

Estabilidade de Saxitoxinas GTX 2/3, dc-GTX 2/3 e C1/2 em água de abastecimento e impactos na validação de método analítico

- **Data de entrada:**
03/12/2014
- **Data de aprovação:**
11/02/2016

Saxitoxins GTX 2/3, dc-GTX 2/3 and C1/2 stability in drinking water and impacts on the validation of analytical method

Marianna Correia Aragão | Ana Zélia Abreu | José Capelo Neto

DOI 10.4322/dae.2016.007

Resumo

Vários relatos indicam que cianobactérias produtoras de Saxitoxinas estão cada vez mais presentes em lagos no Brasil e no mundo. Apesar disso, a maioria dos métodos analíticos apresentados na literatura são focados na análise de Saxitoxinas em moluscos marinhos, ficando os métodos para água potável subavaliados. Este trabalho teve como objetivo validar uma metodologia analítica para quantificação de Saxitoxinas GTX2/3, dc-GTX2/3 e C1/2 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e verificar os impactos da estabilidade destas toxinas neste processo. As toxinas C1/2 sofreram degradação rápida, o que impossibilitou a conclusão de sua validação. Para as outras toxinas, o método provou ser seletivo, eficiente, exato, preciso e robusto, exceto para baixas concentrações. Apesar da significativa redução do limite de quantificação comparativamente à literatura recente, os mesmos ficaram acima do valor máximo permitido para Saxitoxinas pela portaria MS 2914/2011, sugerindo que a agregação de uma etapa de pré-concentração é fundamental. Os resultados sugerem também que, devido à instabilidade destas toxinas, sua detecção em águas naturais ou tratadas podem ser comprometidas se os procedimentos de coleta e preservação não seguirem técnicas apropriadas.

Palavras-chave: Estabilidade de Saxitoxinas; Validação de método analítico, CLAE-DFI

Abstract

Several reports indicate that saxitoxin-producing cyanobacteria are increasingly present in lakes in Brazil and world-wide. Nevertheless, most analytical methods reported in the literature are focused on the analysis of marine shellfish, leaving methods for drinking water understudied. This study had as objectives to validate an analytical methodology for quantification of saxitoxins GTX2/3, dc-GTX2/3 and C1/2 using high performance liquid chromatography and verify the impact of the toxins stability in the process. Toxins C1/2 suffered rapid degradation, which prevented the completion of its validation. For the other toxins, the method proved to be selective, efficient, accurate, precise and robust, except for the low concentrations. Despite the significant reduction of the limit of quantification as compared to recent literature, they were still above the amount allowed by MS 2914/2011 for drinking water, suggesting that incorporation of a pre-concentration step is necessary. The results also suggest that, due to the instability of these toxins, their detection in natural or treated waters can be compromised if the collection and preservation procedures do not follow appropriate techniques.

Keywords: Saxitoxins stability; Analytical method validation; HPLC-FLD.

Marianna Correia Aragão¹ - Mestre em Engenharia Civil/Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ana Zélia Abreu¹ - Engenheira Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

José Capelo Neto¹ - Pós doutorado pela Universidade do Sul da Austrália/Adelaide. Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental a Universidade Federal do Ceará.

* **Endereço para correspondência:** ¹ Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Seção Laboratorial de Qualidade de Água (SELAQUA), Bloco 720, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte, s/n, 60451-970, Fortaleza – CE, Brasil. e-mail: capelo@ufc.br

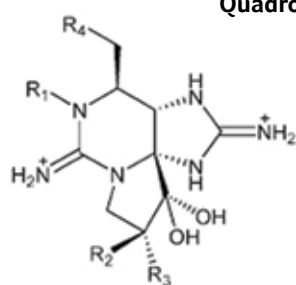
INTRODUÇÃO

As cianotoxinas são metabólitos secundários produzidos por cianobactérias, como *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena circinalis* e *Planktothrix sp.*, por exemplo, e dinoflagelados dos gêneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* em ambientes de água doce e marinhos (HARA et al., 2013). As cianotoxinas apresentam estruturas químicas (Quadro 1) e propriedades toxicológicas diversificadas (SIVONEN; JONES, 1999; HUMPAGE et al., 2010) e são classificadas de acordo com o modo de ação nos organismos: neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e Saxitoxinas – STX, também conhecidas como *Paralytic Shellfish Poisoning*

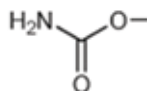
– PSP), hepatotoxinas (microcistinas, nodularina, cilindrospermopsina) e endo ou dermatotoxinas (lipopolissacarídeos, lingbiatoxinas e aplisiatoxinas) (MONDARDO, 2009).

