléctrica elevada.

No caso de solventes orgânicos, como estes apresentam um valor de constante dieléctrica bastante inferior ao da água, a interacção proteína-proteína é favorecida relativamente ao poder de solvatação da água, conduzindo à precipitação da proteína (Burgess *et al*, 2009).

A precipitação por solventes orgânicos depende muito da temperatura (Vogel *et al*, 2010). Este tipo de compostos, quando utilizados a baixas temperaturas, são bastante úteis na separação de misturas de proteínas. A temperaturas mais elevadas, tais solventes podem levar à desnaturação por rompimento das pontes de hidrogénio

e estabelecimento de interacções apolares, importantes na manutenção da conformação proteica.

2.2. Extracção em fase sólida

A extracção é um passo determinante na análise de qualquer substância em investigação toxicológica. É, por norma, um processo complexo que requer técnicas analíticas de extracção específicas para a remoção das substâncias a determinar.

A SPE é um método flexível, rápido e simples que pode ser aplicado a vários procedimentos de extracção. Este tipo de extracção consiste num processo de separação através do qual os compostos, que se encontram dissolvidos ou suspensos numa mistura líquida, são separados de outros componentes de acordo com as suas propriedades químicas e físicas. Os laboratórios analíticos utilizam a SPE com o objectivo principal de concentrar e purificar amostras para análise. O isolamento dos analitos de interesse com este tipo de metodologia é realizado sobre uma grande variedade de matrizes, incluindo a urina, sangue, água, tecidos animais, etc. (Lanças, 2004).

Os benefícios deste tipo de extracção incluem tempos de preparação reduzidos, taxas de recuperação elevadas, extractos purificados, possibilidade de automação, compatibilidade com a análise cromatográfica, processamento conjunto de várias amostras, adaptável a diferentes volumes de amostra, sem formação de emulsões e com consumo reduzido de solventes orgânicos. Além disso, o processo de extracção torna-se específico utilizando esta técnica, uma vez que existem diversos mecanismos de interacção intermolecular possíveis entre as moléculas do analito e os grupos funcionais do adsorvente (interacções polares, hidrofóbicas e iónicas) (McDowall, 1989). A selectividade adicional proporcionada por esta técnica leva a uma diminuição da possibilidade de efeitos da matriz biológica, o que permite ao analista atingir menores tempos de corrida na técnica cromatográfica utilizada, além de obter uma elevada reprodutibilidade.

O princípio da técnica consiste na passagem dos analitos através de uma coluna com uma base de material empacotado, o qual é constituído por estruturas de sílica

ou de polímeros com diferentes grupos funcionais ou polaridades (Karch, 1998). À medida que o analito atravessa o adsorvente, os analitos ligam-se à superfície sólida, enquanto que alguns componentes da amostra passam pela coluna. Os interferentes são subsequentemente removidos por lavagens selectivas e, finalmente, os analitos são eluídos num determinado volume de solvente para análise. O sistema de extracção é composto pelas colunas que estão associadas a um recipiente de recolha. Os solventes necessários em cada etapa podem ser forçados a passar através da coluna por pressão positiva (gasosa), pressão negativa (vácuo), gravidade, centrifugação ou pela utilização de bombas de elevada pressão (Zweipfenning *et al*, 1994). A fase estacionária na maioria das colunas de SPE assemelha-se às utilizadas em LC . Os principais objectivos de um processo de SPE englobam:

- Remoção de interferentes específicos da matriz de modo a que estes não causem problemas na detecção e quantificação dos analitos de interesse. Um protocolo de preparação da amostra inadequado, falha na remoção dos interferentes da matriz, podendo levar à sobreposição de picos com o pico do analito de interesse no cromatograma (figura 4);

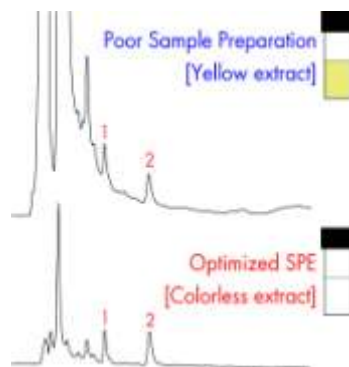


Figura 4 – Exemplo de cromatogramas obtidos a partir de uma amostra sujeita a um protocolo de preparação inadequado (cromatograma superior) e de uma amostra sujeita a um protocolo otimizado de SPE (cromatograma inferior) (retirado de Waters, 2011).

- Aumento da concentração do analito de interesse na amostra original de forma a ser prontamente detectado e quantificado de forma mais precisa pela técnica analítica (figura 5). Um grande volume de amostra pode ser adicionado ao cartucho de SPE se o analito de interesse for fortemente retido, e, posteriormente, o analito poderá ser eluído num volume muito pequeno, aumentando desta forma a sua concentração.

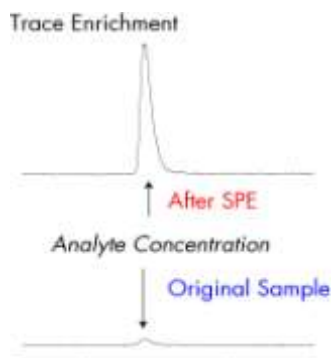


Figura 5 – Cromatogramas exemplificativos da melhoria de resolução do sinal com analito mais concentrado após SPE (retirado de Waters, 2011).

- Remoção de interferentes da amostra que, apesar de não serem visíveis, suprimem o sinal do analito de interesse num detector MS. Um protocolo de SPE otimizado fornece um extracto limpo e minimiza a supressão iónica (figura 6).

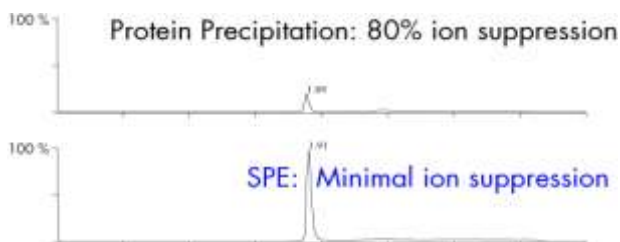


Figura 6 – Cromatogramas exemplificativos do processo de supressão iónica devido a um protocolo de preparação da amostra incompleto (retirado de Waters, 2011).

A SPE é um processo que se baseia fundamentalmente em quatro passos:

Acondicionamento da coluna (Figura 7.A): O primeiro passo da SPE envolve o acondicionamento do suporte sólido com solvente orgânico com o objectivo de solvatar os grupos funcionais. Os solventes utilizados dependem do tipo de extracção a ser realizada, sendo, normalmente, metanol seguido de água e/ou tampão.

Retenção do analito (Figura 7.B): Após activação da coluna, a amostra é adicionada à coluna, para reter os compostos de interesse, concentrando-os no suporte sólido. São diversos os mecanismos de retenção, os quais dependem do tipo de coluna que se utiliza, incluindo-se as interacções de Van Der Waals (ligações hidrofóbicas, apolares, de partição ou de fase reversa), ligações por pontes de Hidrogénio, forças dipolo-dipolo e troca iónica.

Lavagem da coluna (Figura 7.C): Com o objectivo de remover selectivamente os interferentes da matriz que ficaram retidos no adsorvente no passo anterior, sem remoção dos compostos de interesse, realiza-se a passagem de um solvente adequado através dos espaços intersticiais do suporte sólido. Para amostras aquosas, o solvente poderá ser um tampão aquoso ou uma mistura água/solvente orgânico.

Eluição (Figura 7.D): Para finalizar o processo de extracção, realiza-se um passo de eluição com um determinado volume de solvente adequado, seleccionado especificamente para romper a interacção analito/adsorvente, de forma a recuperar os compostos de interesse. O eluente deverá ser capaz de remover a máxima quantidade possível de analito e, simultaneamente, eluir o mínimo de interferentes que eventualmente poderão ainda estar adsorvidas na fase sólida.

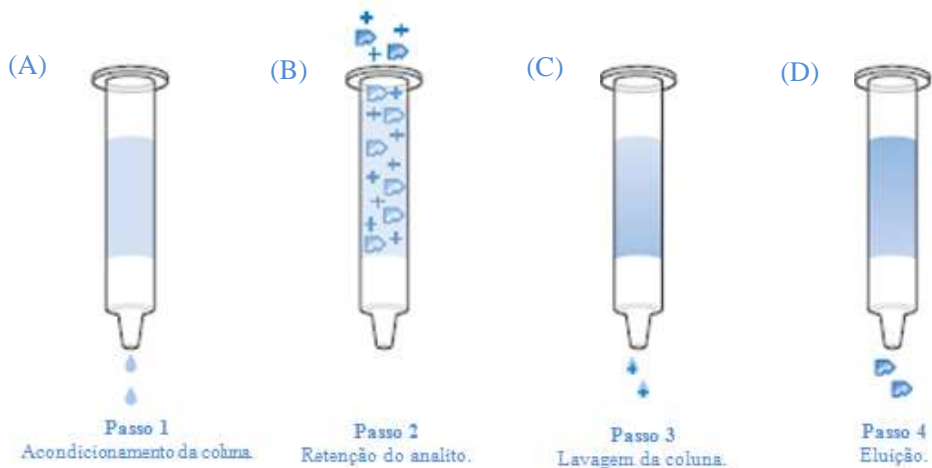


Figura 7 – Etapas do procedimento de SPE: acondicionamento da coluna (A), retenção do analito (B), lavagem da coluna (C) e eluição (D) (retirado de Jickells, 2008).

O método de SPE baseia-se, assim, na utilização de pequenas colunas de extração, descartáveis, preenchidas com uma variedade de enchimentos (adsorventes), permitindo uma separação eficaz dos componentes da matriz. Existem inúmeros tipos de colunas, especialmente concebidas para SPE, facultando rapidez, economia, eficiência na preparação das amostras, podendo, deste modo, ser usadas em diferentes sistemas analíticos (Jickells *et al*, 2008).

Conhecendo as características dos compostos em questão, relativamente às suas polaridade e solubilidade e se é extraído em meio ácido ou básico, é possível determinar quais as colunas de extração indicadas. Na realização desta tese, procedeu-se a uma metodologia de SPE de fase reversa, com o recurso a colunas *Oasis® HLB*.

Este tipo de colunas caracteriza-se por ser fortemente hidrofóbica, com retenção e capacidade elevadas mesmo em condições de secagem após acondicionamento. O adsorvente presente nesta coluna é um co-polímero macroporoso originado a partir dum equilíbrio entre dois monómeros, o composto lipofílico divinilbenzeno e o composto hidrofílico N-vinilpirrolidona (Figura 8). Este co-polímero fornece uma

capacidade de fase reversa à coluna, com um "braço polar" para uma retenção mais eficaz de analitos polares (Waters, 2011).



Figura 8 – Co-polímero de N-vinilpirrolidona-divinilbenzeno, característico de uma coluna Oasis HLB (Waters, 2011).

A presente coluna permite isolar uma gama alargada de compostos ácidos, básicos e neutros num espectro variado de matrizes (Waters, 2011).

Quanto à determinação de α - e β -amanitinas, a SPE revela-se uma técnica vantajosa para a extracção de compostos orgânicos hidrofílicos tais como as amatoxinas em estudo. Tratando-se de uma técnica segura, rápida, prática, económica relativamente ao consumo de reagentes e simples na preparação das amostras para determinações analíticas, é utilizada por muito autores como técnica de extracção da α - e β -amanitina nomeadamente em plasma humano (Tanahashi *et al*, 2010), soro (Filigenzi *et al*, 2007; Jehl *et al*, 1985), urina (Jehl *et al*, 1985; Bidnychenko *et al*, 2008; Defendenti *et al*, 1998; Maurer, H. *et al*, 1997), conteúdo estomacal (Jehl *et al*, 1985), cogumelos (Muraoka *et al*, 1999; Ali Ahmed *et al*, 2010), fígado e rins (Filigenzi *et al*, 2007).

Segundo a literatura, verifica-se, também, para metodologias de preparação e extracção de amostras, que a maioria dos autores utiliza este tipo de extracção com recurso a colunas de fase reversa e com pré-tratamento dependendo do tipo de matriz. Geralmente, em matrizes de urina, é realizada a extracção directa sem preparação prévia da amostra. O eluente largamente utilizado para extracção é o metanol; e o procedimento extractivo em si varia marcadamente de acordo com diferentes publicações.

3. Metodologias analíticas para determinação de amatoxinas

Em toxicologia, é necessário proceder à detecção e identificação de todo e qualquer tóxico que possa ser responsável por uma determinada intoxicação, procedendo em seguida à sua quantificação. Em muitas situações, as quantidades presentes na amostra são muito reduzidas, sendo por isso necessário aumentar a sensibilidade dos métodos. Nesta conformidade, houve uma grande evolução na análise toxicológica de substâncias e seus metabolitos em amostras biológicas, em especial desde o aparecimento de técnicas que complementam os métodos cromatográficos, com a associação de detectores de massa, trazendo um acréscimo notório à especificidade e sensibilidade.

As análises qualitativa e quantitativa das toxinas da espécie *Amanita* através de métodos cromatográficos foram primeiramente publicadas cerca de meio século depois das primeiras investigações químicas, reportadas ao ano de 1899, realizadas a essas toxinas (Li e Oberlies, 2005).

A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS), o «método de ouro» nas análises toxicológicas, não pode ser directamente utilizado para determinação dos peptídeos tóxicos das amatoxinas, uma vez que estes compostos são não voláteis, sendo necessário diversos passos de pré-tratamento, o que levaria a uma metodologia complexa e com custos elevados. Foi, no entanto, descrita uma metodologia com recurso a esta técnica por analogia a análises efectuadas noutros fungos. Por hifenização da pirólise analítica aos sistemas modernos de CG-MS foi, então, estabelecida uma técnica cuja excelência se baseia na caracterização de proteínas e carboidratos, assim como amostras biológicas. A primeira aproximação para caracterizar fungos através de pirólise analítica foi realizada por Benoit-Guyod *et al* (1980), a qual não obteve sucesso imediato devido ao pobre sistema cromatográfico usado. Mais tarde, Schwarzingger (2005) identificou a α -amanitina na espécie *Amanita phalloides* através deste método.

Contudo, segundo a literatura, o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é o que mais se adequa à separação de amanitinas. Este método preenche totalmente os requisitos de sensibilidade, precisão e especificidade

juntamente com a simplicidade operativa e rapidez de detecção de α - e β -amanitinas em amostras biológicas. Um número considerável de artigos disponíveis na literatura mencionam a utilização de HPLC acoplada a métodos de detecção como Ultra-Violeta (UV) (Belliaro *et al*, 1983; Jehl *et al*, 1985; Rieck *et al*, 1988; Enjalbert *et al*, 1992; Jaeger *et al*, 1993), Electroquímica (ECD) (Tagliaro *et al*, 1987; Tagliaro *et al*, 1981; Defendenti *et al*, 1998) e Espectrometria de Massa (MS) (Maurer *et al*, 1997; Maurer *et al*, 2000; Chung *et al*, 2007; Filigenzi *et al*, 2007; Tanahashi *et al*, 2010). Dos métodos apresentados, as técnicas LC-MS(-MS) parecem ser as mais sensíveis, potentes e fiáveis para a análise de amanitinas em amostras biológicas (Tanahashi *et al*, 2010; Ali Ahmed *et al*, 2010), sendo este o método maioritariamente utilizado para essa determinação.

Em termos cromatográficos, através duma análise pela literatura, verifica-se que são usados dois tipos de eluição, a isocrática (Bidnychenko *et al*, 2008; Maurer *et al*, 1997; Jehl *et al*, 1985; Defendenti *et al*, 1998) e por gradiente (Tanahashi *et al*, 2010; Ali Ahmed *et al*, 2010; Bidnychenko *et al*, 2008; Filigenzi *et al*, 2007; Maurer *et al*, 2000; Enjalbert *et al*, 1993; Enjalbert *et al*, 1992; Muraoka *et al*, 1999). A grande maioria dos métodos utiliza a eluição por gradiente, apesar de alguns autores também recorrerem à eluição isocrática.

Uma vez que os procedimentos analíticos usam principalmente a cromatografia em fase reversa para separar as amanitinas, os solventes mais comumente utilizados são, individualmente ou em combinação, acetonitrilo, metanol, acetato de amónia, água ultra-pura e ácido fórmico. As composições de fase móvel maioritariamente utilizadas são uma combinação de acetonitrilo com acetato de amónia (Jehl *et al*, 1985; Enjalbert *et al*, 1992; Enjalbert *et al*, 1993; Bidnychenko e Fedushchak, 2008) ou acetato de amónia com metanol (Muraoka *et al*, 1999; Maurer *et al*, 1997; Maurer *et al*, 2000).

É, também, de referir que praticamente todos os estudos aplicam a calibração externa ou, raras vezes, o método de padronização interna, recorrendo a padrões internos como éter metil γ -amanitina (Maurer *et al.*, 2000), microcistina RR (Ali Ahmed *et al.*, 2010) ou eritromicina (Maurer *et al.*, 1997).

Apesar da técnica de HPLC ser o método de excelência para a determinação de amanitinas na urina é, ainda, possível realizar essa determinação através de outros métodos analíticos, como radioimunoensaios (RIA) (Faulstich *et al*, 1975; Faulstich *et al*, 1982; Hains *et al*, 1986), cromatografia de camada fina (TLC) (Hains *et al*, 1986), métodos ELISA (Abuknesha e Maragkou, 2004; Butera *et al*, 2004) e electroforese capilar de zona (CZE) (Bruggemann *et al*, 1996; Robinson-Fuentes *et al*, 2008).

Através de uma análise pela literatura, verifica-se, assim, que existem diversos métodos que podem ser usados para determinar amanitinas em amostras biológicas, sendo que cada um apresenta as suas falhas. No entanto, tendo em conta as vantagens a nível de rapidez, sensibilidade e resolução, a técnica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial apresenta-se como a técnica com melhores requisitos para a análise da α - e β -amanitina, e, por isso, foi a técnica adoptada para a presente dissertação.

3.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

3.1.1. Cromatografia líquida

A LC é um método extremamente eficiente, uma vez que fornece excelentes separações num curto período de tempo. Os «inventores» da cromatografia moderna, Martin e Synge, no ano de 1941, estavam cientes que, teoricamente, a fase estacionária requeria partículas de dimensões muito pequenas e, portanto, seria essencial uma elevada pressão que forçasse a fase móvel a deslocar-se pela coluna (Meyer, 2004).

Esta é uma técnica de analítica de grande impacto actual e com um vasto campo de aplicações. Baseia-se na separação de espécies químicas consoante as suas funções moleculares e, por conseguinte, é um método que pode ser utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes matrizes. A separação dos compostos ocorre através de um mecanismo selectivo entre as moléculas presentes na amostra e duas fases, uma móvel e outra estacionária.

Devido às diferentes características físico-químicas específicas das diferentes moléculas que constituem a matriz, estas irão interagir de modo distinto com as duas fases, uma vez que apresentam diferentes afinidades para com estas. Por conseguinte, as velocidades de migração serão distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica (Chust, 1990).

