

I-163 – IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE SAXITOXINAS VIA DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA

Rhayam Oliveira Nascimento⁽¹⁾

Estudante de graduação em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Ceará.

Ismael Kesley Carloto Lopes⁽³⁾

Estudante de Pós Graduação em Engenharia Civil, DEHA/CT/ pela Universidade Federal do Ceará.

Ana Zélia Abreu Pires de Souza⁽⁴⁾

Estudante de graduação em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Ceará.

José Capelo Neto⁽⁵⁾

Eng. Químico, D. Sc., pesquisador professor do Dep. de Eng. Hidráulica e Ambiental, CT/UFC.

Endereço⁽¹⁾: Rua Onofre Sampaio Cavalcante, 254, casa 10 – Parque Manibura - Fortaleza - CE - CEP: 60821-820 - Brasil - Tel: (85) 3239-2276 - e-mail: rhayamnascimento@yahoo.com.br

RESUMO

Devido à necessidade de atender as novas exigências determinadas pela portaria 2.914 do ministério da saúde, tornou-se imperativo desenvolver metodologias de análises de cianotoxinas em água de abastecimento. Desta forma, o presente estudo propõe a implementação de um método analítico capaz de qualificar e quantificar saxitoxinas e duas de suas variáveis - dc-saxitoxina e neosaxitoxina - em lotes produzidos a partir do cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (FLD). Para garantir a detecção das toxinas, fez-se necessário realizar pré-oxidação via peróxido e via periodato. As curvas de calibração indicaram excelente linearidade ($R^2 > 0,99$) para todos os compostos e tempos de retenção (TD) se mantiveram estáveis. Nos lotes, foi possível quantificar apenas saxitoxina e dc-saxitoxina, uma vez que a neosaxitoxina ficou abaixo dos limites de detecção. Sendo assim, o método proposto se mostrou capaz de quantificar saxitoxinas de forma efetiva, apresentando fácil aplicabilidade e baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: Cianobactérias, Qualidade da água, Toxinas, Cromatografia, HPLC.

INTRODUÇÃO

O crescimento da poluição, aliado às precárias condições de saneamento, acarretaram o aumento de lançamento de efluentes em mananciais de abastecimento público, acelerando o processo de eutrofização. Determinadas espécies de cianobactérias, por possuírem alta capacidade adaptativa e, por vezes, de liberação de toxinas, passaram a dominar estes reservatórios, criando a necessidade de um maior controle da qualidade da água. Para tal, a Portaria Nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, traz como obrigatoriedade o monitoramento de saxitoxinas na água.

OBJETIVO

Implementar uma metodologia analítica para identificar saxitoxinas em amostra produzida a partir do extrato concentrado da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* T3, produtora de dc-saxitoxina, saxitoxina e neosaxitoxina (A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 foi cedida pela professora Sandra Azevedo da UFRJ).

EXTRAÇÃO DA TOXINA

Para realização do estudo, fez-se necessário a extração de saxitoxinas a partir das células de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (CR). Para tal, a espécie foi cultivada em erlenmeyer com meio de cultivo ASM-1, em incubadora a 24°C, por 15 dias. Posteriormente, foi realizada a concentração das células de CR utilizando centrifuga a 4000 rpm. O extrato produzido foi submetido ao processo de congelamento/descongelamento, por três vezes, para lisar as células e possibilitar a solubilização das saxitoxinas

no meio. Adicionou-se ácido acético 0,1M até pH em torno de 4,0 de forma a garantir a maior estabilidade das toxinas. Os diversos extratos foram separados em quatro lotes, de acordo com o período do ano em que foram produzidos, e congelados a -20° C.

LIMPEZA DOS EXTRATOS

Os extratos, obtidos na etapa anterior, foram submetidos à pré-purificação com cartucho C18. O processo de limpeza de amostras foi baseado na metodologia de Lawrence & Niedzwiadek (2001) e iniciava com o condicionamento dos cartuchos com metanol e água, seguido da passagem dos extratos pelo cartucho C18, até saturação do material. Após isso, os cartuchos foram igualmente recuperados com metanol e água para repetição do processo até sua saturação absoluta.