3.1.2. Espectrometria de massa sequencial

Para uma identificação inequívoca que permita a identificação de um determinado composto deve ser monitorizado mais do que um ião. A utilização de MS/MS possibilita o controlo do ião molecular e de transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo. Os princípios de monitorização de um ião (SIM) ou de monitorização de reacções múltiplas (MRM) garantem a sensibilidade e a especificidade necessárias para a quantificação de analitos, em concentrações, por vezes vestigiais, presentes em matrizes de elevada complexidade.

Quando a metodologia utilizada se baseia em detecção por espectrometria de massa, os resultados a interpretar são cromatogramas iónicos e as grandezas analíticas medidas em relação ao analito são: o tempo de retenção (RT), a intensidade dos picos e a amplitude do ruído (Poletini, 2006). Para se considerar que está presente um sinal cromatográfico, é necessário que exista uma relação sinal/ruído (em amplitude) superior a três. Existem ainda outros critérios de identificação, estabelecidos na legislação, que as metodologias por LC-MS/MS devem cumprir. Os restantes critérios prendem-se com a variação permitida nos tempos de retenção relativos e nas razões iónicas.

Contudo, existe um fenómeno em LC-MS/MS, conhecido por supressão iónica (Antignac *et al*, 2005; Jessome *et al*, 2005) que tem de ser tido em conta quando se analisam compostos em matrizes complexas. A supressão iónica deve-se, aparentemente, à presença de compostos interferentes, provenientes da matriz e/ou do processo extractivo. Compostos menos voláteis podem alterar a eficiência da evaporação do solvente, o que altera a quantidade de iões em fase gasosa que entram no detector. Este fenómeno pode comprometer a capacidade de detecção do

analito e a repetibilidade dos resultados. A sua prevenção passa pela apropriada preparação da amostra e pelas purificação e limpeza do extracto, como já referido. Por vezes, a simplificação da metodologia extractiva pode ser responsável pela existência de maior quantidade de compostos interferentes responsáveis por este fenómeno.

Neste trabalho, foi utilizada uma LC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo. Na figura 9, está representado esquematicamente o percurso dos iões em LC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo. Após ionização, o Q0 dirige os iões, com colisão focalizada para o 1.º quadrupolo, Q1, que constitui o primeiro filtro de massas. Em Q2, 2.º quadrupolo, encontra-se a célula de colisão onde as moléculas são fragmentadas, passando para o segundo filtro de massas, o 3.º quadrupolo, Q3 (Silverstein, 2005).

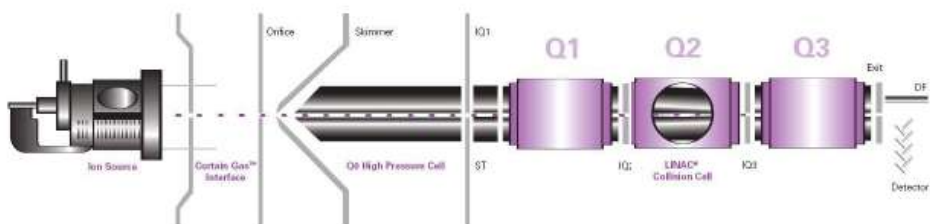


Figura 9 – Representação esquemática do MS/MS do tipo triplo quadrupolo.

CAPITULO III

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALITICAS

1. Introdução

A confiança nos resultados analíticos é um aspecto fundamental em Toxicologia Forense. Resultados não fiáveis podem não apenas ser contestados em tribunal como, também, conduzir a decisões legais injustas. Por tudo isto, a importância da validação dificilmente poderá ser sobrestimada, facto ainda mais relevante se o laboratório estiver envolvido num contexto de gestão da qualidade e acreditação, aspectos que assumiram grande relevância nos anos mais recentes.

A validação de um método analítico é, assim, fundamental para implementar um sistema de controlo de qualidade em qualquer laboratório analítico. Este conceito define-se como um processo segundo o qual se estabelece, através de ensaios laboratoriais, que o desempenho do método obedece aos requisitos da aplicação analítica. O objectivo principal do método de validação será demonstrar que a metodologia analítica satisfaz os critérios de aceitação por entidades reguladoras, permitindo uma correcta interpretação dos resultados analíticos, uma vez que conduz à identificação e quantificação de erros e incertezas inerentes ao procedimento analítico que não podem ser eliminados. Para que o trabalho de rotina laboratorial seja rigoroso tem de se obedecer a limites de controlo, limites esses que são estabelecidos no processo de validação.

O estabelecimento e optimização de um método analítico compreendem duas fases, a fase de desenvolvimento de um método e sua validação analítica, na qual se definem e seleccionam as melhores condições analíticas; e a fase de aplicação do método à análise de amostras biológicas.

Nos últimos tempos, tem sido objecto de discussão internacional a existência de um consenso sobre quais os parâmetros de validação dos métodos analíticos a serem validados e com que profundidade, assim como quais os critérios de aceitação destes parâmetros. Por outro lado, o processo de validação de um método não pode ser separado do seu desenvolvimento. O investigador não saberá se as condições analíticas são aceitáveis até que o estudo da validação esteja completo.

Assim, a validação de procedimentos analíticos deve ser baseada nas recomendações e critérios de organizações internacionais de grande relevância

científica (FDA, 2001; ICH Q2 (RI), 2005), bem como de referências bibliográficas relevantes neste âmbito (Delacre, 2000).

Os parâmetros considerados mais significativos, de acordo com as referências anteriormente mencionadas, para a realização desta tese são, deste modo, descritos na secção seguinte.

2. Definição dos parâmetros de validação

2.1. Especificidade/selectividade

A especificidade e/ou selectividade de um método pode definir-se como a capacidade de um método analítico para determinar e discriminar inequivocamente o analito em estudo de outros compostos que possam estar presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação, excipientes, metabolitos, ou outros componentes da amostra (matriz). É de extrema importância para o desenvolvimento e validação de um método, a verificação da existência de compostos interferentes que possam comprometer a capacidade do método em identificar os analitos de interesse.

Este parâmetro garante que o pico de resposta do composto em análise seja exclusivamente deste, devendo ser medido através de um número apropriado e representativo de amostras brancas, de modo a analisar a presença e o efeito de possíveis interferentes.

Este é um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método, uma vez que se a especificidade/selectividade não for assegurada, a linearidade, a exactidão e a precisão poderão estar seriamente comprometidas.

2.2. Linearidade

Este parâmetro define-se como o intervalo de concentrações onde os resultados do ensaio são directamente ou através de uma expressão matemática bem definida,

proporcionais à concentração do analito na amostra. A linearidade estima-se avaliando a razão das áreas dos picos dos padrões e as concentrações dos padrões de calibração e é estabelecida em função da recta de calibração, a qual consiste numa representação gráfica de um determinado coeficiente de correlação que permite uma estimativa da qualidade da curva. A partir deste coeficiente, obtêm-se os desvios de cada ponto à recta traçada, e quanto mais próximo este valor estiver da unidade, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para um valor superior a 0,999 considera-se o coeficiente de correlação como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A curva de calibração é construída para cada analito e deve ser preparada na mesma matriz que a do estudo previsto, por adição de concentrações conhecidas do mesmo. O número de pontos de calibração para a construção da curva deve ser suficiente de modo a definir adequadamente a relação concentração-resposta, sendo estabelecidos, por outro lado, em função do intervalo que se pretende estudar. Em termos gerais, define-se como número mínimo de pontos a utilizar 5. A curva de calibração diz, assim, respeito à relação que existe entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito, definidas numa determinada gama de trabalho.

A gama de trabalho é, por si, considerada como o intervalo de concentrações máxima e mínima do analito na matriz (incluindo estes valores) que demonstraram ser determinados com níveis adequados de precisão, exactidão e linearidade, usando o método descrito.

2.3. Limiares analíticos do método de ensaio

2.3.1. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção define-se como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito, com uma razoável certeza estatística, ou seja, corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que é possível distinguir do branco, mas não necessariamente quantificada com valor exacto.

Uma leitura inferior ao LD não significa, no entanto, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do analito em questão é inferior a um determinado valor.

Em termos quantitativos, o LD é determinado pela equação

$$LD = \mu_0 + k.s_0 \tag{1}$$

em que μ_0 é a média do teor obtido numa série de dez a 20 brancos e s_0 o desvio-padrão associado a μ_0 . Partindo do princípio que a distribuição de μ_0 é gaussiana e de forma a ter um nível de confiança de 99,7%, a constante k é de 3,3 (Delacre, 2000).

2.3.1. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão.

Em geral, o LQ pode ser considerado o ponto mínimo da recta de calibração do analito, excluindo o branco, isto quando se trabalha em níveis baixos de concentrações, aplicando-se geralmente a compostos proibidos.

O LQ pode ser calculado aplicando a equação

$$LQ = \mu_0 + 10.s_0 \tag{2}$$

Mais uma vez, μ_0 é a média do teor obtido numa série de dez a 20 brancos e s_0 o desvio-padrão associado a μ_0 (Delacre, 2000).

A confirmação dos valores calculados, tanto para o LQ como para o LD, deve ser efectuada com a fortificação de dez a 20 amostras brancas aos níveis determinados, de forma a garantir que os limites calculados sejam valores reais (Delacre, 2000).

2.4. Recuperação

A recuperação mede o rendimento da extração, ou seja, a fracção de massa do analito contido na amostra que se encontra presente no extracto final. Reflecte a quantidade de determinado analito recuperado no processo extractivo, em relação à quantidade presente na amostra.

Este parâmetro deve ser determinado por comparação entre a razão das áreas dos picos, antes e após o procedimento extractivo, como dado por

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Teor medido}}{\text{Nível de fortificação}} \times 100 \quad (3)$$

A recuperação demonstra a eficácia da extração de um método analítico dentro de determinados limites de variabilidade. A recuperação do analito não necessita ser 100%, o que, em termos práticos não é possível, uma vez que ocorrem sempre perdas no processo extractivo, mas sim deve ser constante, exacta e reprodutível (Delacre, 2000).

2.5. Precisão

A precisão de um método analítico corresponde ao grau de concordância entre os resultados individuais dos ensaios, quando o processo é aplicado repetidamente a várias alíquotas de uma amostra homogénea. Este parâmetro reflecte a variação dos resultados quando as análises repetidas são feitas na mesma amostra, indicando a dispersão dos resultados obtidos em torno do valor real, numa série de medições.

Este parâmetro engloba a variabilidade dos resultados em duas situações: utilização do método em condições idênticas (repetibilidade) ou com modificações de, pelo menos, um parâmetro (reprodutibilidade intra-laboratorial).

Assim, a precisão intra-dia ou repetibilidade expressa a precisão durante o processamento de uma sequência analítica num curto período de tempo, no mesmo laboratório, com a mesma instrumentação e condições de operação, e pelo mesmo

analista. Por outro lado, a precisão inter-dia ou repordutibilidade reflecte a precisão em dias diferentes, podendo implicar diferentes analistas, equipamentos e reagentes.

Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são traduzidas em termos de coeficiente de variação (CV). Assim, a precisão de um procedimento analítico é habitualmente expressa através da equação

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\mu} \times 100$$

(4)

em que σ é o desvio-padrão e μ a média dos resultados.

As fortificações devem ser efectuadas pelo menos a tres níveis de fortificação, dentro do intervalo considerado utilizando, no mínimo, três réplicas para cada concentração. Os valores de precisão calculados em cada nível de concentração não devem exceder 15% do CV, excepto no LQ, onde 20% de CV é aceitável (FDA, 2001).

PARTE II

ESTUDO EXPERIMENTAL

CAPITULO I

ESTUDOS PRELIMINARES

1. Introdução

Para o desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina, foram realizadas inúmeras experiências preliminares que levaram à selecção dos parâmetros mais adequados para esse fim.

Para tal, diversos estudos foram efectuados, quer a nível da detecção e separação cromatográfica quer a nível da preparação e extracção das amostras, previamente à análise propriamente dita. Nas subsecções 2 a 5, serão resumidos os ensaios realizados no decorrer da elaboração desta dissertação.

2. Estudo realizado por HPLC-UV

O estudo analítico foi iniciado utilizando um método por HPLC-UV, disponível no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia, com diferentes condições cromatográficas, tais como diferentes comprimentos de onda (λ), fases móveis distintas em composição e em proporção, bem como distintos gradientes de fluxo, isto é, tanto em condições isocráticas, como em gradiente.

Para estes estudos foi utilizada uma coluna cromatográfica ACE C18 (250mm×4.6mm, 5 μ m) de fase reversa existente no mesmo Laboratório, uma vez que as colunas com tais características apresentam-se como as mais adequadas para realizar o estudo das condições óptimas para a detecção e identificação de α - e β -amanitina.

2.1. Optimização da fase móvel

Para optimização da fase móvel, recorreu-se, como referido, à técnica de HPLC-UV para a análise de uma concentração de 4 μ g/mL de α - e β -amanitinas. A coluna analítica composta por C18 como fase estacionária e a fase móvel constituída por solventes mais polares demonstram a aplicação de um método cromatográfico em fase reversa. O volume de injeção estabelecido foi de 50 μ L, com detecção ao

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

comprimento de onda de 305 nm. O fluxo de injeção seleccionado foi de 1 mL/min e o tempo da corrida de 15 minutos.

Os solventes utilizados nas diversas fases móveis testadas foram filtrados a vácuo através de membranas de poliamida (0.2 μ m, 50 mm) e desgaseificadas em banho ultra-sons durante 15 min., à temperatura ambiente. O pH de alguns solventes foi, ainda, ajustado com ácido acético glacial para pH 5. Foram, assim, estudadas diferentes fases móveis, estando os parâmetros cromatográficos definidos na tabela 1.

CAPITULO I – ESTUDOS PRELIMINARES

Tabela 1. Parâmetros utilizados para a otimização da fase móvel para análise de α - e β -amanitina por HPLC-UV.

Composição da Fase Móvel*		[amanitinas] ($\mu\text{g/mL}$)	Detector UV	Proporções		*Referência Bibliográfica
Solvente A	Solvente B			Condições Isocráticas	Gradiente de Eluição	
Acetato de amônia 0.01M pH 5.14	Metanol:Água (40:60)	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 200 \text{ nm}$	90% A:10% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				40% A:60% B		
Acetato de amônia 0.01M pH 5.14	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 200 \text{ nm}$	10% A:90% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				95% A:5% B		
Acetato de amônia 0.01M pH 5.14	Acetonitrilo	2 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 200 \text{ nm}$	90% A:10% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				50% A:50% B		
Acetato de amônia 0.01M pH 5.14	Acetonitrilo	0.4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 200 \text{ nm}$	100% A:0% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				95% A:5% B		
Acetato de amônia 0.01M pH 5.14	Acetonitrilo	0.4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 200 \text{ nm}$	90% A:10% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				85% A:15% B		
Acetato de amônia 0.01M pH 5.14	Acetonitrilo	0.4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 200 \text{ nm}$	80% A:20% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				100% A:0% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	90% A:10% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				87.5% A:12.5% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	85% A:15% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				82.5% A:17.5% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	80% A:20% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				75% A:25% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	70% A:30% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				65% A:35% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	60% A:40% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				50% A:50% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	40% A:60% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				30% A:70% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	20% A:80% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)
				10% A: 90% B		
Acetato de amônia 0.02M pH 5.1	Acetonitrilo	4 $\mu\text{g/mL}$	$\lambda = 285 \text{ nm}$	0% A:100% B	-	Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> (2008)

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

Tabela 1. (Continuação)

Composição da Fase Móvel*		[amanitinas] (µg/mL)	Detector UV	Proporções		*Referência Bibliográfica
Solvente A	Solvente B			Condições Isocráticas	Gradiente de Eluição	
Acetato de amónia 0.01M pH 5.06	Acetonitrilo	4 µg/mL	λ = 285 nm	90% A:10% B 85% A:15% B 80% A:20% B 75% A: 25% B	-	
Metanol	Acetato de amónia 0.01 M pH 5.03	4 µg/mL	λ = 305 nm	70% A:30% B 10% A:90% B	-	
0.1% ácido fórmico em água ultra-pura	0.1% ácido fórmico em acetonitrilo	4 µg/mL	λ = 305 nm	95% A:5% B 90% A:10% B 87.5% A: 12.5% B 85% A:15% B 82.5% A:17.5% B 80% A: 20% B 75% A:25% B	97% A:3% B (0-3 mins.); 90% A:10% B (3.03-10 mins.); 82% A:18% B (10.03-25 mins.); 97% A:3% B (25.03-30 mins.); 97% A:3% B (0-5 mins.); 97% A:3% B até 82% A:18% B (5-10 mins.); 82% A:18% B (10-20 mins.); 82% A:18% B até 97% A:3% B (20-25 mins.); 97% A:3% B (25-30 mins.);	Tanahashi, M., <i>et al</i> (2010)
Acetato de amónia 0.01M pH 5.03	0.1% ácido fórmico em água ultra-pura	4 µg/mL	λ = 305 nm	-	97% A:3% B (0-5 mins.); 97% A:3% B até 82% A:18% B (5-10 mins.); 82% A:18% B (10-20 mins.); 82% A:18% B até 97% A:3% B (20-25 mins.); 97% A:3% B (25-30 mins.);	
Acetato de amónia 0.01M pH 5.03	Acetonitrilo	4 µg/mL	λ = 305 nm	90% A:10% B 85% A:15% B	97% A:3% B (0-5 mins.); 97% A:3% B até 82% A:18% B (5-10 mins.); 82% A:18% B (10-20 mins.); 82% A:18% B até 97% A:3% B (20-25 mins.); 97% A:3% B (25-30 mins.); 97% A:3% B (0-5 mins.); 97% A:3% B até 82% A:18% B (5-10 mins.); 75% A:25% B (10-20 mins.); 75% A:25% B até 97% A:3% B (20-25 mins.); 97% A:3% B (25-30 mins.);	
Acetato de amónia 0.02M pH 5.02	Acetonitrilo	4 µg/mL	λ = 305 nm	87.5% A:12.5% B	-	
Acetato de amónia 0.02M pH 3.03	Acetonitrilo	4 µg/mL	λ = 305 nm	87.5% A:12.5% B	-	

2.1.1. Resultados e observações

Para os parâmetros utilizados a um comprimento de onda (λ) = 200 nm, não se obteve sinal no detector, devido a uma fraca, ou praticamente nula, absorção das amatoxinas em estudo. Consequentemente, realizou-se a alteração deste parâmetro para um valor de 285 nm; no entanto, com as referidas fases móveis testadas a esse λ , não se obtiveram resultados satisfatórios, devido a uma baixa sensibilidade do detector. Posteriormente, após análise espectrofotométrica dos compostos, e como visualizado na figura 10, foi seleccionado o λ de 305 nm para o estudo da α - e da β -amanitina, valor ao qual ambos os compostos apresentam absorção máxima.

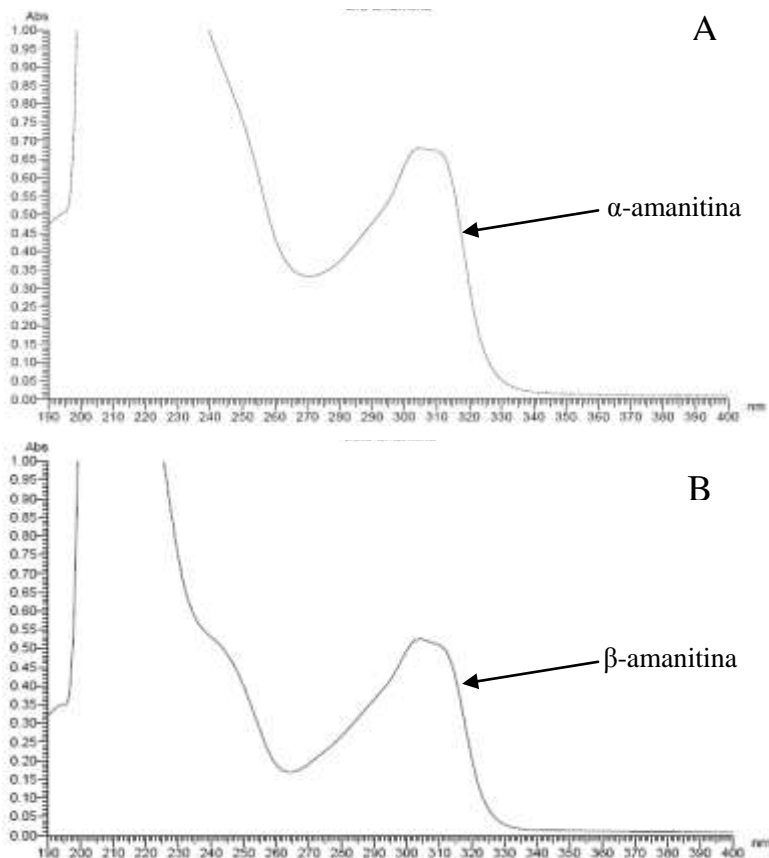


Figura 10 – Espectros de absorção da α -amanitina (A) e da β -amanitina (B).

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

Uma vez seleccionado o λ adequado, verificou-se que, para a análise destas toxinas, a composição da fase móvel que permitiu melhor separação de ambas foi a mistura acetato de amónia 0.02M pH 5.02/acetonitrilo na proporção 87.5%:12.5%, como pode ser visualizado na figura 11.

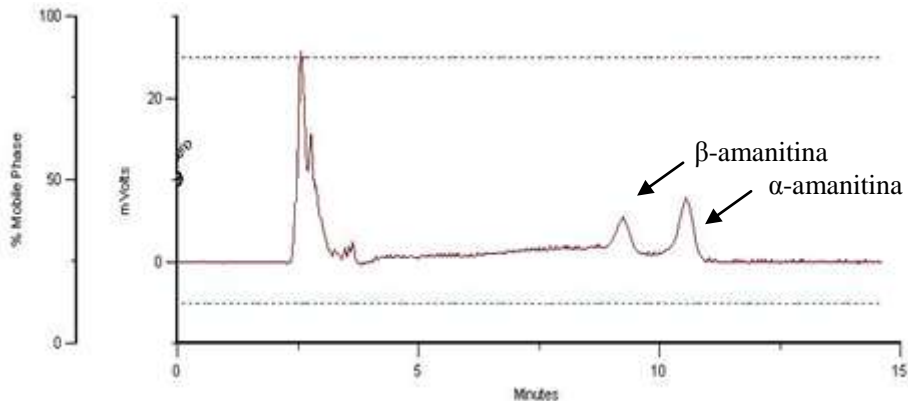


Figura 11 – Cromatograma de uma mistura de α - e β -amanitinas a 4 $\mu\text{g/mL}$, por HPLC-UV.

A optimização da fase móvel pela adição de acetonitrilo e pelo aumento da concentração de tampão acetato para 0.02M possibilitou a melhoria da resolução cromatográfica de ambas as amatoxinas.

Realizou-se, ainda, uma nova injeção com a mesma composição de fase móvel, alterando somente o pH da solução de acetato de amónia para 3.30. Verificou-se que existe um ligeiro aumento na resolução, mas os RT de ambas as toxinas são inferiores, e a separação não é tão eficiente.

Nos restantes estudos a este nível, os resultados não foram satisfatórios, uma vez que não apresentavam uma boa sensibilidade e resolução, não se tendo obtido uma separação nítida dos analitos e, nalguns casos, não se observando sequer indícios de separação dos dois compostos.

2.2. Procedimentos extractivos e purificativos

Através de uma revisão pela literatura, como já referido, a técnica de extracção mais adequada para a recuperação e isolamento de amatoxinas de amostras de urina revelou ser a SPE, uma vez que, comparativamente a outras técnicas de extracção, apresenta melhores resultados analíticos, e, para além disso, é uma técnica simples, rápida e pouco dispendiosa. Por outro lado, o protocolo de extracção, em si, varia de autor para autor relativamente ao processo de acondicionamento e de lavagem, sendo o metanol, o eluente de eleição para a remoção dos analitos de interesse da coluna.

Desta forma, depois de optimizadas as condições da técnica cromatográfica, procedemos ao estudo de vários procedimentos de tratamento da amostra e de extracção/purificação dos analitos (α - e β -amanitina) na matriz biológica (urina).

Para este estudo, foi realizado um lote de aproximadamente 1L de urina de várias amostras recolhidas de voluntários, do sexo masculino e do sexo feminino, de idades compreendidas entre os 21 e os 34 anos.

Como o pH é um factor determinante para um procedimento extractivo correcto, procedeu-se à medição deste valor no lote de urina com recurso a um potenciómetro, tendo-se verificado um valor de pH igual a 6. De acordo com a literatura, este valor é o adequado para os procedimentos de extracção efectuados, não tendo sido necessário a adição de nenhum reagente às amostras para alterar o pH.

Seguidamente, para obtenção de amostras mais limpas previamente ao processo de extracção, efectuou-se a centrifugação das amostras, a 5500 rpm, durante 15 mins., a uma temperatura de 5°C. O sobrenadante foi recolhido e realizaram-se alíquotas de 10 mL de amostra, as quais foram conservadas a - 20 °C durante o processo analítico até à sua utilização. Estas alíquotas de urina foram, posteriormente, fortificadas no momento de realização do procedimento extractivo, com 30, 60, 90 e 200 μ L de solução de α - e β -amanitina, a uma concentração de 4 μ g/mL. Após fortificação, as amostras foram homogeneizadas no vórtex.

Para todos os procedimentos efectuados, foram analisadas as quatro amostras fortificadas anteriormente referidas, duas amostras brancas e uma solução de

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

trabalho de α - e β -amanitinas, a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após extracção e purificação, os resíduos foram evaporados até à secura sob corrente de azoto, a 60°C, com reconstituição em 500 μL de fase móvel (acetato de amónia 0.02M pH 5/acetonitrilo, numa proporção de 97.5:12.5, v/v). Um volume de 50 μL do resíduo reconstituído foi injectado no HPLC-UV de acordo com as condições cromatográficas anteriormente descritas.

Para o presente estudo, foram utilizadas colunas de fase sólida *Clean Screen® DAU* (1000mg, 6 mL), UCT, já disponíveis no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia. Estas colunas exibem adsorventes copolímeros com dois grupos funcionais que incluem uma fase apolar (C8) e outra de troca catiónica (ácido benzenossulfónico), unicamente polimerizados num substracto de sílica. Este tipo de mecanismo de retenção em modo misto permite uma selectividade máxima na extracção de compostos ácidos, neutros e básicos. Uma vez que a α - e a β -amanitina são compostos que apresentam características iónicas, a utilização desta coluna para a extracção de ambas as toxinas de matrizes de urina revelou-se inicialmente adequada para o estudo.

Foram, assim, realizadas diversas experiências com a coluna *Clean Screen® DAU*, com diferentes tratamentos de amostra e procedimentos de extracção seguidas e adaptadas de diversos autores (Tabela 2), de forma a definir a SPE ideal, isto é, que extraísse ambos os compostos em estudo, e conseguisse eliminar outros componentes da matriz que pudessem interferir com os analitos de interesse.

CAPITULO I – ESTUDOS PRELIMINARES

Tabela 2 – Procedimentos de pré-tratamento e de extracção para a análise de α - e β -amanitinas em amostras de urina.

Pré-tratamento	Extracção			Referências Bibliográficas
	Acondicionamento	Lavagem	Eluição	
Diluição das amostras em água (1:1)	(1) Ácido acético aquoso (1%), 10x volume da coluna (2) Metanol, 3 mL (3) Água Ultra-Pura, 3 mL	Ácido acético aquoso (1%), 3 mL	Metanol, 6 mL	Maurer, H.H., <i>et al</i> , 1997
Adição de ácido sulfúrico à amostra para ajustar pH a 2; Verter solução para uma ampola de decantação; Adição de 10 mL de n-butanol e agitar durante 5 mins; Remover o extracto butanólico para um tubo de ensaio; Evaporar o extracto sob corrente de azoto a 100°C; Reconstituir em 5 mL de tampão fosfato 0.1 M, pH 6.8.	(1) Metanol, 6 mL (2) Água Ultra-Pura, 6 mL	(1) Água Ultra-Pura, 2 mL (2) Acetonitrilo, 2 mL	Metanol, 4 mL	Bidnychenko, Y., <i>et al</i> , 2008
-	(1) Metanol, 3 mL (2) Água Ultra-Pura, 3 mL (3) Ácido acético aquoso (1%), 12 mL Após adição da amostra, secar a coluna numa centrífuga, a 3000 rpm, durante 5 mins., a 4°C.	Ácido acético aquoso (1%), 3 mL Após lavagem, secar a coluna numa centrífuga, a 3000 rpm, durante 5 mins., a 4°C.	Metanol, 6 mL	Adaptado de: Maurer, H.H., <i>et al</i> , 1997

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

Tabela 2 – (CONTINUAÇÃO)

Pré-tratamento	Extracção			Referências Bibliográficas
	Acondicionamento	Lavagem	Eluição	
Adição de ácido sulfúrico à amostra para ajustar pH a 2; Verter solução para uma ampola de decantação; Adição de 10 mL de n-butanol e agitar durante 5 mins; Remover o extracto butanólico para um tubo de ensaio		-		Adaptado de: Bidnychenko, Y., <i>et al</i> , 2008
Adição de 2 mL de tampão fosfato 0.1 M a pH 6 à amostra de urina e agitar no vórtex; Filtrou-se a solução para um novo tubo de ensaio.	(1) Metanol, 2 mL (2) Água Ultra-Pura, 2 mL (3) Tampão fosfato 0.1 M, pH 6	(1) Água Ultra-Pura, 6 mL (2) HCl 0.1 M, 3 mL (3) Clorofórmio/Metanol (95:5, v/v), 5 mL Após lavagem, procedeu-se à secagem da coluna sob vácuo, durante 10 mins.	Metanol, 2 mL	Defendenti <i>et al</i> , 1998

2.2.1. Resultados e observações

Relativamente ao procedimento de extracção, das técnicas anteriormente apresentadas, à excepção do último procedimento, não conseguimos obter resultados aceitáveis para nenhuma das extracções, devido à obtenção de extractos pouco limpos da amostra, condicionando uma fraca sensibilidade e separação dos analitos em estudo, assim como uma baixa recuperação destes compostos.

Pelo procedimento extractivo descrito por Defendenti *et al* (1998), foi possível detectar somente a α -amanitina com razoável resolução e sensibilidade. Como a β -amanitina se apresenta como um composto ácido, este elui primeiro que a α -amanitina e, conseqüentemente, poderá ter sido maioritariamente eliminado, durante o processo extractivo descrito, no passo de lavagem. Desta forma, para se conseguir extrair ambos os compostos conforme os objectivos propostos, terá que ser definido um novo protocolo de extracção que permita uma eluição simultaneamente de α - e β -amanitinas.

Por outro lado, a própria coluna extractiva não se revelou a mais adequada, uma vez que, tendo em consideração as características químicas dos compostos em estudo, estes apresentam pouca afinidade para colunas em fase reversa, cuja interacção é hidrofóbica (fase apolar-apolar), e o mecanismo de troca catiónica não é suficiente para obter uma boa extracção dos analitos. Logo, as colunas ideais para a efectuar a extracção de α - e β -amanitina seriam as de interacção hidrofílica (fase polar-polar).

*

Face aos problemas encontrados, houve a necessidade de alterar completamente todo o procedimento analítico, uma vez que nem a coluna de extracção nem os procedimentos de extracção se mostraram ideais para a obtenção de ambos os compostos, assim como o próprio método de detecção não era suficientemente sensível para realizar estudos qualitativos e quantitativos com resultados desejáveis.

Assim, para contornar os problemas apresentados, foi adquirida uma nova coluna de extracção (*Oasis® HLB*, 60 mg, 3 cc, da Waters) e a análise por HPLC-

UV foi substituída pelo método de LC acoplado a espectrometria de massa sequencial (MS/MS).

3. Estudos realizados por LC-MS/MS

Os estudos analíticos posteriores, para ultrapassar a baixa sensibilidade do detector UV, foram realizados com recurso a um método por LC-MS/MS, disponível no Instituto Nacional de Resíduos Biológicos – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (INRB-LNIV).

Foi utilizada uma coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 µm) de fase reversa existente no mesmo Laboratório, uma vez que, como já referido, as colunas com tais características apresentam-se como as mais adequadas para realizar o estudo das condições óptimas para a identificação e detecção de α - e β -amanitinas.

3.1. Optimização da fase móvel

Para este estudo, foram primeiramente estabelecidas as condições óptimas de análise da α - e da β -amanitina por injeção directa no detector, através do programa IntelliStart. Desta forma, definiu-se, especificamente, o ião molecular e as transições iónicas características da fragmentação do ião principal, a voltagem do cone e as energias de colisão ideais para cada transição, de modo automático. Posteriormente, foi realizada a confirmação destas optimizações manualmente, no modo SCAN, com uma solução de α - e β -amanitina a 50 ng/mL.

Depois de definidas as condições de detecção, procedeu-se à definição das condições de separação cromatográfica, nomeadamente a escolha da fase móvel e da velocidade de fluxo, que permitissem otimizar a separação e quantificação dos picos correspondentes aos compostos em estudo. Para tal, preparam-se soluções padrão de 50 ng/mL de α - e β -amanitina em metanol, as quais foram injectadas no

sistema de LC-MS/MS, com volume de injeção de 20 μ L. A aquisição de dados foi efectuada por *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

Assim, para início de estudo, foram efectuadas experiências com a fase móvel ácido fórmico 0.1% : acetonitrilo, já disponível no sistema LC-MS/MS do LNIV. Os estudos com esta fase móvel foram realizados em solução isocrática e em gradiente de eluição, aos fluxos de 0.4 e 0.3 mL/min.. Posteriormente, e tendo em consideração os estudos já efectuados para este parâmetro por HPLC-UV, realizaram-se experiências com a fase móvel acetato de amónia 0.02M pH 5 : acetonitrilo, em solução isocrática e em gradiente de eluição, aos fluxos de 0.3 e 0.5 mL/min..

3.1.1. Resultados e observações

Para as composições de fase móvel ácido fórmico 0.1% : acetonitrilo, e de acetato de amónia 0.02M pH 5 : metanol, tanto em condições isocráticas como em gradiente de eluição, foi possível a detecção dos compostos em estudo. No entanto, não se obtiveram boas separações dos picos dos analitos para nenhum dos estudos com as fases móveis referidas.

A fase móvel já anteriormente estudada por HPLC-UV (acetato de amónia 0.02M pH 5 : acetonitrilo) não se apresentou aplicável em condições isocráticas para esta metodologia, uma vez que o tamanho da coluna utilizada é de dimensões mais reduzidas que a coluna cromatográfica do sistema de HPLC-UV, assim como o próprio sistema de cromatografia líquida a ultra pressão utilizado para este estudo é mais eficiente em termos de rapidez em relação à técnica de HPLC, permitindo resultados em tempos de corrida muito mais curtos. Devido às razões apresentadas, a fase móvel anteriormente optimizada não permitiu a separação dos picos correspondentes à α - e β -amanitina, tendo sido, por isso, necessário recorrer a estudos por gradiente de eluição com a fase móvel acetato de amónia 0.02M pH 5 : acetonitrilo, os quais mostraram bons resultados a nível de separação, de sensibilidade e de resolução.

Uma vez que um dos objectivos propostos era a detecção de dois compostos, α - e β -amanitina, com massas moleculares diferenciadas somente por uma unidade, a separação destes compostos apresentou-se como um factor importante para a eficiente distinção dos mesmos. Na realidade, a fase móvel acetato de amónia 0.02M pH 5 : acetonitrilo em gradiente de eluição, e a coluna cromatográfica C18 utilizada demonstraram ser eficazes para os compostos a analisar. Foi, assim, importante verificar que as condições utilizadas garantiam a separação cromatográfica de ambos as toxinas. Foi, igualmente, demonstrado que a velocidade de fluxo mais adequada para uma boa separação dos analitos é a de 5 mL/min..

É, também, de mencionar que a coluna BEH C18 (*Bridged Ethyl-siloxano/silica Hybrid*) utilizada para este estudo mostrou-se bastante robusta ao longo de todo o processo de optimização do método e, posteriormente, para os estudos de parâmetros de validação. Esta coluna é considerada estável num intervalo de pH entre 1 e 12, devido à estabilidade química intrínseca da partícula híbrida, permitindo separações mais versáteis e robustas. É, também, especialmente indicada para a retenção de compostos hidrofílicos quando se utilizam fases móveis com grande percentagem de fase aquosa, prevenindo o colapso da fase estacionária e deixando-a desimpedida para a retenção dos compostos.

3.2. Procedimentos extractivos e purificativos

Depois de optimizadas as condições da técnica cromatográfica pelo novo sistema LC-MS/MS, realizou-se um estudo de novos procedimentos de tratamento da amostra e de extracção/purificação da α - e β -amanitina da matriz biológica (urina).

Relativamente à SPE, a maioria dos trabalhos publicados consultados descreve a utilização de colunas de C18. Contudo, dados os maus resultados obtidos com este tipo de coluna, nomeadamente no que se refere à pouca fluidez em termos de fluxo após aplicação do extracto, bem como na fraca recuperação observada, foi experimentado outro tipo de coluna para tentar melhorar as condições extractivas.

Desta forma, foi adquirida uma nova coluna de extracção (*Oasis® HLB*, 60 mg, 3 cc, da Waters), com características hidrofílicas-lipofílicas fornecidas por um adsorvente co-polimérico, constituído por N-vinilpirrolidona-divinilbenzeno, que permite uma retenção mais eficaz de analitos polares.