ANÁLISE DE SAXITOXINAS

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) da marca Agilent 1260 composto por bomba quaternária, coluna cromatográfica constituída por C18, controlador automático do gradiente das fases móveis, dispositivo de injeção manual com um loop de 20 µL, compartimento termostatizado para coluna, desgaseificador e detector de fluorescência (FLD) (excitação de 340 nm e emissão de 390 nm), utilizando metodologia adaptada de Lawrence & Niedzwiadek (2001). Como fases móveis, foram utilizados o formiato de amônio 0,05 M adicionado de 5% de acetonitrila grau HPLC e formiato de amônio 0,1 M com vazão de 1,5 ml/min.

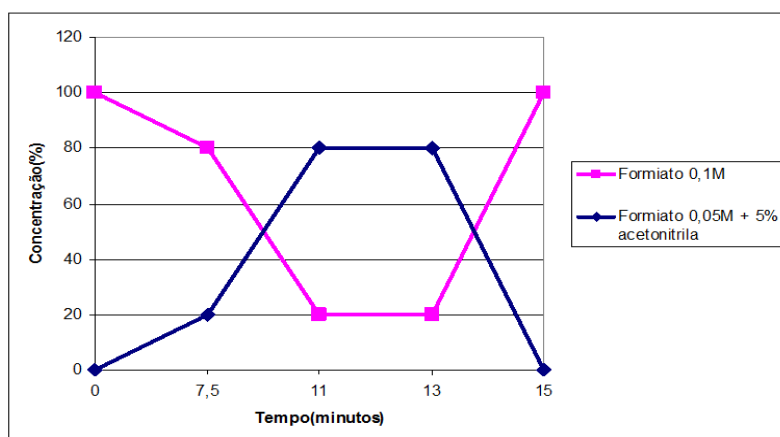


Figura 1: Gráfico das concentrações (%) das fases móveis.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração foi realizada a partir de padrões externos de saxitoxina, dc-saxitoxina e neosaxitoxina, adquiridos da National Research Council of Canadá, em Halifax, Canadá. A faixa linear de concentração das curvas de calibração para cada toxina (Tabela 1), foi definida baseada no limite imposto pela portaria 2914/11 que preconiza uma concentração limite de 3 µg/L.

Tabela 1: Faixa de concentração das curvas de calibração da saxitoxina, dc-saxitoxina e neosaxitoxina.

Toxina	Faixa de concentração (µg.L ⁻¹)
Saxitoxina	2,91 – 29,09
dc-Saxitoxina	0,85 – 17,08
Neosaxitoxina	0,51 – 13,54

OXIDAÇÃO VIA PERÓXIDO E PERIODATO

Para possibilitar a detecção da toxina pelo FLD, foi necessário realizar oxidações das amostras via peróxido e periodato, no intuito de adicionar grupos cromóforos à molécula da toxina. Nas amostras oxidadas via peróxido, um volume de 100 µL da amostra foi adicionado em vial contendo 250 µL de hidróxido de sódio e 25 µL de peróxido de hidrogênio 10% m/v. Posteriormente, o vial foi homogeneizado e aguardou-se 2 minutos, para então serem adicionados 20 µL de ácido acético glacial concentrado com objetivo de parar a reação de oxidação. Foi injetada uma alíquota de 20 µL no HPLC para análise. Nas amostras oxidadas via periodato, oxidou-se 100 µL da amostra em 500 µL de reagente periodato – composto de 5 mL de ácido periódico 0,03 M, 5 mL de formiato de amônio 0,3 M e 5 mL de fosfato de sódio dibásico 0,3 M, ajustado para pH 8,2 usando hidróxido de sódio 0,2 M. Aguardou-se 1 minuto e adicionou-se 5 µL de ácido acético glacial concentrado para pôr fim à reação. A leitura era feita 10 minutos após o fim da reação, com volume de injeção igual ao da oxidação anterior.

RESULTADOS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Os resultados das curvas de calibração das toxinas, saxitoxina, dc-saxitoxina e neosaxitoxina estão apresentados na Tabela 2. As curvas de calibração apresentaram elevados coeficientes de correlação, todos acima de 0,99, indicando uma excelente linearidade. Os tempos de detenção foram 13 minutos para saxitoxina, 7,5 para dc-saxitoxina e 2 para neosaxitoxina, com coeficientes de variação 0,46; 1,80; e 0,42 respectivamente.

Tabela 2: Resultados obtidos a partir das curvas de calibração das toxinas saxitoxina, dc-saxitoxina e neosaxitoxina.