Para este estudo, foram, primeiramente, realizadas experiências na coluna referida sem tratamento prévio das amostras, com soluções aquosas de α - e β -amanitina a 200 ng/mL. Os extractos obtidos após o procedimento extractivo foram evaporados até à secura sob corrente de azoto, a 60°C e, posteriormente, o resíduo seco foi reconstituído em 500 μ L de fase móvel (100% acetato de amónia 0.02M pH 5) e filtrado para vials HPLC, com posterior injeção no sistema cromatográfico.

Em seguida, realizaram-se os estudos de pré-tratamento de amostras de urina fortificadas a 100 ng/mL, de forma a obter um extracto aquoso limpo, que pudesse ser aplicável na coluna de SPE. Tais estudos basearam-se num processo de precipitação de proteínas por solventes orgânicos, sendo que a fase aquosa obtida no processo final foi filtrada para vials HPLC e injectada no sistema cromatográfico.

Por fim, foram analisadas seis amostras de urina, cedidas por elementos da equipa técnica do LNIV, fortificadas com α - e β -amanitinas a 100 ng/mL, sujeitas ao procedimento completo de preparação por precipitação de proteínas por solventes orgânicos, nomeadamente acetónitrilo e diclorometano, seguido de extracção por SPE com as colunas mencionadas.

É de referir que todos os estudos efectuados para esta metodologia analítica, foram realizados com um volume de urina de 1 mL.

3.2.1. Resultados e observações

A utilização do enchimento do tipo *Oasis® HLB* (do inglês *hidrofilic-lipofilic balance*) demonstrou ser o mais eficiente no estudo efectuado de optimização das condições de SPE. As propriedades hidrofílicas-lipofílicas que caracterizam esta coluna, permitiram uma retenção mais eficaz de ambos os compostos hidrofílicos, α - e β -amanitina. Foi, assim, possível obter ambos os compostos no mesmo extracto, como pretendido, com resultados analíticos de boa resolução e sensibilidade. Foi,

igualmente, observado uma maior fluidez em termos de fluxo, bem como uma maior recuperação no procedimento extractivo de amostras de urinas com este tipo de coluna. Com recurso a um tratamento prévio à SPE, o extracto obtido demonstrou, ainda, ser muito mais limpo de compostos interferentes possibilitando uma razão sinal/ruído muito maior ganhando-se em sensibilidade e em especificidade.

3.3. Estudo de padrão interno

Os padrões internos são compostos frequentemente utilizados em análises cromatográficas, sendo deliberadamente adicionados numa concentração conhecida a todas as amostras a serem analisadas. Funcionam como compostos controlo no desenvolvimento de metodologias analíticas, uma vez que permitem monitorizar todo o procedimento analítico, desde a fase de pré-tratamento e extracção da amostra, à sua injeção no sistema cromatográfico, ao processo de ionização até à obtenção do sinal no detector.

Um padrão interno define-se, assim, como uma substância que apresenta comportamento químico e resposta analítica similar a um determinado analito, mas que fornece um sinal cromatográfico distinto deste. Idealmente, qualquer factor que afecte o sinal do analito irá também afectar o sinal do padrão interno ao mesmo nível. Para além disso, a razão entre os dois sinais irá exibir menor variabilidade que o sinal do analito em si, uma vez que essa razão irá manter-se constante independentemente da quantidade de analito perdida durante o processo analítico.

Consequentemente, a utilização de tais padrões traduz-se numa vantagem em termos de eficiência de extracção, eficiência no processo de ionização e co-eluição do analito. Os padrões são utilizados nos métodos qualitativos e quantitativos por LC-MS, para compensar as diferenças que poderão existir durante a análise das diferentes amostras, não só no que respeita à eficiência do processo extractivo, mas também do processo de ionização.

O padrão interno mais adequado para este tipo de análises quantitativas deverá ser uma versão isotopicamente marcada da molécula que se pretende quantificar.

Geralmente, dada a abundância de hidrogénios em moléculas orgânicas, o isótopo frequentemente usado é o deutério (^2H ou D), uma vez que um padrão interno deuterado terá a mesma taxa de recuperação de extracção, resposta de ionização em ESI (modo de ionização utilizado no presente estudo) e o mesmo tempo de retenção cromatográfico que o analito em estudo. Uma importante característica deste tipo de padrão interno é que deverá co-eluir com o composto a ser quantificado. Para além disso, deverá conter suficiente acréscimo de massa para revelar um sinal fora da distribuição natural de massa do analito (Ribani *et al*, 2004; Emer *et al*, 2005). Uma desvantagem do uso de padrões internos deuterados prende-se com os elevados custos que tais padrões isotopicamente marcados acarretam, uma vez que estes não se encontram comercialmente disponíveis, sendo produtos sintetizados para o efeito.

Na impossibilidade de utilização deste tipo de padrões deuterados, são seleccionados outros tipos de compostos, diferentes dos analitos em estudo, mas que apresentem estrutura molecular, características físico-químicas e comportamentos cromatográficos semelhantes a estes. Dada a extrema importância dos padrões internos neste tipo de métodos, a sua selecção deve ser criteriosa. Assim, para uma substância ser utilizada como padrão interno deverá cumprir determinados requisitos, já inerentes aos padrões deuterados, os quais devem ser estudados previamente à sua selecção. Esses requisitos incluem fornecer picos cromatográficos com boa resolução para assegurar áreas únicas e claras, eluir próximo dos compostos a serem medidos para minimizar qualquer mudança na resposta do detector devida a alterações nas condições de operação (fluxo, temperatura, etc.), não estar presente na amostra original e não reagir quimicamente com a amostra, para assegurar que a quantidade de padrão interno é conhecida de forma precisa, e estar presente numa concentração aproximada à dos componentes a serem medidos, de forma a minimizar efeitos de resposta não linear do detector (Ribani *et al*, 2004; Emer *et al*, 2005).

Dada a importância da utilização de padrões internos no desenvolvimento de metodologias analíticas, como no presente trabalho, foram realizados estudos para seleccionar um composto adequado que cumprisse os critérios anteriormente referidos. Assim, posteriormente à definição efectiva das condições de extracção e

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

cromatográficas para a análise de α - e β -amanitinas, foi seleccionado como padrão interno o composto eritromicina, pelas características estruturais e físico-químicas semelhantes que apresenta relativamente aos compostos em estudo.

A eritromicina foi estudada a partir de uma solução metanólica a 4 $\mu\text{g/mL}$, em amostras fortificadas, tendo sido sujeita ao processo extractivo seleccionado com posterior análise cromatográfica. Primeiramente, foram optimizadas as transições iónicas características deste composto, assim como foram definidas as condições do tipo de electrospray a aplicar à substância (voltagem do cone e energia de colisão ideal para cada transição iónica do composto) de modo automático (por injeção directa no detector) pelo programa IntelliStart.

3.3.1. Resultados e observações

Para a identificação da eritromicina, foram determinados o tempo de retenção, e para além do ião molecular, duas transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo, após a ionização por ESI^+ . As transições monitorizadas para a eritromicina foram, assim, $734.67 > 576.47$ e $734.67 > 158.09$, e o tempo de retenção obtido foi na ordem dos 7.10 mins. (figura 12).

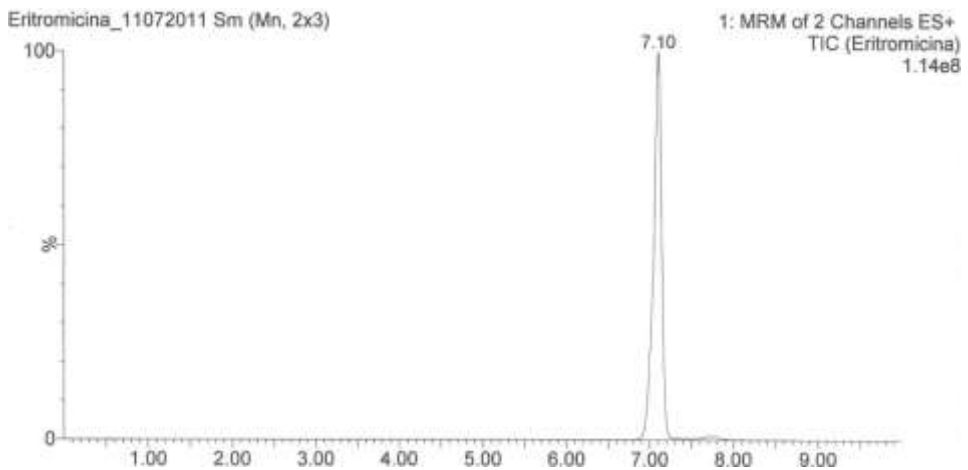


Figura 12 – Cromatograma iónico total (TIC) da eritromicina, obtido por injeção de 20 μL de uma solução padrão a 10 $\mu\text{g/mL}$.

As condições experimentais de fragmentação do detector MS/MS para determinação de eritromicina em amostras de urina obtido pelo programa IntelliStart foram, para a transição iónica $734.67 > 576.47$, 28 V para a voltagem do cone e 18 eV para a energia de colisão; e, para a transição iónica $734.67 > 158.09$, 28 V para a voltagem do cone e 32 eV para a energia de colisão.

A eritromicina revelou-se uma boa escolha para padrão interno, uma vez que apresentou comportamentos cromatográficos semelhantes à da α - e β -amanitina, para além de apresentar estrutura molecular e características físico-químicas semelhantes, sendo, por isso, um composto representativo dos compostos em estudo. Contudo, quando foram realizadas experiências em amostras de urina brancas e fortificadas com os analitos, com respectivo processo de preparação e de extracção, isentas de padrão interno, verificou-se a existência de picos com o mesmo RT da eritromicina, os quais apresentavam as duas transições iónicas características deste composto (figura 13).

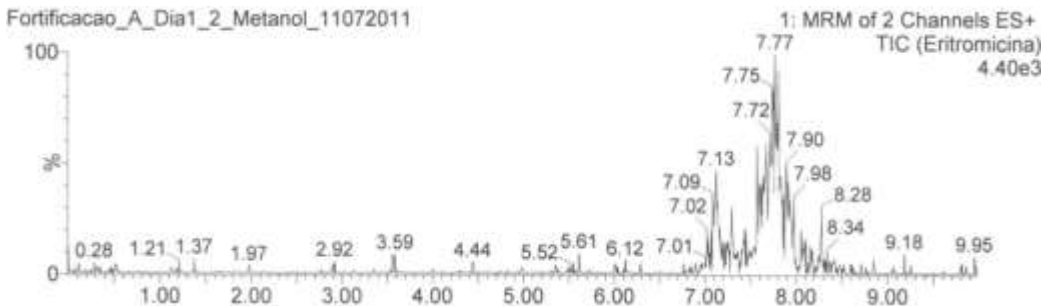


Figura 13 - Cromatograma iónico total (TIC) da eritromicina, obtido por injeção de 20 μ L de uma amostra fortificada com α - e β -amanitina, a 100 ng/mL, isenta de padrão interno (eritromicina).

Apesar da quantidade residual observada, verificou-se que não existia reprodutibilidade entre os resultados quando era realizada a análise de amostras fortificadas com este padrão interno. Devido à indisponibilidade em termos de tempo, de equipamento e de compostos adequados para realizar mais estudos a este nível, optou-se por desenvolver a metodologia descrita para realização da presente dissertação sem recurso a padrão interno.

CAPITULO II

DETERMINAÇÃO ANALÍTICA LABORATORIAL

1. Introdução

Finalizados os estudos preliminares descritos na secção anterior, foi estabelecida a metodologia para determinação de α - e β -amanitinas em urina. O desenvolvimento desta metodologia engloba o recurso a procedimentos de pré-tratamento e de extracção, nomeadamente a precipitação de proteínas por solventes orgânicos e a técnica de SPE, respectivamente, e posterior análise por LC-MS/MS. Assim, após os ensaios realizados para optimização das condições experimentais, conclui-se que as colunas indicadas para extracção por SPE são as *Oasis® HLB* e a fase móvel mais adequada para identificação e separação dos compostos de interesse é acetonitrilo/tampão fosfato 0.02 pH 5, em gradiente de eluição.

A metodologia de extracção por SPE foi adoptada para realização desta tese, uma vez que se trata de uma metodologia simples, rápida no seu processo extractivo, económica quanto ao reagentes utilizados, e muito vantajosa uma vez que permite obter extractos muito limpos e puros. Apresenta-se como uma técnica adequada para extracção de compostos orgânicos hidrofílicos como é o caso das toxinas em estudo.

A LC-MS/MS é uma técnica analítica de impacto actual e com um vasto campo de aplicações. A técnica cromatográfica por LC foi, assim, adoptada para a elaboração desta dissertação pelas vantagens que apresenta na investigação de substâncias polares, de elevado peso molecular e termolábeis, nomeadamente no que se refere à maior versatilidade na utilização da amostra e também pelo elevado poder de resolução, além de se tratar de um processo de separação rápido e de grande complexidade. Esta técnica permite, igualmente, uma maior amplitude na escolha de fases estacionárias e móveis, a monitorização contínua do eluente, análises repetitivas e reprodutíveis, sendo também possível a automatização do processo analítico e do tratamento de dados. O detector de massa sequencial, quando acoplado a sistema de LC, permite, ainda, acrescentar critérios de sensibilidade, versatilidade e universalidade, potenciando a sua utilização. Permite, igualmente, o controlo do ião molecular e de transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo, para uma identificação inequívoca do analito de interesse.

2. *Material e reagentes*

2.1. Substâncias estudadas

As amatoxinas em estudo foram:

- **α -Amanitina** (grau de pureza \geq 90% HPLC, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)
- **β -Amanitina** (grau de pureza \approx 90% HPLC, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)

2.2. Reagentes

Durante a análise, foram utilizados reagentes de grau analítico p.a. No caso dos reagentes utilizados para as fases móveis utilizaram-se reagentes com grau de pureza indicado para HPLC e água ultra-pura Milli Q (tipo II) obtida com sistema Millipore (França).

Os reagentes diclorometano, clorofórmio, acetato de amónia e ácido acético glacial foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha); os reagentes acetonitrilo e metanol de grau de pureza indicado para HPLC foram obtidos, respectivamente, pela JT Baker (Deventer, Holanda) e pela Fischer Chemical (Leicestershire, Reino Unido).

2.3. Material laboratorial

Para além do material de vidro corrente em laboratório, foram utilizados tubos de centrífuga, com capacidade de 15 mL e dimensões 120×17 mm, micropipetas BioHit (Helsínquia, Finlândia) de volume variável 20-200 μ L, micropipetas Finnpiptette® Datamed (Minas Gerais, Brasil) de volume variável 1-5 mL e 200-100 μ L, vórtex, centrífuga Megafuge 1.0R Labcare (Buckinghamshire, Inglaterra), balança analítica PG803 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal), medidor de pH 632

METROHM (Herisau, Suíça), e agitador magnético Agimatic 243 (Barcelona, Espanha).

Para preparação das fases móveis, foi utilizado o seguinte material: sistema de filtração de eluentes para HPLC acoplado a bomba de vácuo, filtros de membrana de poliamida (0.2 μm , 47 mm) da marca Whatman (Maidstone, Inglaterra) e tina de ultra-sons TRANSSONIC 660/H (Ithaca, NY, USA).

O sistema de extracção em fase sólida consistiu em colunas *Oasis® HLB 3cc* (60 mg), da marca Waters (Milford, MA, USA) e extractor da marca Whatman (Maidstone, Inglaterra) acoplado a um sistema de vácuo.

Para evaporação dos extractos e injeção no sistema cromatográfico, foi utilizada uma manta de aquecimento para tubos de ensaio QTB2 Grant Systems (Cambridge, Inglaterra), vials para HPLC e filtros *Syringeless Device Mini-UniPrep* (PVDF, Polipropileno) da marca Whatman (Maidstone, Inglaterra).

2.4. Amostras biológicas

- Urina

As amostras de urina, isentas de amatoxinas, necessárias à realização desta dissertação foram voluntariamente cedidas por diversos elementos do laboratório do Grupo de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e da equipa técnica do LNIV, do sexo masculino e feminino com idades compreendidas entre os 21 e os 42 anos. A amostra correspondente ao caso real estudado foi obtida de cadáver (Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INML, I.P.), e cedida pelo Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML, I.P.

As amostras foram utilizadas no desenvolvimento da metodologia analítica e na avaliação da qualidade dos resultados obtidos por fortificação a diversas concentrações conhecidas de soluções padrão α - e β -amanitina, à excepção da amostra real.

3. *Preparação de soluções*

3.1. Soluções padrão e soluções de trabalho

As soluções «stock» de padrão de α - e β -amanitina foram preparadas em metanol, obtendo-se soluções padrão a 40 $\mu\text{g/mL}$. A partir destas soluções, foram obtidas, por processos de diluição sucessivos, as soluções de trabalho a 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de α - e β -amanitina, respectivamente.

As soluções padrão, assim como as soluções de trabalho foram mantidas à temperatura de congelação de -21°C , em recipiente hermeticamente fechado num local bem ventilado, de acordo com os dados de segurança recomendados pela Sigma-Aldrich, durante todo o processo de desenvolvimento da metodologia analítica. Estas soluções foram preparadas em recipientes âmbar, para protecção da luz, uma vez que a α - e β -amanitina são fotossensíveis (Sigma-Aldrich, 2010).

3.2. Fase móvel

- **Acetonitrilo**

Procedeu-se à filtração da solução num sistema de filtração de eluentes para HPLC, sob vácuo, com uma membrana PVDF (0.45 μm , 13 mm), com posterior desgaseificação em ultra-sons, durante 15 min.

- **Tampão fosfato 0.02 M pH 5**

Pesou-se 1.5416 g de acetato de amónia para um balão aferido de 1000 mL e perpez-se com água Milli-Q até obter um volume de ≈ 900 mL. Em seguida, aferiu-se o pH da solução para 5 ± 0.1 com ácido acético glacial. Após acerto de pH, perpez-se o volume final de 1000 mL da solução.

Procedeu-se à filtração da solução num sistema de filtração de eluentes para HPLC, sob vácuo, com uma membrana PVDF (0.45 μm , 13 mm), com posterior desgaseificação em ultra-sons, durante 15 min.

4. Estudo experimental

O desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC-MS/MS requer a realização de muito trabalho prévio, passando este por três passos fundamentais: a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a detecção por espectrometria de massa.

4.1. Preparação das amostras biológicas

As amostras de urina utilizadas para este procedimento foram recolhidas no momento de realização da metodologia. Para proceder à fortificação das amostras, realizaram-se alíquotas de 1 mL de urina branca (isenta de amanitinas) e, posteriormente, foi adicionado 50 µL de solução de α -amanitina a 2 µg/mL e 50 µL de solução β -amanitina a 2 µg/mL, cada solução em diferentes alíquotas. Seguidamente, as soluções foram agitadas no vórtex durante 30 segundos.

A amostra de urina necessitou de uma preparação prévia, por adição de solventes orgânicos para precipitação de proteínas existentes na matriz, antes de ser submetida ao processo de extracção de SPE.

4.2. Precipitação de proteínas por solventes orgânicos

Para proceder à preparação da amostra previamente à execução da técnica de SPE, foi utilizado acetonitrilo como solvente orgânico para remoção de compostos proteicos da matriz de urina, com posterior eliminação deste solvente com outro solvente orgânico, o diclorometano.

4.2.1. Procedimento de extracção

A uma alíquota de 1 mL de urina, foram adicionados 2 mL de acetonitrilo. Agitou-se a amostra no vórtex durante 30 segundos e, posteriormente, procedeu-se à centrifugação durante 10 min., a 2000 rpm, a uma temperatura de 4 °C. O

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

sobrenadante foi decantado para um tubo de centrífuga de 15 mL. Após adição de 5 mL de diclorometano, o tubo foi invertido diversas vezes, e centrifugado durante 5 min., a 2000 rpm, a uma temperatura de 4°C. Retirou-se, cuidadosamente, cerca de 1 mL da camada aquosa superior e transferiu-se para um tubo de centrífuga de 15 mL, para ser posteriormente submetida à extracção em fase sólida.

*

As amostras de urina foram, como referido, primeiramente preparadas por adição de acetonitrilo. Este composto, uma vez que apresenta uma constante dieléctrica bastante inferior à da água, ao ser adicionado à solução aquosa, permite que as interacções proteína-proteína aí presentes prevaleçam sobre o poder de solvatação da água (interacção proteína-água), com conseqüente precipitação das proteínas.

A centrifugação subsequente, como processo de separação, permitiu uma melhor separação do sobrenadante e do precipitado, facilitando a precipitação dos componentes proteicos, susceptíveis de bloquear os poros da coluna, o que dificultaria o processo de SPE.

Posteriormente, é adicionado diclorometano, composto de média polaridade, para remoção do acetonitrilo. Quando se adiciona o segundo solvente orgânico, formam-se duas fases, uma aquosa e uma orgânica. Ou seja, quando se adiciona o diclorometano, uma vez que este não forma pontes de hidrogénio com a água, são favorecidas as forças dipolo-dipolo que se vão estabelecer entre este composto e o acetonitrilo, de polaridade semelhante, permitindo obter um extracto aquoso livre de proteínas (mais puro).

Este passo de preparação da amostra foi fundamental, uma vez que impede o entupimento das colunas de extracção e proporciona a obtenção de uma amostra mais limpa para posterior extracção por SPE.

4.3. Extração em fase sólida (SPE)

Para extrair o analito das amostras biológicas, foram utilizadas colunas de SPE com as seguintes características:

Oasis® HLB, 3cc, 60 mg, 30 µm Waters :

- Diâmetro médio da partícula: 29 µm
- Diâmetro médio do poro: 86 Å
- Volume total do poro: 1.38 cm³/g
- Área de Superfície Específica: 809 m²/g

4.3.1. Procedimento de extração

Após montagem adequada do sistema, com extractor acoplado ao sistema de vácuo, e colunas *Oasis® HLB* adaptadas, procedeu-se aos seguintes passos de extração:

Acondicionamento:

- Adição de 2 mL de metanol
- Adição de 2 mL de água Milli Q

Adição de ≈ 1 mL de amostra (urina)

Lavagem:

- 1 mL de 5% de Metanol em Clorofórmio

Eluição:

- 2 mL de Metanol

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

Os extractos foram posteriormente evaporados à secura sob corrente de azoto, a 60°C. O resíduo seco foi reconstituído em 300 µL de fase móvel (100% de tampão acetato 0.02 M pH 5), e agitado no vórtex para a recuperação completa da amostra. Foi, posteriormente, filtrado para vials HPLC e foram injectados 20 µL da reconstituição no sistema LC-MS/MS.

*

O mecanismo ideal de retenção por SPE para a extracção da α - e da β -amanitina, face às características físico-químicas destes compostos, revelou ser, como já referido, o mecanismo com balanço hidrofílico-lipofílico, garantido pelo recurso a colunas de extracção *Oasis HLB*.

O procedimento de SPE descrito consistiu, assim, primeiramente na activação das colunas por adição de metanol, de modo a realizar a solvatação dos grupos funcionais da fase estacionária da coluna e a eliminação de quaisquer impurezas e de ar presentes nesta, com o fim de se obter uma melhor adsorção dos compostos de interesse. A adição posterior de água pretendia a remoção do solvente utilizado para activação. O mecanismo de adsorção ficou, assim, funcionalmente adequado para a adição da amostra aquosa. Este passo é essencial, uma vez que melhora a reprodutibilidade do método, permitindo preparar as colunas para receber as amostras, remover impurezas e eliminar ar presente na coluna, pois o solvente substitui os espaços vazios de enchimento. Durante esta fase, é fundamental não deixar secar o material adsorvente para evitar baixas recuperações do analito. No entanto, devido às características da coluna utilizada neste procedimento, a secagem do adsorvente é possível na medida em que não tem qualquer influência na eficiência da extracção.

Prosseguiu-se, posteriormente, com a adição da fase aquosa, obtida no passo inicial de preparação da amostra, para retenção dos compostos em estudo na coluna, com subsequente lavagem com fase orgânica (5% metanol em clorofórmio) para eliminar interferentes da matriz que poderão ter sido retidos na coluna simultaneamente com os compostos de interesse, sem eliminação dos últimos.

Por fim, é realizada a eluição dos compostos com 100% metanol, composto orgânico polar, que devido às suas características químicas, apresenta-se como o solvente mais adequado com capacidade para remover a máxima quantidade de analito adsorvido. Este passo final é extremamente importante, pretendendo-se com ele obter os compostos de interesse num extracto puro, sem eluição de outros componentes da matriz que não foram retirados no passo de lavagem, permitindo, assim, uma melhor análise pelo sistema cromatográfico.

A execução do processo extractivo teve por base um mecanismo de retenção de fase reversa, tendo em conta as características das colunas utilizadas. As colunas *Oasis HLB*, como o próprio nome indica, *hidrofilic-lipofilic balance*, são compostas por igual parte de dois monómeros, um hidrofílico (vinilpirrolidina) e um lipofílico (divinilbenzeno), como referido anteriormente. A parte hidrofílica do polímero contribui com um aumento da polaridade da fase sólida, enquanto que a lipofílica aumenta a área da superfície de retenção. No caso das α - e β -amanitinas, sendo compostos hidrofílicos e polares, estas colunas demonstraram ser a opção mais indicada para a sua extracção em amostras de urina.

4.4. Caracterização da metodologia analítica usada para identificação e confirmação das substâncias em estudo nas amostras biológicas

4.4.1. Sistema de LC-MS/MS

Foi utilizado um método analítico por Cromatografia Líquida (LC) acoplado a um detector de massa sequencial (MS/MS), com ionização por electrospray em modo positivo (ESI^+), e analisador de massa triplo quadrupolo. A aquisição dos dados foi efectuada por *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico utilizado no presente estudo é caracterizado pelos seguintes componentes:

- Coluna ACQUITY UPLC® BEH C18, 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm (Waters, Milford, MA, USA);
- UPLC Acquity de marca Waters (Milford, MA, USA), composto por bomba binária; injector automático de volume variável com sistema de refrigeração para as amostras e forno para as colunas;
- Detector MS/MS de marca Waters (Milford, MA, USA), modelo XEVO TQ MS, em fonte de ionização TurboIonspray;
- Software MassLynx, versão 4.1 SCN 714 (Waters, Milford, MA, USA), acoplado a um computador.

4.4.2. Condições de detecção

Para definir as condições do tipo de ESI a aplicar às substâncias, assim como a voltagem ideal para a fragmentação de cada composto, foi inicialmente realizada uma injeção directa no detector de massas (sem passar previamente por qualquer coluna cromatográfica), a um fluxo de 0.2 mL/min., dos padrões analíticos em estudo (α - e β -amanitinas) a uma concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$.

Esta injeção directa permitiu também a optimização das transições iónicas a analisar, características de cada molécula, pelo programa IntelliStart. Para a identificação de ambas as substâncias, foram determinadas, para além do ião molecular, duas transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo, após a ionização por ESI⁺, as quais foram, posteriormente, confirmadas manualmente em modo SCAN, a uma concentração de 50 ng/mL.

Foi preferida a ionização em modo positivo uma vez que, em modo negativo os sinais obtidos eram de intensidade muito inferior. A utilização de ESI em modo negativo poderia impossibilitar a detecção e quantificação da α - e β -amanitinas.

As condições de detecção definidas estão apresetadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Condições experimentais de fragmentação do detector MS/MS para determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina.

Detector de Espectrometria de Massa (MS/MS)	
Ionização	Electrospray de modo positivo
Voltagem do capilar	1.5 kV
Voltagem do cone	
α -amanitina	44 V
β -amanitina	42 V
Extractor	3 V
Temperatura da Fonte	150 °C
Temperatura de Dessolvatação	500 °C
Fluxo do Gás do Cone (N₂)	0 L/hr
Fluxo do Gás de Dessolvatação (N₂)	1000 L/hr
Fluxo do Gás de Colisão (Ar)	0.22 mL/min.
Energia de Colisão	
α -amanitina	
Transição 919 – 259	44 eV
Transição 919 – 901	28 eV
β -amanitina	
Transição 920 – 259	42 eV
Transição 920 – 901	26 eV

Tabela 4 – Transições iónicas características dos compostos α - e β -amanitinas.

Composto	Ião Precursor (m/z)	Ião Produto (m/z)
α -amanitina	919.48	901.53
		259.13
β -amanitina	920.48	902.44
		259.13

4.4.3. Condições cromatográficas

Depois de definidas as condições de detecção, com o fim de otimizar a separação e identificação dos picos correspondentes aos compostos sob objecto de estudo, especificamente, a α - e β -amanitina, avançou-se para a definição das condições de separação cromatográfica (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Condições experimentais do sistema LC para determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina.

Sistema de Cromatografia Líquida (LC)	
Fase Estacionária	Coluna BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm
Fase móvel	Acetonitrilo (A) Acetato de Amónia 0.02 M pH 5 (B)
Fluxo	0.5 mL/min.
Volume de Injecção	20 μ L
Temperatura da Coluna	40 °C
Temperatura do Injetor	10 °C
Tempo de Corrida	10 min.

Tabela 6 – Gradiente de eluição para a fase móvel acetonitrilo (A): acetato de amónia (B), utilizado para determinação de α - e β -amanitinas em amostras de urina, no sistema LC.

Tempo (mins.)	% A	% B
0	100	0
5.00	87.5	12.5
6.00	87.5	12.5
7.00	0	100
8.00	100	0
10.00	100	0

4.4.4. Ensaio efectuados

i) Identificação das substâncias

Ao ser efectuada uma análise a uma amostra biológica, por norma, não são conhecidas as substâncias que podem estar presentes. É por isso importante garantir a identificação correcta da substância detectada.

Assim, no presente estudo, as substâncias foram identificadas e confirmadas com base no respectivo RT, nas transições iónicas e nos seus espectros de massa. Na tabela 7, são descritas as condições utilizadas para a confirmação dos compostos em estudo, α - e β -amanitinas, no que diz respeito a tempos de retenção e às transições iónicas (ião precursor > ião produto) que resultam num sinal mais intenso em MRM. Para maior credibilidade à identificação do método desenvolvido, como já referido, foi pesquisado, para ambas as substâncias, o ião molecular e duas transições iónicas correspondentes à fragmentação do ião principal.

Tabela 7 – Identificação das transições iónicas e dos tempos de retenção característicos da α - e β -amanitinas.

Composto	Transições Iónicas	Tempos de Retenção (RT)
α -amanitina	919.48 -> 901.53	± 5.20
	919.48 -> 259.13	
β -amanitina	920.48 -> 902.44	± 4.82
	920.48 -> 259.13	

Nas figuras 14 e 15, apresentam-se os cromatogramas iónicos obtidos pela monitorização das transições iónicas utilizadas para a detecção de α - e β -amanitinas, por injeção de 20 μ L de soluções padrão a concentrações de 50 ng/mL.

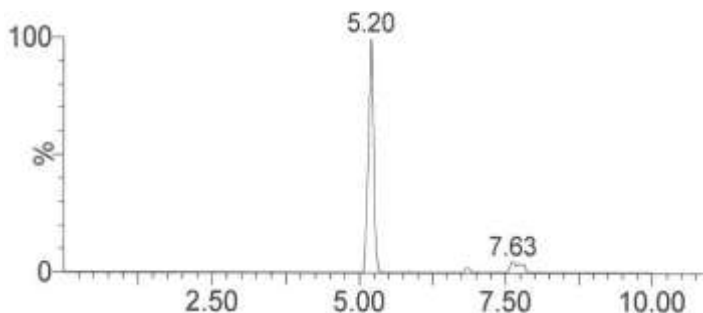


Figura 14 – Cromatograma da transição iónica mais intensa da α -amanitina (919.48 > 259.13), obtido por injeção de 20 μ L de uma solução padrão a 50 ng/mL, com RT=5.20 min.

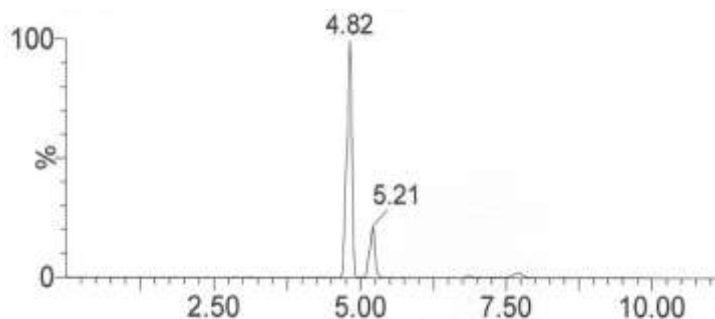


Figura 15 – Cromatograma da transição iónica mais intensa da β -amanitina (920.48 > 902.44), obtido por injeção de 20 μ L de uma solução padrão a 50 ng/mL, com RT=4.82 min.

Nas figuras 16 e 17, estão representados os espectros de massa da fragmentação da molécula protonada da α - e da β -amanitina, respectivamente, obtido por espectrometria de massa sequencial, com identificação das respectivas moléculas.

No modo MS/MS utilizado neste trabalho, a α - e a β -amanitina forneceram picos base a m/z 901 e 902, respectivamente, devido ao ião $[M-18+H]^+$. Contudo, a intensidade do ião da molécula α -amanitina no modo sequencial foi estimado ser muito inferior ao obtido por MS.

CAPITULO II – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA LABORATORIAL

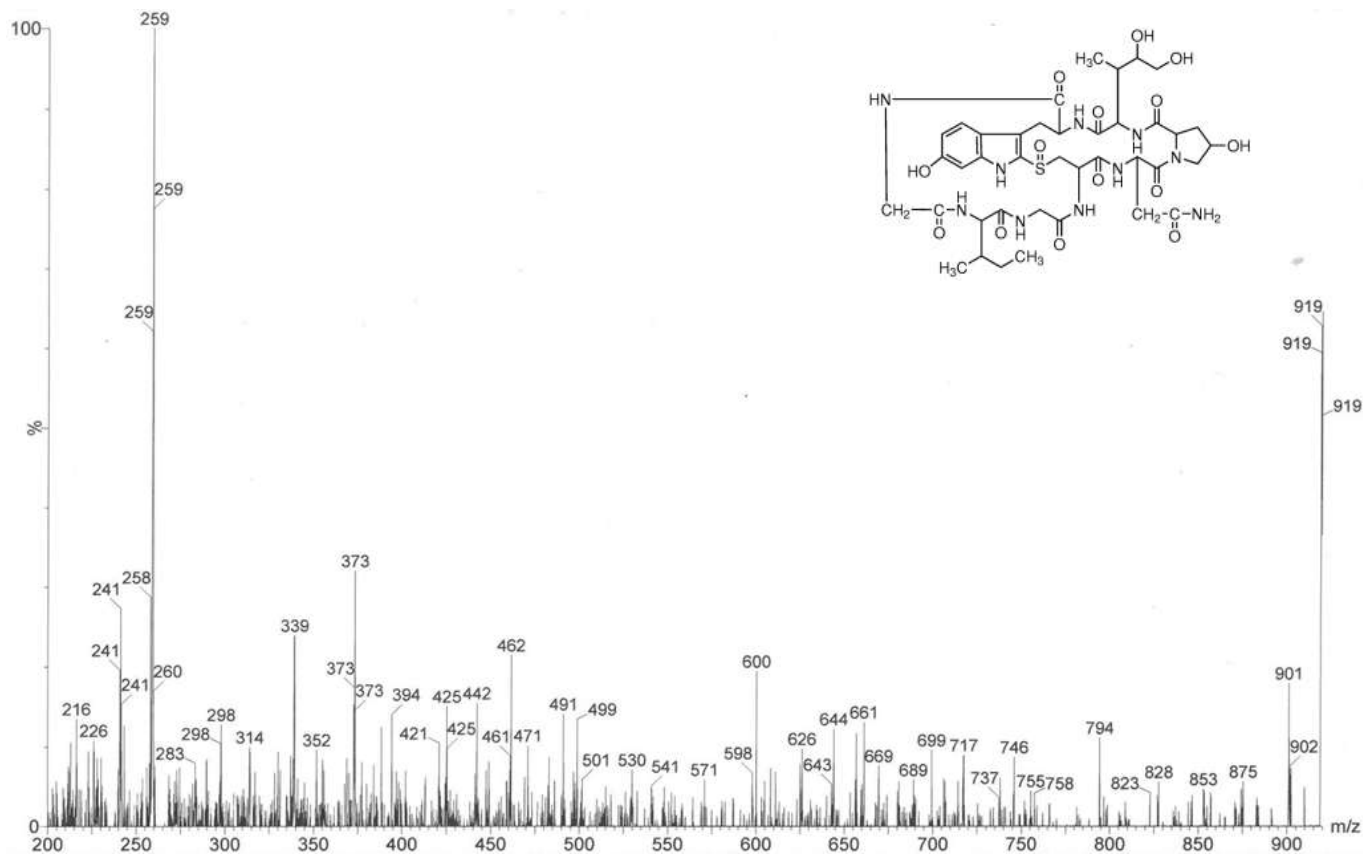


Figura 16 – Espectro de massa da fragmentação da molécula protonada de α -amanitina, obtido por injeção de 20 μ L de uma solução padrão de α -amanitina a 50 ng/mL, com energia de colisão de 44 eV.