<u>Toxina</u>	Coeficiente de correlação da curva (R^2)	Tempo de detenção TD (minutos)	Coeficiente de variação tempo de detenção
<u>Saxitoxina</u>	<u>0,9952</u>	<u>13,0</u>	<u>0,46</u>
<u>dc-Saxitoxina</u>	<u>0,9970</u>	<u>7,5</u>	<u>1,80</u>
<u>Neosaxitoxina</u>	<u>0,9976</u>	<u>2,0</u>	<u>0,42</u>

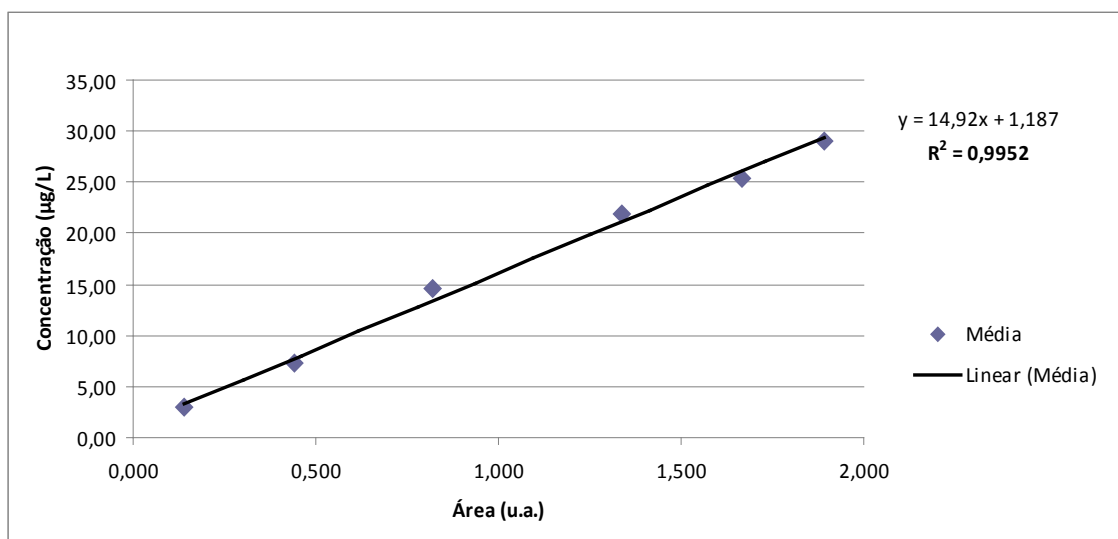


Figura 2: Curva de calibração da saxitoxina.

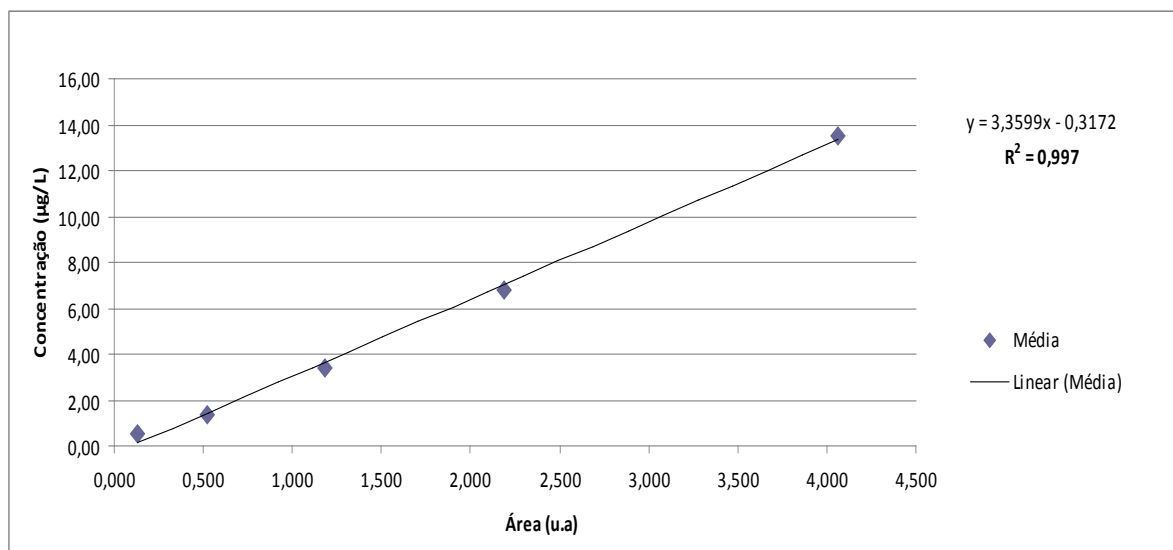


Figura 3: Curva de calibração da Dc-saxitoxina.