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

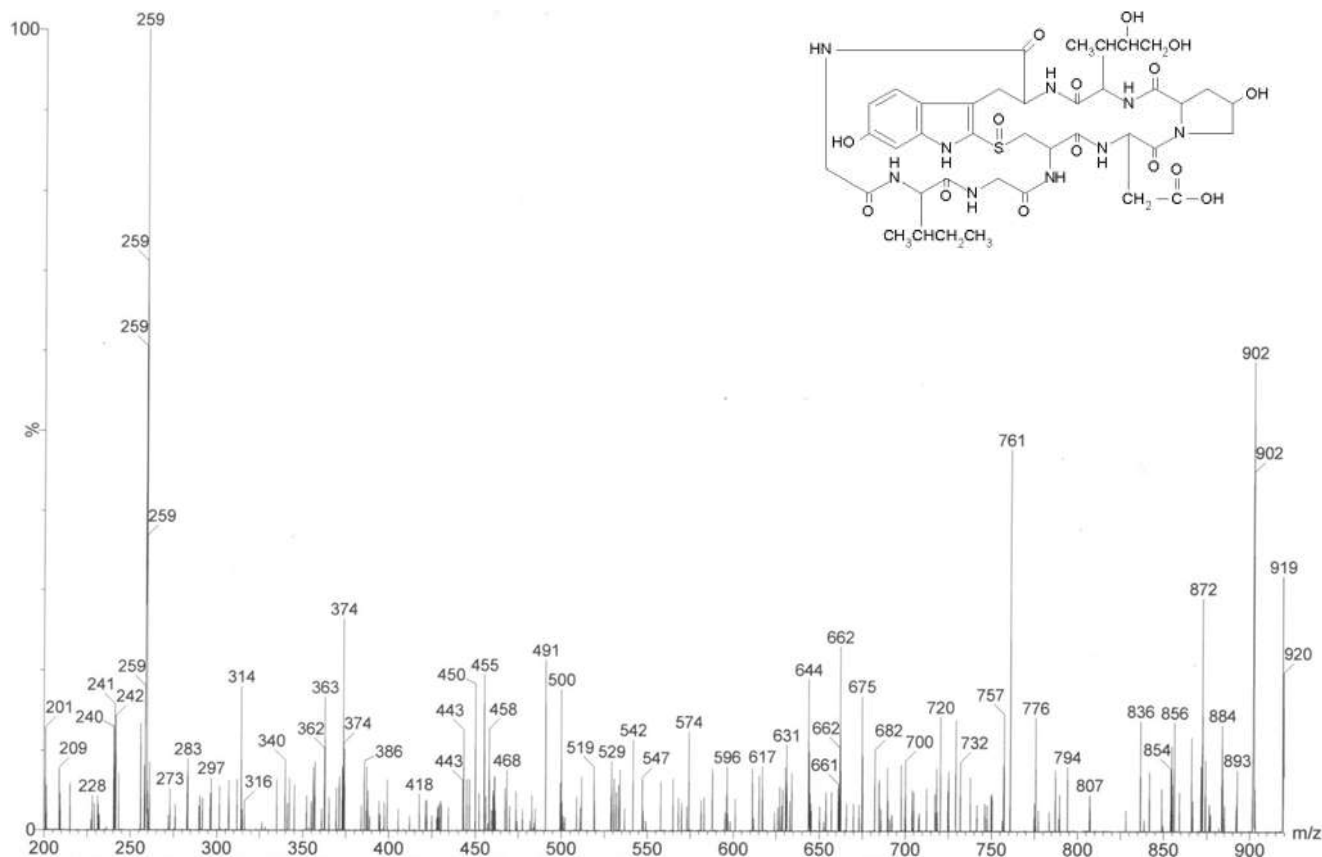


Figura 17 - Espectro de massa da fragmentação da molécula protonada de β -amanitina, obtido por injeção de 20 μ L de uma solução padrão de β -amanitina a 50 ng/mL, com energia de colisão de 42 eV.

ii) Estudo de parâmetros de validação

Para além da identificação das substâncias, foram realizados ensaios de validação, uma vez que é de extrema importância a credibilidade dos resultados obtidos numa determinação analítica. Devido a não existir disponibilidade de tempo e, principalmente, de equipamento, não foram realizados ensaios que permitissem a determinação de parâmetros de validação como a precisão inter-dia (reprodutibilidade), robustez, estabilidade e aplicabilidade do método. Assim, são de seguida descritos alguns parâmetros de validação avaliados para os compostos em estudo em amostras de urina, de acordo com os critérios e normas descritos.

Neste processo, as grandezas analíticas medidas foram: tempo de retenção do analito; intensidade do sinal do ruído de fundo na ausência de sinal; intensidade do sinal do analito.

Todas as determinações foram efectuadas tendo por base a área do pico cromatográfico da transição iónica menos intensa (m/z 919 > 901 para a α -amanitina; m/z 920 > 902 para a β -amanitina) obtido para ambos os compostos.

A. ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE

A selectividade/especificidade de um método pode ser determinada através de diferentes processos. Uma das técnicas mais utilizadas é a determinação da resposta cromatográfica de uma matriz branca, isenta de quaisquer tipos de substâncias. Segundo os critérios estabelecidos, são analisadas entre 10 a 20 amostras brancas de origens distintas (Delacre, 2000). Quando se procede à pesquisa da selectividade de um método analítico cujo objectivo é a determinação de mais do que um analito, esta deve ser avaliada isoladamente para cada um dos analitos, a fim de assegurar a ausência de interferências (FDA, 2001).

No desenvolvimento do método descrito para elaboração desta dissertação, a selectividade foi avaliada através de dez amostras isentas da adição de qualquer tipo de compostos (ausência das substâncias em estudo, ou seja, sem adição de α - e β -amanitina), de dez voluntários de sexo feminino (24 - 36 anos) e masculino (28 - 39

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

anos). Todas as amostras foram sujeitas ao processo analítico desenvolvido, incluindo os passos de preparação e de extracção.

Verificou-se se, no RT esperado, se observa a presença de algum interferente que possa conduzir a uma falsa identificação do composto ou que impeça a sua identificação. Este facto evidencia-se pela observação comparativa entre os cromatogramas das amostras brancas e os cromatogramas das amostras fortificadas com o composto, como se pode visualizar nas figuras 18 e 19.

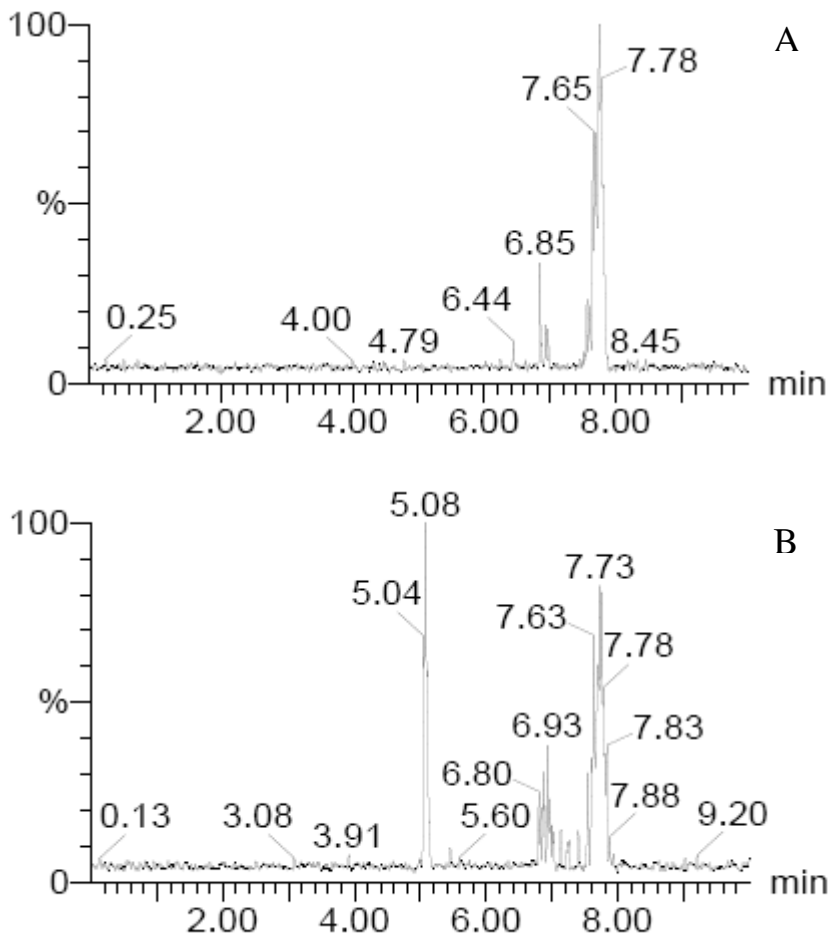


Figura 18 – (A) Cromatograma obtido da análise de uma amostra branca de urina e (B) cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina fortificada a 5 ng/mL (RT = 5.08), ambos referentes à transição iónica m/z 919.48 > 901.53 da α -amanitina.

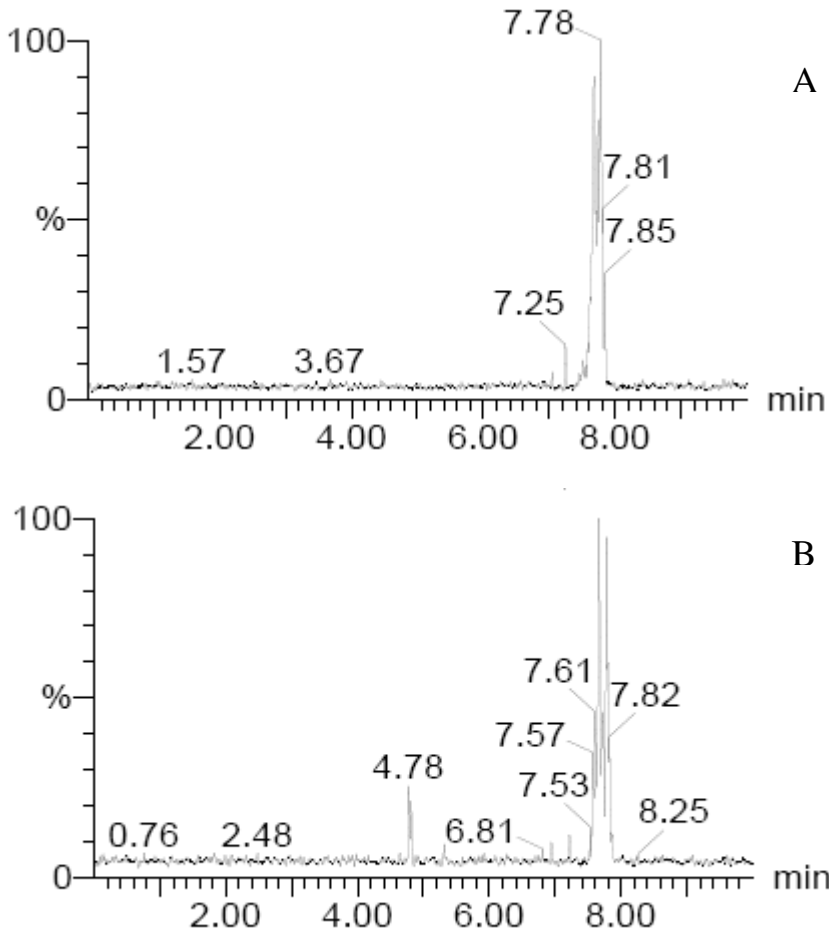


Figura 19 - (A) Cromatograma obtido da análise de uma amostra branca de urina e (B) cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina fortificada a 5 ng/mL (RT = 4.78), ambos referentes à transição iônica m/z 929.48 > 902.44 da β -amanitina.

As 10 amostras brancas analisadas demonstraram a inexistência de interferentes da própria matriz que pudesse comprometer a identificação inequívoca dos compostos, uma vez que, como pode ser visualizado pelas figuras anteriores, não se observaram picos ao mesmo RT dos compostos em estudo.

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

B. LINEARIDADE

A curva de calibração/linearidade do método foi avaliada através da fortificação de amostras de urina a pH 6, com concentrações de α - e β -amanitinas entre 5 e 20 ng/mL. Foram utilizados 5 calibradores para a construção da recta, incluindo o ponto zero, para a construção da recta de calibração (5, 10, 15 e 20 ng/mL). Para cada nível de fortificação, a amostra foi processada pelo mesmo procedimento de preparação, extracção e análise. A linearidade do método analítico foi expressa pelos coeficientes de correlação determinados.

Tabela 8 – Áreas relativas dos cinco níveis de fortificação de amostras de urina com α -amanitina, para estudo da linearidade.

Concentração (ng/mL)	Área Relativa
0	0.64
5	9.24
10	49.72
15	77.97
20	114.52

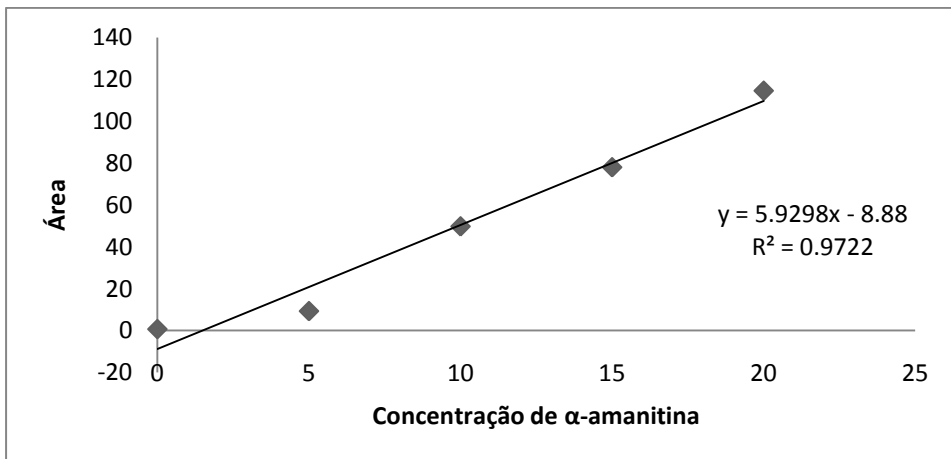


Figura 20 – Representação gráfica da curva de calibração da α -amanitina em amostras de urina, com cinco calibradores distribuídos entre 0 e 20 ng/mL.

Tabela 9 - Áreas relativas dos cinco níveis de fortificação de amostras de urina com β -amanitina, para estudo da linearidade.

Concentração (ng/mL)	Área Relativa
0	1.5
5	32.48
10	76.65
15	147.79
20	179.12

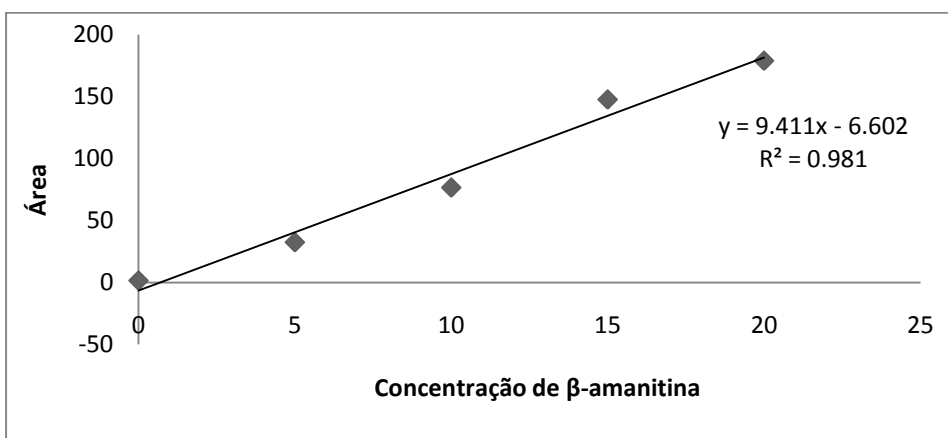


Figura 21 – Representação gráfica da curva de calibração da β -amanitina em amostras de urina, com cinco calibradores distribuídos entre 0 e 20 ng/mL.

Uma vez que não foram desenvolvidos estudos relativamente ao padrão interno, a curva de calibração foi construída directamente pela obtenção das áreas dos picos dos compostos aos diferentes níveis de fortificação. As curvas resultantes para ambos os compostos são, assim, resultantes das medidas de proporcionalidade entre as áreas dos picos de α - e β -amanitinas *versus* a concentração destes compostos.

O coeficiente de correlação serviu de indicador de linearidade, observando-se para a α -amanitina um coeficiente de correlação de 0.97 e para a β -amanitina de 0.98. Pode-se concluir que as curvas padrão das matrizes obtidas, tendo em conta a inexistência de padrão interno nesta metodologia, apresentaram boas linearidades.

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

C. LIMIARES ANALÍTICOS DO MÉTODO DE ENSAIO

A determinação dos limites de detecção e de quantificação do método para as substâncias em estudo, baseou-se no estudo do sinal obtido nas 10 amostras brancas. A intensidade do sinal do ruído de fundo foi determinada ao RT de 5.20 min. para a α -amanitina e ao RT de 4.83 min. para a β -amanitina. Determinou-se uma média das intensidades observadas e o desvio-padrão correspondente, valores aplicados nas equações (1) e (2) para o cálculo do LD e do LQ, respectivamente.

Na tabela 10 estão apresentadas as áreas relativas do ruído de fundo para os 20 brancos.

Tabela 10 – Média e desvio padrão das áreas relativas das 10 amostras brancas.

Composto	Média das Áreas Relativas	Desvio-padrão
α -amanitina	1.299	0.399
β -amanitina	3.234	1.988

Desta forma, o LD obtido em amostras de urina para a α -amanitina e β -amanitina foram, respectivamente, 1.93 ng/mL e 1.74 ng/mL. Estes resultados representam bons valores de LD, uma vez que se relacionam com concentrações muito reduzidas de composto, permitindo, conseqüentemente, a detecção de baixas concentrações de α - e β -amanitina nestas amostras biológicas.

Comparando os LDs com outros trabalhos publicados (Tabela 11), verificamos que se conseguiu obter um boa sensibilidade do método descrito. À exceção de um artigo publicado em que se verificou um LD de 0.5 ng/mL, todos os restantes valores descritos na literatura são superiores ou da mesma ordem de grandeza dos valores determinados neste estudo.

Tabela 11 – LDs em diferentes amostras biológicas para a determinação de α - e β -amanitinas em diferentes amostras biológicas.

Método	Amostra	LD (ng/mL)	Referência
HPLC-UV	Soro	6	Zhou <i>et al</i> , 2011
HPLC-UV	Soro	3	Zhou <i>et al</i> , 2011
LC-MS	Plasma	0.5	Tanahashi <i>et al</i> , 2010
CZE	Urina	1.5	Robinson-Fuentes <i>et al</i> , 2008
CZE	Urina e Sangue	4.5 e 12	Bidnychenko, 2001
LC-MS	Urina e Plasma	2.5	Maurer <i>et al</i> , 2000
LC-ECD	Urina	10	Defendenti <i>et al</i> , 1997
LC-MS	Urina	10	Maurer <i>et al</i> , 1997
CZE	Urina	1000	Bruggemann <i>et al</i> , 1996
HPLC-UV	Urina e Soro	10	Jehl <i>et al</i> , 1985

Para os valores de LQ, os resultados obtidos para a α -amanitina e β -amanitina foram, respectivamente, 2.39 ng/mL e 3.16 ng/mL. Apresentam-se, também, como valores bastantes bons para este parâmetro, uma vez que representam concentrações muito reduzidas, permitindo a consequente quantificação de baixas concentrações de α - e β -amanitinas em amostras de urina.

Comparando os LQs com outros trabalhos publicados (Tabela 12), verificamos que se conseguiram obter valores de quantificação relativamente baixos. Todos os valores descritos na literatura para determinação de α - e/ou β -amanitina são superiores aos valores obtidos pela metodologia descrita na presente dissertação.

Tabela 12 - LQs em diferentes amostras biológicas para a determinação de α - e β -amanitinas em diferentes amostras biológicas.

Método	Amostra	LQ (ng/mL)	Referência
CZE	Urina	5	Robinson-Fuentes <i>et al</i> , 2008
LC-MS	Urina e Plasma	5	Maurer <i>et al</i> , 2000
LC-ECD	Urina	10	Defendenti <i>et al</i> , 1997
HPLC-UV	Urina e Soro	10	Jehl <i>et al</i> , 1985

D. RECUPERAÇÃO

A recuperação pode ser utilizada como parâmetro de validação em substituição à exactidão, pelo que se optou por realizar esta determinação mais simples, com o objectivo de avaliar se o presente método pode ser considerado exacto.

Este parâmetro foi avaliado a partir de amostras fortificadas a 3 níveis de concentração para cada composto (10, 15 e 20 ng/mL), após o pré-tratamento e o processo extractivo. A eficiência da recuperação foi, assim, determinada, por comparação das áreas dos picos obtidos para amostras fortificadas com α - e β -amanitina sujeitas a pré-tratamento e extracção, com as áreas dos picos obtidos para os padrões directos, nos mesmos níveis de concentração.

Pela aplicação da equação (3), efectuou-se o cálculo da recuperação para cada um dos três principais níveis de fortificação. A média das 3 determinações resulta na recuperação do método.

Os resultados obtidos estão representados nas tabelas 13 e 14, observando-se que o rendimento obtido para a α -amanitina variou entre os 64 e os 70%, aproximadamente, e para a β -amanitina entre os 64 e os 68%.

Tabela 13 – Valores de recuperação obtidos a 3 níveis de fortificação para a α -amanitina em amostras de urina.

Concentração (ng/mL)	10	15	20
Área Relativa Curva Padrão	49.72	77.97	114.52
Área Relativa Curva Directa	73.31	111.66	179.81
Recuperação (%)	68.11	69.62	63.69
Recuperação do método (%)	67.1		

CAPITULO II – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA LABORATORIAL

Tabela 14 - Valores de recuperação obtidos a 3 níveis de fortificação para a β -amanitina em amostras de urina.

Concentração (ng/mL)	10	15	20
Área Relativa Curva Padrão	76.65	147.79	179.12
Área Relativa Curva Directa	119.13	224.34	264.71
Recuperação (%)	64.34	65.88	67.67
Recuperação do método (%)	65.96		

É possível afirmar pela observação dos valores dos rendimentos obtidos nas amostras de urina, que o procedimento extractivo definido é bastante eficaz, uma vez que tais valores foram obtidos a partir da análise de concentrações muito baixas de α - e β -amanitinas.

E. PRECISÃO

Para a precisão, foram analisadas amostras biológicas fortificadas com α - e β -amanitina a uma concentração de 10 ng/mL, sendo estas avaliadas num mesmo dia (precisão intra-dia ou repetibilidade) em triplicado (n=3). Este parâmetro representou a variabilidade das medidas efectuadas sobre diferentes alíquotas da amostra, e foi expresso em termos de CV, em percentagem, por aplicação da equação (4). Foi, assim, calculada a média das três réplicas à concentração referida para cada substância e o correspondente desvio-padrão da média obtida (tabela 15).

Tabela 15 – Valores médios obtidos em urina para a precisão em termos de CV, ao nível de concentração 10 ng/mL, para a α - e β -amanitina (n=3).

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Média das concentrações (ng/mL)	Desvio-padrão	Precisão (CV %)
α -amanitina	10	6.83	0.252	3.68
β -amanitina		6.57	0.153	2.33

Assim, para a α -amanitina obteve-se um valor de CV na ordem dos 3.68% e para a β -amanitina na ordem dos 2.33%. O método revela-se, assim, preciso (intra-dia), uma vez que os respectivos valores obtidos se encontram dentro dos limites normalmente considerados como aceitáveis, os quais são de $\pm 15\%$ para a concentração analisada.

5. Aplicação do método analítico desenvolvido em amostras de casos reais

5.1. Introdução

Na secção anterior, foi desenvolvido um método analítico por LC-MS/MS para a determinação de α - e β -amanitina em amostras de urina, com bons parâmetros de linearidade, sensibilidade, repetibilidade e recuperação. É de salientar nesta metodologia o facto de se utilizar somente 1 mL de amostra e de esta se revelar sensível para limites de detecção na ordem dos 1.9 ng/mL para a α -amanitina e na ordem dos 1.7 ng/mL para a β -amanita. Uma vez realizados estes estudos, torna-se importante proceder à posterior aplicação a amostras que reflectam a realidade, isto é, a amostras de casos reais onde é desconhecida a sua presença e, em caso afirmativo, a sua concentração.

Desta forma, para avaliar a possível aplicação corrente do método, foi desenvolvido um estudo com um caso real forense, designadamente de um caso autopsiado no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INML, I.P. A metodologia descrita foi, assim, aplicada a uma amostra real de urina, pertencente a um indivíduo vítima de intoxicação por cogumelos *Amanita phalloides*, cedida para este estudo pelo Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML, I.P..

Dado o facto desta metodologia analítica não ter sido profundamente desenvolvida devido à indisponibilidade de tempo e de recursos, realizou-se a análise de somente 1 mL de urina, de um total de 9 mL de amostra recolhida na autópsia médico-legal, sendo que podemos afirmar que o estudo efectuado não

poderá ter carácter conclusivo e vinculativo, mas unicamente cientificamente especulativo.

Antes de serem apresentados os resultados obtidos neste estudo, para realizar uma interpretação destes, é necessário ter conhecimento relativamente ao histórico clínico do indivíduo do caso em estudo, o qual é descrito em seguida.

5.1.1. Informação clínica do caso em estudo

Segundo informação hospitalar, o indivíduo terá ingerido cogumelos silvestres, tendo iniciado diarreia cerca de 9 horas depois (durante a noite). Dá entrada 2 dias depois pelas 12h30 num Serviço de Urgência Hospitalar, após transferência de outra Unidade Hospitalar onde deu entrada no mesmo dia por suspeita de **intoxicação aguda de *Amanita phalloides***. Vem a falecer quatro dias depois pelas 9h22.

Durante o internamento na Unidade de Cuidados Intensivos (quatro dias) apresenta progressivamente uma detioração do seu estado geral, tendo entrado em coma ao 4º dia, com hipotensão e insuficiência renal aguda; por volta das 20h00 desse mesmo dia, é-lhe realizado um transplante hepático, tendo regressado estável. Posteriormente, verificou-se paragem cardíaca em assistolia pelas 9h00 do dia seguinte, sem resposta às manobras de reanimação.

Vários elementos da mesma família terão sofrido igualmente intoxicação por este tipo de cogumelos, tendo um desses elementos falecido antes de poder receber medidas terapêuticas.

5.2. Resultados e discussão

Tal como seria de esperar, por comparação do historial clínico descrito e os dados presentes na literatura, não foram detectadas, na amostra real analisada, nenhuma das substâncias estudadas, especificamente, a α -amanitina e β -amanitina.

As figuras 22 e 23 representam os cromatogramas da amostra analisada, de uma amostra branco e de uma amostra fortificada a 100 ng/mL, para as substâncias α - e β -amanitina, respectivamente.

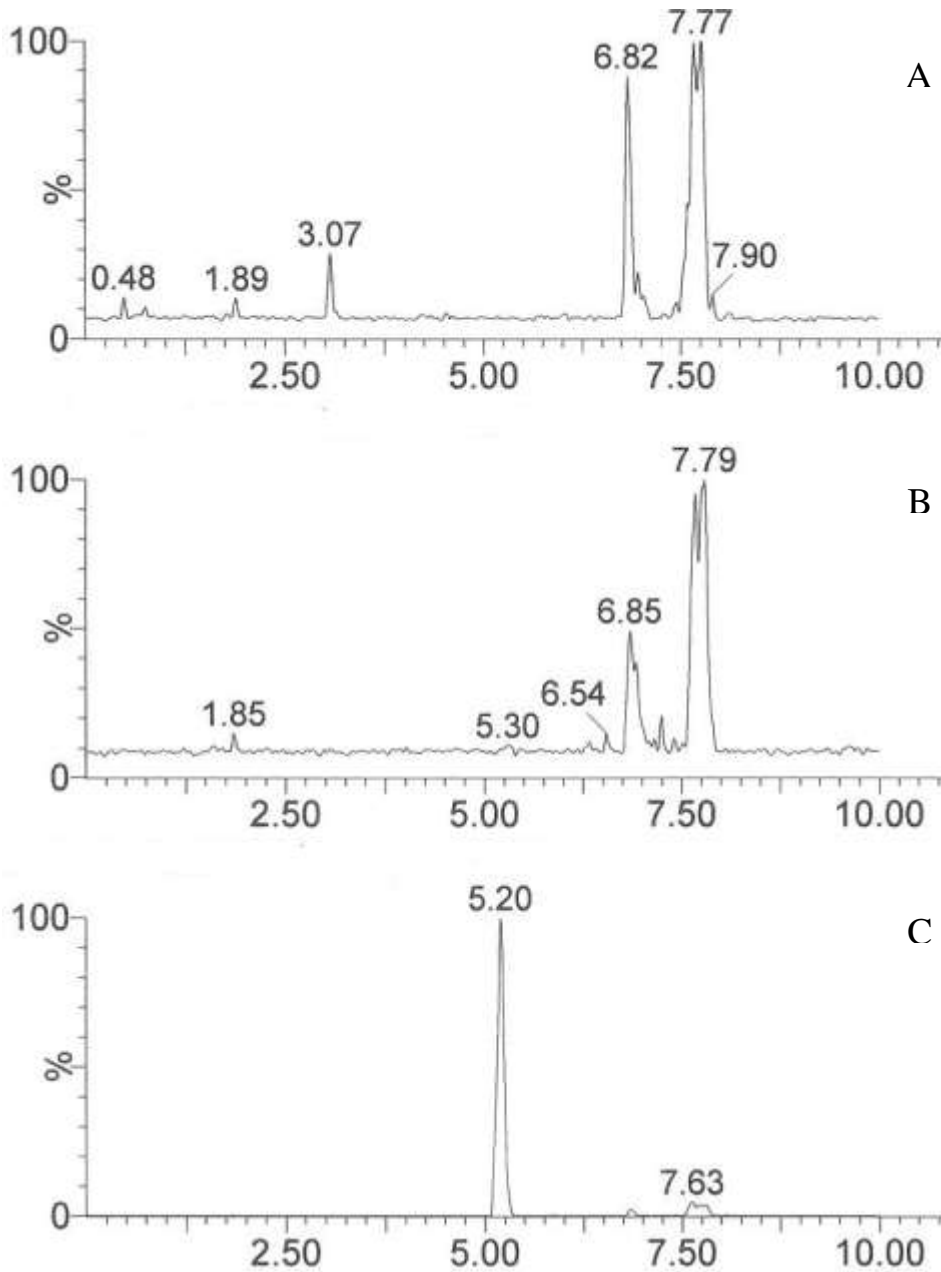


Figura 22 – Cromatogramas de (A) amostra real, (B) amostra branca e (C) amostra fortificada com α -amanitina a 100 ng/mL.

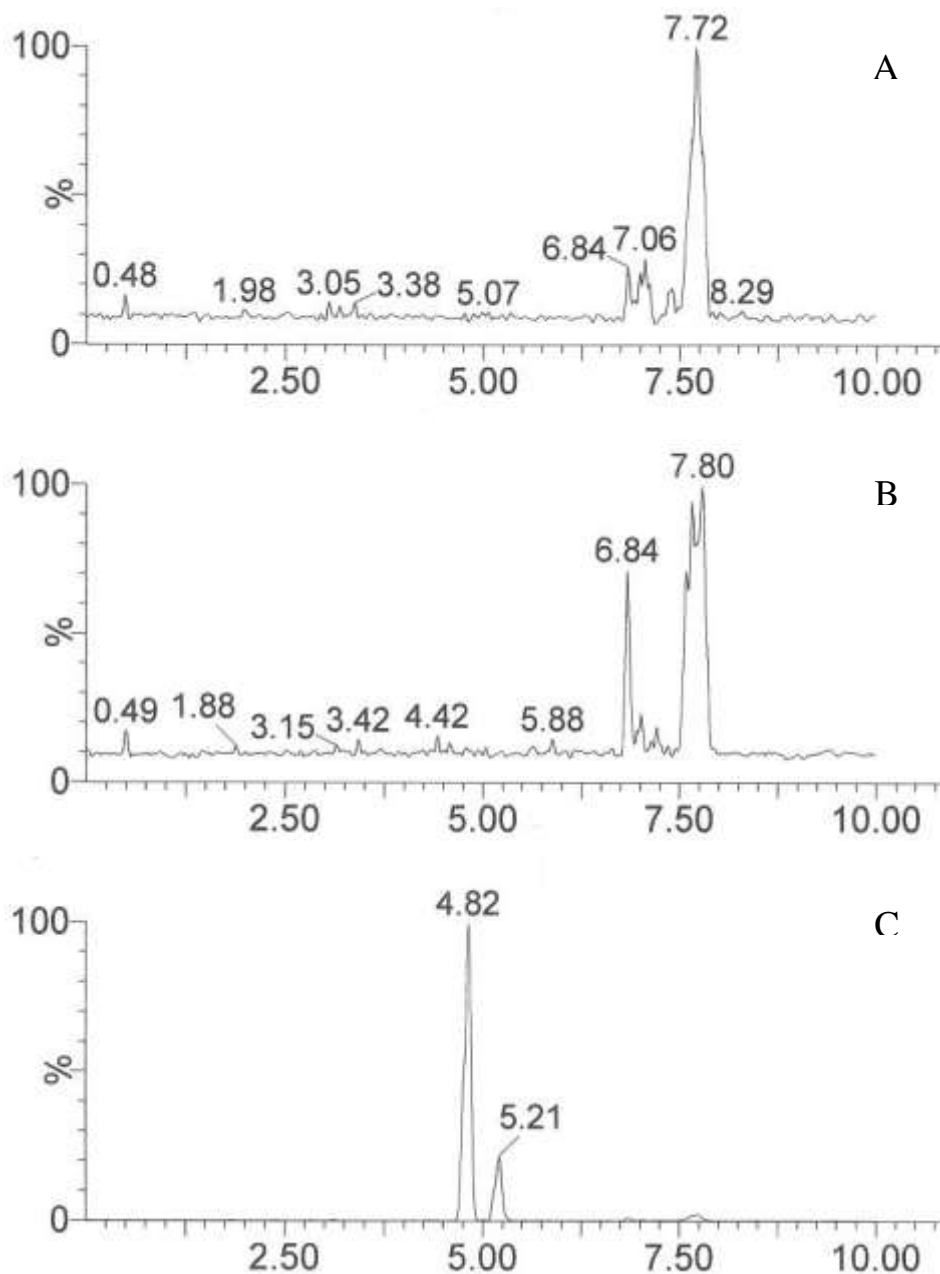


Figura 23 - Cromatogramas de (A) amostra real, (B) amostra branca e (C) amostra fortificada com β -amanitina a 100 ng/mL.

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

Pelo histórico apresentado, o indivíduo terá permanecido durante quatro dias no hospital, tendo consumido cogumelos silvestres dois dias antes de ter dado entrada no hospital. Terá, então, falecido ao 7º dia pós-ingestão, posteriormente a ter sofrido transplante hepático.

Segundo a literatura, a detecção em urina destas toxinas é conseguida até 72 horas após a ingestão (em casos sem tratamento hospitalar), sendo 80% destas excretadas via renal nas primeiras 6 horas (Jaeger, 1993). Em casos de pacientes tratados com diurese forçadas, verificou-se que a urina estava completamente isenta de toxinas num período entre 24 a 36 horas (Piqueras, 1989).

Com a apresentação destes dados e os resultados obtidos, é possível concluir que, dado a inexistência de picos obtidos ao RT dos compostos em estudo, a amostra de urina ou se encontra isenta de amatoxinas ou, por outro lado, a quantidade existente nesta amostra é de ordem de grandeza inferior ao que é possível detectar. O resultado negativo obtido, contudo, não exclui a hipótese de intoxicação, uma vez que a análise se torna pouco fiável 36 horas pós-ingestão (Karlson-Stiber *et al*, 2003). É de referenciar que o factor mais crítico para invalidar a utilidade de uma análise a amostras de urina é o tempo que decorre entre a ingestão de cogumelos e a colheita de urina.

CAPITULO III

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos capítulos anteriores procurou-se desenvolver uma metodologia analítica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), com prévia preparação das amostras por precipitação de proteínas e posterior extracção em fase sólida, para determinação de α - e β -amanitinas em matrizes de urina.

O desenvolvimento de uma técnica analítica adequada para a análise destes compostos revelou-se crucial em virtude de, actualmente, não existir um método de análise com esse fim nos serviços competentes, nomeadamente nos Serviços de Toxicologia Forense do INML, I.P. Visou-se, por um lado, demonstrar a importância da investigação de amatoxinas em matrizes biológicas, nomeadamente em urina, dado o crescente número de intoxicações e casos fatais registados nos últimos anos, em Portugal; por outro lado, pretendeu-se desenvolver uma metodologia sensível, específica, pouco morosa e de baixos custos a nível de reagentes.

Com efeito, as análises toxicológicas em amostras de urina podem ser extraordinariamente importantes para a investigação deste tipo de toxinas, principalmente a nível hospitalar, uma vez que são matrizes de fácil recolha com recurso a técnicas não evasivas, que podem ser obtidas em volumes consideráveis, permitindo um prognóstico precoce, que não seja somente baseado no historial clínico do indivíduo. Em termos forenses, e como foi verificado no caso analisado, a urina apenas se torna uma boa matriz para a determinação de α - e β -amanitinas em casos nos quais o período de tempo entre a ingestão e a colheita de urina é curto. Uma posterior abordagem com a metodologia analítica desenvolvida, poderá ser a sua aplicação em matrizes de fígado e rins, uma vez que, segundo a literatura, se encontram elevadas concentrações de amatoxinas nestes tecidos em períodos pós-ingestão entre 9 até 22 dias, sendo a maior concentração verificada a nível hepático (Jaeger, 1993). O método descrito poderá ser aplicável à medição de α - e β -amanitinas nessas matrizes biológicas.