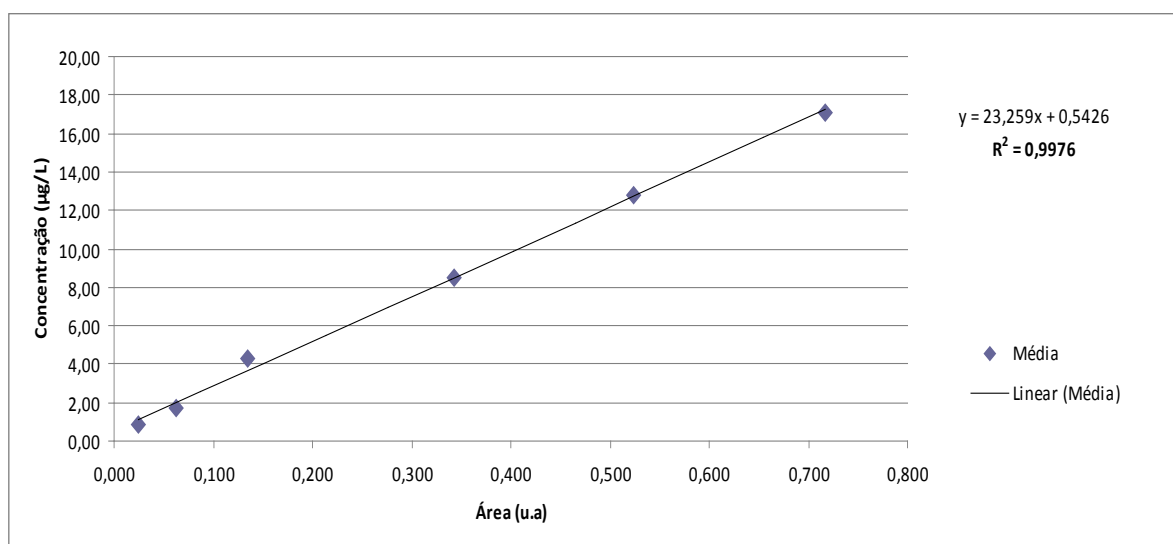


Figura 4: Curva de calibração da neosaxitoxina.

ANÁLISE EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Os cromatogramas indicaram a presença de saxitoxina e dc-saxitoxina (Tabela 4) na amostra oxidada via peróxido nas concentrações de 500,40 µg.L-1 e 52,40 µg.L-1 respectivamente no lote 1, 969,96 µg.L-1 e 120,38 µg.L-1 no lote 2, 796,50 µg.L-1 e 38,12 µg.L-1 no lote 3 e 934,48 µg.L-1 e 109,19 µg.L-1 no lote 4. Já quando a oxidação foi realizada via periodato, não foi possível detectar a neosaxitoxina, por estar abaixo de limite de detecção em todos os lotes analisados. Na Figura 1 são apresentados os cromatogramas dos quatro lotes analisados via peróxido.

Tabela 3: Concentrações encontradas para saxitoxina e dc-saxitoxina nos quatro lotes de estudo.

Lote	Saxitoxina (µg.L ⁻¹)	dc-Saxitoxina(µg.L ⁻¹)
<u>1</u>	<u>500,40</u>	<u>52,40</u>
<u>2</u>	<u>969,96</u>	<u>120,38</u>
<u>3</u>	<u>796,50</u>	<u>38,12</u>
<u>4</u>	<u>934,48</u>	<u>109,19</u>