*

No respeitante ao método desenvolvido, o recurso a uma metodologia com sistema de separação cromatográfica acoplado a um detector de espectrometria de massa sequencial por triplo quadrupolo, e ionização à pressão atmosférica do tipo

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

electrospray assistida por nebulização no modo positivo (ESI^+) permitiu a resolução, com suficiente garantia, dos problemas de identificação e detecção das substâncias, no caso presente da α - e β -amanitina, habitualmente presentes aos toxicologistas. Com efeito, a operação do detector de massas em modo MRM para aquisição de dados proporcionou uma excelente sensibilidade com uma elevada especificidade, possibilitando a correspondente análise dos compostos de interesse. Iguamente as condições cromatográficas em fase líquida utilizadas evidenciaram uma boa separação da α - e β -amanitinas, com picos cromatográficos simétricos, que garantem uma boa avaliação dos analitos. É de salientar que a técnica de UPLC utilizada na elaboração desta dissertação, relativamente ao HPLC, exhibe um aumento de eficiência, força e gama de pH, o que permite o desenvolvimento de metodologias com parâmetros de velocidade, sensibilidade e resolução superiores.

O método cromatográfico descrito apresentou um tempo de corrida de 10 minutos, com a correspondente detecção de α -amanita a um RT de aprox. 5.20 minutos, e da β -amanitina a um RT da ordem dos 4.82 minutos, representando, assim, uma metodologia rápida.

Efectivamente, o método provou ser específico e selectivo, sem interferentes da matriz nem a presença de picos que pudessem co-eluir com o composto em estudo, com conseqüente ausência de efeito de supressão iónica, factor importante a ter em conta quando se trabalha com LC-MS, por influência nos resultados obtidos em diferentes análises realizadas pelo mesmo método cromatográfico.

Inclusivamente, apresentou a enorme vantagem de se quantificarem concentrações muito reduzidas, quer de α -amanitina (2.39 ng/mL) quer de β -amanitina (3.16 ng/mL), cumprindo uma linearidade para a gama de trabalho proposta (0 a 20 ng/mL), com coeficientes de correlação de 0.97 e de 0.98 para a α - e para a β -amanitina, respectivamente. De facto, este método apresentou muito bons limites de detecção e de quantificação para a α -amanitina (1.93 e 3.29 ng/mL, respectivamente) e para a β -amanitina (1.74 e 3.16 ng/mL, respectivamente), demonstrando-se, assim, a sua capacidade para determinar reduzidas concentrações destas toxinas, frequentemente encontradas nesta amostra biológica.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pela validação efectuada, foi ainda possível verificar que o presente método possibilita a obtenção de resultados repetíveis para ambas as toxinas. De acordo com os critérios de validação adoptados, a precisão calculada para cada nível de concentração não deverá exceder os 15% do coeficiente de variação (CV), excepto para o LQ, que não deve exceder 20% do CV. Desta forma, os resultados obtidos para a concentração de 10 ng/mL (n=3) demonstraram claramente que o método é preciso (intra-dia) tanto para a α -amanitina como para β -amanitina, com excelentes coeficientes de variação (inferiores a 4%), respectivamente, 3.68 e 2.33%.

A metodologia de extracção desenvolvida apresentou, também esta, bons resultados de recuperação das substâncias em estudo aos três níveis de concentração estudados (10, 15 e 20 ng/mL) para a α -amanitina (entre 64 a 70%) e para a β -amanitina (entre 64 e 68%).

A metodologia analítica desenvolvida introduziu, ainda, a utilização de colunas *Oasis® HLB*, que evidenciaram, quando comparadas com as colunas de C18, melhores condições de utilização e obtenção de extractos mais limpos com ganhos na recuperação. Um passo adicional a este método que se mostrou igualmente crucial para a análise cromatográfica de um extracto mais puro e limpo foi a precipitação de proteínas por adição de solvente orgânico, neste caso, o acetoneitrilo, anteriormente ao procedimento de SPE. O pré-tratamento e o procedimento extractivo a que as amostras foram sujeitas revelaram ser um processo pouco moroso, de fácil execução, com recurso a reagentes de baixo custo e muito vantajoso no que diz respeito à purificação e remoção de possíveis interferentes para posterior análise por técnica adequada.

No método proposto, utilizou-se um volume reduzido de amostra (1 mL), aspecto relevante no que diz respeito aos actuais desenvolvimentos metodológicos em termos de Toxicologia Forense, uma vez que em muitos casos o volume de amostra enviado para análise, assim como o volume recolhido nas autópsias, é demasiadamente escasso, não permitindo determinar os resultados dos casos em duplicado, para determinação dos eventuais desvios, ou, por outro lado, inviabilizando totalmente a determinação dos compostos de interesse.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A metodologia analítica presente foi, por fim, aplicada a uma amostra de urina de um caso real de suspeita de intoxicação por *Amanita phalloides*. O estudo efectuado, como já referido, é meramente especulativo, não podendo ter carácter conclusivo uma vez que foi aplicado apenas a uma amostra real, com resultados obtidos num único ensaio, número insuficiente para qualquer tipo de análise estatisticamente significativa.

*

Conclui-se que, tendo em conta os bons resultados obtidos, a metodologia analítica descrita apresenta-se como uma técnica promissora na análise de amatoxinas em amostras de urina. Devido a não existir disponibilidade em termos de tempo e de equipamento, como já referido, a metodologia desenvolvida baseou-se em estudos preliminares, não tendo sido possível a realização de um maior número de ensaios que possibilitassem uma validação completa do presente método e uma análise mais fidedigna dos parâmetros avaliados. No entanto, tendo em conta o trabalho já desenvolvido, será importante a continuação de estudos posteriores a nível da precisão (reprodutibilidade), exactidão, robustez, estabilidade e aplicabilidade do método. Será, igualmente, importante a realização de estudos relativos a um padrão interno adequado para optimização dos resultados analíticos, dada a relevância anteriormente expressa da utilização deste tipo de composto, uma vez que pela sua adição evitar-se-ia falsas negatividades, verificar-se-ia a existência de qualquer tipo de possibilidade de perda de composto e, principalmente, permitiria a total monitorização de todo o processo analítico. Fica, também, em aberto a possibilidade de se realizarem estudos a nível da aplicação do procedimento analítico a outras matrizes biológicas, nomeadamente, fígado e rins, assim como e, principalmente, a validação do método analítico propriamente dito.

Esta validação e posterior implementação do presente método em casos reais é de extrema importância, uma vez que, como já referido, nos últimos anos tem-se verificado um aumento preocupante de intoxicações e fatalidades causadas por ingestão de cogumelos venenosos, não havendo, em Portugal, uma metodologia analítica para realizar estudos a este nível. Com este trabalho preliminar, o qual

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

revelou elevado potencial em toxicologia forense, e posterior desenvolvimento dos estudos efectuados, os serviços competentes para este efeito passariam a dispor de um método analítico eficiente para responder às solicitações respeitantes tanto às intoxicações clínicas como às forenses.

Uma técnica analítica rápida, como a presente metodologia, revela-se, assim, vantajosa na realização de perícias ligadas a intoxicações clínicas, cujos resultados podem permitir uma previsão do prognóstico do intoxicado, informação esta importante para o médico, uma vez que a prioridade e exigência em casos hospitalares são factores determinantes a ter em consideração. Os resultados das análises quando o intoxicado chega à instituição de saúde e durante o período de internamento, em que é realizada a colheita de urina a diferentes tempos, podem fornecer indicações importantes relativamente à abordagem médica, face à urgência de opções de tratamento. Um diagnóstico confirmativo rápido, poderia permitir, após uma casuística adequada, a realização de transplantes hepáticos em casos de intoxicação em fases avançadas da doença, o que permitiria aumentar a probabilidade de sobrevivência do paciente.

Em termos forenses, as análises de amostras *postmortem* relativas a intoxicações fatais tornam-se cruciais num laboratório de toxicologia para o esclarecimento ou interpretação de uma eventual causa de morte.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abuknesha, R., Maragkou, A., 2004. *A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for the detection of α -amanitin in biological fluids*. Analytical - Bioanalytical Chemistry 379, 853-860

Ali Ahmed, W. H., Masako Suzuki, K. G., Watanabe, K., Suzuki, O., 2010. *Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*. Forensic Toxicology 28, 69–76

Antignac, J.P., Wasch, K., 2005. *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography mass spectrometry and its consequences in the field of residues analysis*. Analytical Chimica Acta 529, 129-136

Belliardo, F. Massano, G., 1983. *Determination of α -amanitin in serum by HPLC*. Journal of Liquid Chromatography 6, 551-558

Benoit-Guyod, J. L., Benkheder, K., Seigle-Murandi, F., Duc, C. L., 1980. *Differential identification of toxic mushrooms by pyrolysis-GLC coupling*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28, 1317-1319

Bidnychenko, Y., Fedushchak, N., 2008. *A study on Amanita phalloides peptide toxins elimination with urine*. Annales Universitatis Mariae Curie – Skłodowska, Lublin – Polonia, Vol. XXI, 41 (2), 219-221

Broussard, C. N., Aggarwal, A., Lacey, S. R., Post, A. B., Gramlich, M. D., Henderson, J. M., Younossi, M., 2001. *Mushroom Poisoning – From Diarrhea to Liver Transplantation*. The American Journal of Gastroenterology, 96 (11), 3195-3198

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bruggemann, O., Meder, M., Freitag, R., 1996. *Analysis of α -amanitin and β -amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection*. Journal of Chromatography A 744, 167-176

Burgess, R. R., Deutscher, M. P., 2009. *Guide to Protein Purification*. 2ª Edição, Vol. 463, pp. 851

Butera, R., Locatelli, C., Coccini, T., Manzo, L., 2004. *Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study*. Journal of Toxicology - Clinical Toxicology 42, 901- 912

Calabuig, G., 1998. *Medicina Legal y Toxicologia*. 5ª Edição, Vol. XXII, pp. 1394, Masson, Barcelona

Chamberlain, J., 1995. *The analysis of drug in biological fluids*. 2ª Edição, Vol. II, pp. 351, CRC Press, Boca Raton, Florida

Chung, W. C., Tso, S. C., Sze, S. T., 2007. *Separation of polar mushroom toxins by mix-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*. Journal of Chromatography Science 45, 104–111

Chust, R. B., 1990. *Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)*. Boletim SPQ 39, 43-53

Coccini, T., Randine, G., Locatelli, C., Butera, R., Manzo, L.. *Validation of the Elisa Test for Urinary α -amanitin Analysis in Human Amanita phalloides Poisoning*. Natural Toxins, Poster Session P10, 237.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Defendenti, C., Bonacina, E., Mauroni, M., Gelosa, L., 1998. *Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine*. Forensic Science International 92, 59–68

Delacre, 2000. *Guia da Delacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Delacre, Lisboa

Emer, J., Miller, J. H., 2005. *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Enjalbert, F., Gallion, C., Jehl, F., Monteil, H., 1993. *Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of amanita phalloides tissues*. Toxicon 31 (6), 803-507

Enjalbert, F., Gallion, C., Jehl, F., Monteil, H., Faulstich, H., 1992. *Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in Amanita phalloides Fr. by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography, 598, 227-236

FDA-Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. *Guidance for industry, bioanalytical method validation*. [documento online] 2001 [consultado em 6 de Abril de 2011]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252f1.pdf>

Faulstich, H., 1980. *Mushroom poisoning*. Lancet 2, 794–795

Faulstich, H., Talas, A., Wellhöner, H. H., 1985. *Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog*. Archive of Toxicology 56, 190-194

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Faulstich, H., Zobeley, S., Trischmann, H., 1982. *A rapid radioimmunoassay, using a nylon support, for amatoxins from Amanita mushrooms*. *Toxicon* 20, 913-924

Filigenzi, M. S., Poppenga, R. H., Tiwary, A. K., Puschner, B., 2007. *Determination of α -Amanitin in Serum and Liver by Multistage Linear Ion Trap Mass Spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2784-2790

Flanagan, R. J., 2007. *Fundamentals of Analytical Toxicology*. pp. 505, John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra

Gallion, C., Jehl, F., Monteil, H., Faulstich, H., 1993. *Amatoxins and Phallotoxins in Amanita species : High-Performance Liquid Chromatographic Determination*. *Mycologia*, 84 (4), 579-584

Guyton, A. C., Hall, J. E., 1996. *Textbook of Medical Physiology*. 9ª Edição, Vol. XLIII, pp. 1148, W. B. Saunders, Filadélfia

Himmelman, A., Mang, G., Schnort-Huber, S., 2001. *Lethal ingestion of stored Amanita phalloides mushrooms*. *Swiss Medical Weekly*, 131, 616-617

Homann, J., Rawer, P., Bleyl, H., Matthes, K.-J., Heinrich, D., 1986. *Early detection of amatoxins in human mushroom poisoning*. *Archives of Toxicology* 59, 190-191

ICH Q2 (R1) – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). [documento disponível online] 2005 [consultado em 6 de Abril de 2011] Disponível em: <http://www.reimeranalytical.com/meth%20val%20ich.pdf>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Iliev, Y., Andonova, S., Akabaliev, V., 1999. *Our experience in the treatment of acute Amanita phalloides poisoning*. Folia Medica Vol. XLI (4), 30–37

Jaeger, A., Jehl, F., Flesch, F., Sauder, P., Kopferschmitt, J., 1993. *Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications*. Journal of Toxicology-Clinical Toxicology 31, 63–80

Jehl, F., Gallion, C., Birckel, P., Jaeger, A., Flesch, F., Minck, R., 1985. *Determination of α -Amanitin and β -Amanitin in Human Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography*. Analytical Biochemistry 149, 35-42

Jessome, L.L., Volmer, D.A., 2005. *Ion suppression: a major concern in Mass Spectrometry*. LCGC North America 25, issue 5

Jickells, S., Negrusz, A., 2008. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. 3ª Edição, Vol. I, pp. 673, Pharmaceutical Press, Londres

Karch, S. B., 1998. *Drug Abuse Handbook*. 1ª Edição, Vol. I, pp. 1122, CRC Press, Boca Raton, Florida

Karlson-Stiber, C., Persson, H., 2003. *Cytotoxic fungi – an overview*. Toxicon 42, 339-349

Lanças, F. *Cromatografia: as boas novas do colacro X*. Revista química e derivados. Editora QD [documento online] 2004 [consultado em 25 de Março de 2011] Disponível em <http://www.quimica.com.br/revista/qd341/cromatografia1.htm>

Leist, M., Gantner, F., Naumann, H., Bluethmann, H., Vogt, K., Brigelius-Flohé, R., Nicotera, P., Volk, H-D., Wendel, A., 1997. *Tumor necrosis factor – induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins*. Gastroenterology 112, 923-934

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Li, C., Oberlies, N., 2005. *The most widely recognized mushroom: Chemistry of the genus Amanita*. Life Sciences 78, 532-538

Maurer, H. H., Schmitt, C. J., Weber, A. A., Kraemer, T., 2000. *Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins α - and β -amanitin in urine after immunoaffinity extraction*. Journal of Chromatography B 748, 125-135

Maurer, H. H., Kraemer, T., Ledvinka, O., Schmitt, C. J., Weber, A. A., 1997. *Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis - Studies on the detection of clobenzorex and its metabolites within a systematic toxicological analysis procedure by GC-MS and by immunoassay and studies on the detection of α - and β -amanitin in urine by atmospheric pressure ionization electrospray LC-MS*. Journal of Chromatography B 689, 81-89

McDowall, R. D., 1989. *Sample Preparation of Biomedical Analysis*. Journal of Chromatography 49, 3-58

Meyer, Veronika, 2004. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4ª Edição, pp 357, John Wiley & Sons, USA

Moreau, R. L., Siqueria, M. E., 2008. *Toxicologia Analítica*. Vol. XXV, pp. 318, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Muraoka, S., Fukamachi, N., Mizumoto, K., Shinozawa, T., 1999. *Detection and Identification of Amanitins in the Wood-Rotting Fungi *Galerina fasciculata* and *Galerina helvoliceps**. Applied and Environmental Microbiology, 65 (9), 4207-4210

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Piqueras, J., 1989. *Hepatotoxic mushroom poisoning: diagnosis and management*. Mycopathologia 105, 99-110

Polettini, A., 2006. *Applications of LC-MS in Toxicology*. 1ª Edição, pp. 274, Pharmaceutical Press, Londres

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C., Melo, L. F., 2004. *Validação de métodos cromatográficos e electroforéticos*. Química Nova 27 (5), 771-780

Rieck, W., Platt, D., 1988. *High-performance liquid chromatographic method for the determination of alpha-amanitin and phalloidin in human plasma using column-switching technique and its application in suspected cases of poisoning by the green species of Amanita mushroom (Amanita phalloides)*. Journal of Chromatography 425, 121-134

Robinson-Fuentes, V. A., Jaime-Sanchez, J.L, García-Aguilar, L., Gómez-Peralta, M., Vázquez-Garciduenas, M. S., Vázquez-Marrufo, G., 2008. *Determination of α - and β -amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 47, 913–917

Rosenberg, I. M., 2005. *Protein Analysis and Purification*. 2ª Edição, pp. 511, Benchtot Techniques, Birkhauser, Boston

Schwarzinger, C., 2005. *Identification of fungi with analytical pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 74, 26–32

Silverstein, R. M., Webster, F.X., Kiemle, D. J., 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7ª Edição, pp. 500, Jonh Wiley and & Sons, USA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tagliaro, F., Chiminazzo, S., Maschio, S., Alberton, F., Marigo, M., 1987. ***Improved high performance liquid chromatographic*** determination of amanitins with electrochemical detection. *Chromatographia* 24, 482–486

Tagliaro, F., Schiavon, G., Bontempelli, G., Carli, G., Marigo, M., 1991. ***Improved high-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of alpha-amanitin in human plasma based on its voltammetric study.*** *Journal of Chromatography* 563, 299–311

Tanahashi, M., Kaneko, R., Hirata, Y., Hamajima, M., Arinobu, T., Ogawa, T., Ishii, A., 2010. ***Simple analysis of α -amanitin and β -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry.*** *Forensic Toxicology* 28, 110-114

Vesconi, S., Langer, M., Iapichino, G., Costantino, D., Busi, C., Fiume, L., 1985. ***Therapy of cytotoxic mushroom intoxication.*** *Crit. Care. Med.* 13, 402–406.

Vetter, J., 1997. ***Toxins of Amanita phalloides.*** *Toxicon* 36 (1), 13-24

Vogel, H. G., Maas, J., Gebauer, A., 2010. ***Drug Discovery and Evaluation : Methods in Clinical Pharmacology.*** 1ª Edição, pp. 564, Springer, Londres

Waters. ***Oasis Sample Extraction Products*** [documento online] 2011 [consultado em 25 de Março de 2011] Disponível em <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209>

Wieland, T., 1983. ***The toxic peptides from Amanita mushrooms.*** *International Journal of Peptide and Protein Research.* 22, 257–276.

Wieland, T., Faulstich, 1991. ***Fifty years of amanitin.*** *Experientia* 47, 1186-1193

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Wieland, T., Faulstich, H., 1978. *Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active compounds of poisonous Amanita mushrooms*. Critical Reviews in Biochemistry 5, 185–260

Zweipfenning, P., Wilderink, A., Horsthuis, P., Franke, J., Zeeuw, R., 1994. *Toxicological analysis of whole blood samples by means of Bond-Elut Certify Columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*. Journal of Chromatography A 674, 87-95



UNIVERSIDADE DE COIMBRA