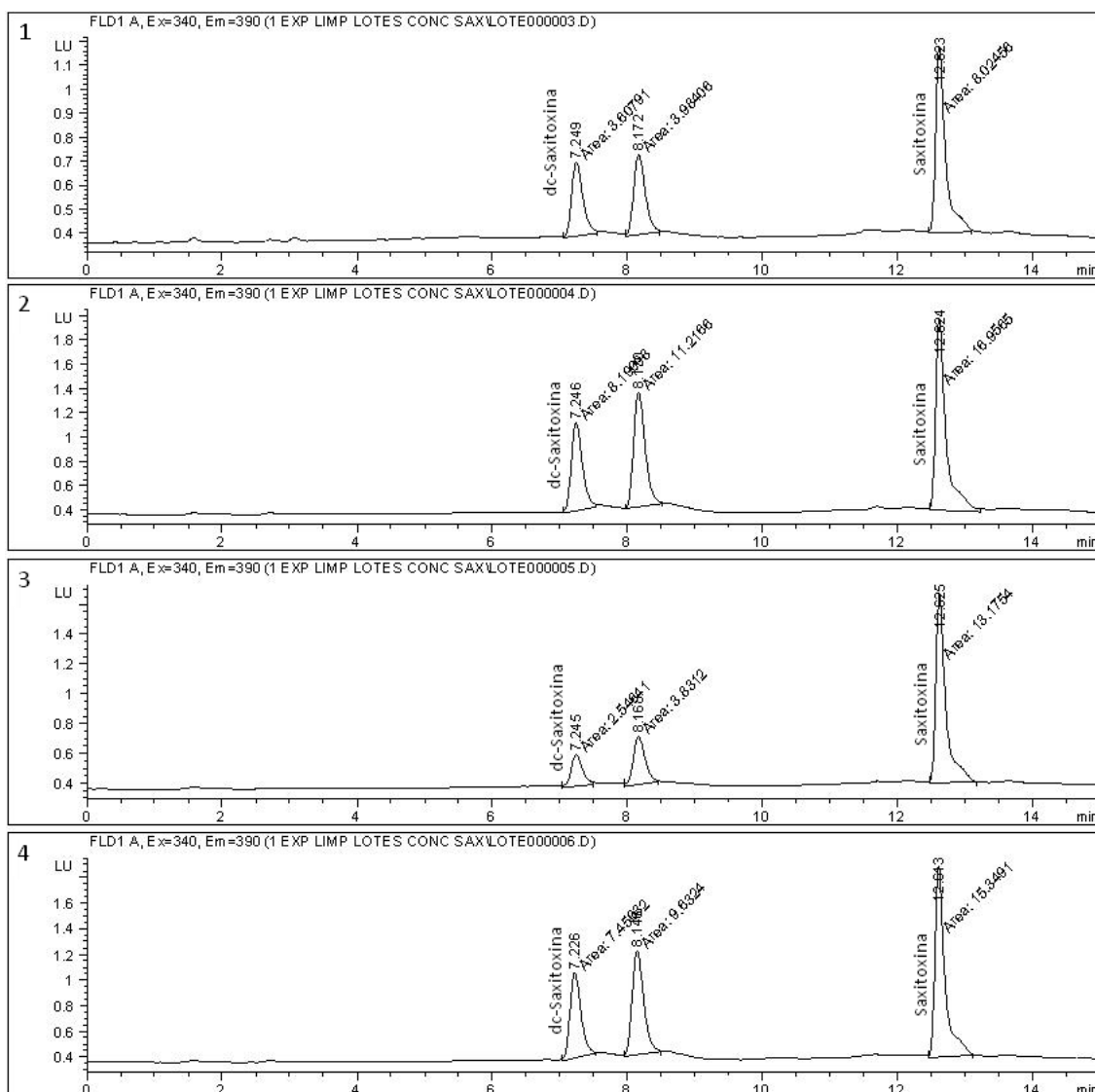


Figura 5: Cromatogramas dos Lotes 1, 2, 3, 4 oxidados via peróxido por HPLC.

CONCLUSÕES

O método implementado mostrou-se capaz de qualificar e quantificar saxitoxinas de forma efetiva mantendo uma excelente linearidade com coeficientes de correlação acima de 0,99. Cada análise começou com a fase móvel estando em 100% de formiato de amônio 0,1 M, enquanto a concentração de formiato de amônio 0,05 M adicionado de 5% de acetonitrila foi de 0-20% até 7,5 minutos, 20-80% de 7,5-11 minutos, se manteve em 80% até os 13 minutos e voltou a 0% de 13-15 minutos. O gradiente utilizado possibilitou sinais com menos ruído, e uma linha de base considerada boa para a interpretação dos cromatogramas, aumentando a resolução dos picos. Apresentou também um tempo de retenção na coluna cromatográfica bastante estável favorecendo a seletividade para as toxinas estudadas. O método apresentou-se de fácil aplicabilidade, já que cada amostra pode ser analisada em menos de 15 minutos, e bastante econômico já que utiliza apenas 5 % de acetonitrila no seu gradiente máximo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LAWRENCE, J. F., NIEDZWIADK, B. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of AOAC INTERNATIONAL vol. 84, No. 4. 2001.
2. BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 2.194, de 12 de dezembro de 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em 20 de setembro às 15h25min.