As Saxitoxinas são classificadas basicamente em três grupos: carbamato, N-sulfocarbamoil e decarbamoil. As toxinas do grupo carbamato são as mais potentes e dentre elas estão: Saxitoxina (STX), Neo-saxitoxinas (NEO) e Goniautoxinas (GTX1-4). Goniautoxinas são as toxinas mais abundantes nas amostras de extratos de moluscos, estando presentes em 75% a 85% das amostras analisadas (ANDRINOLO et al., 2002; ZHANG et al., 2013).

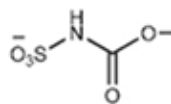
Quadro 1 – Estruturas químicas das toxinas do grupo PSP.



Toxinas carbamato



Toxinas N-sulfocarbamoil



Toxinas decarbamoil



R1	R2	R3	R4		
-H	-H	-H	STX	GTX	dc-STX ^a
-H	-H	-OSO ₃ -	GTX2	C1	dc-GTX2
-H	-OSO ₃ -	-H	GTX3	C2	dc-GTX3
-OH	-H	-H	NEO	GTX6	dc-NEO
-OH	-H	-OSO ₃ -	GTX1	C3	dc-GTX1
-OH	-OSO ₃ -	-H	GTX4	C4	

Fonte: Adaptado de Lawrence et al. (2005).

Notas: a dc-STX = decarbamoilSaxitoxinas.

Quadro 2 – Vantagens e desvantagens dos métodos de detecção de cianotoxinas.

Método	Vantagens	Desvantagens
Bioensaio	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo custo. • Facilidade no uso. • Obtenção de outras informações sobre toxicidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não apresenta diferenciação de toxicidade entre toxinas. • Sacrifício de animais.
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidade. • Rapidez e facilidade no uso. • Análise de alto desempenho. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo. • Necessidade de métodos cromatográficos complementares. • Não apresenta resultados distintos entre variantes.
CLAE	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo menor de análise. • Alta resolução. • Resultados quantitativos. • Alta sensibilidade. • Versatilidade e automação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo. • Falta de detector universal sensível. • Necessidade de experiência dos operadores.

Com o incremento das notificações de intoxicação humana e animal a partir de água de reservatórios superficiais, o estudo das cianobactérias e dos efeitos causados por seus metabólitos tem sido intensificado. Intoxicações causadas por cepas tóxicas de cianobactérias já foram registradas em países como Austrália, Inglaterra, China, Brasil e África do Sul (FALCONER; HUMPAGE, 2005). Mais especificamente, em vários reservatórios do estado do Ceará, a comunidade fitoplanctônica apresentou dominância de cianobactérias, compondo aproximadamente 90% do número de indivíduos (BARROS, 2013). Em todos os açudes investigados na pesquisa de Barros (2013), a contribuição de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi maior que 70% em todas as amostras coletadas. No Reservatório Sítios Novos, por exemplo, seis classes de organismos fitoplanctônicos foram identificadas, isoladas e tiveram sua toxicidade avaliada. Alguns desses organismos se mostraram produtores de STX: *Cylindrospermopsis raciborskii* produzindo STX e decarbamoilSaxitoxinas (dc-STX) e *Planktothrix agardhii* produzindo decarbamoilgoniautoxinas (dc-GTX) (LOPES, 2013). Depois do acidente ocorrido em uma clínica de hemodiálise em Pernambuco, em 1996, as autoridades sanitárias brasileiras passaram a dar atenção especial à questão

de intoxicações por cianotoxinas, culminando na inclusão do limite máximo de STX de 3,0 µg.L⁻¹ na Portaria MS nº 2.914/2011.

Os métodos de detecção usados para identificar e quantificar as toxinas presentes na água variam em grau de sofisticação e informações que fornecem, sendo os critérios da seletividade e sensibilidade dois dos mais importantes para a escolha do método (CHORUS; BARTRAM, 1999). As principais metodologias de detecção e quantificação de cianotoxinas em amostras de águas na atualidade incluem bioensaios, imunoenaios (ELISA) e técnicas cromatográficas (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE). As vantagens e desvantagens de cada método estão especificadas de forma simplificada no Quadro 2.

A CLAE, utilizando coluna de fase reversa e Detector de Fluorescência (DFI), é utilizada para quantificação de STX (LAWRENCE et al., 2005; OSHIMA, 1995). Entre os métodos descritos na literatura utilizando CLAE-DFI, destaca-se o método oficial aprovado pela Comissão Europeia para detecção e quantificação de várias STX por derivatização pré-coluna (AOAC, 2005). Entretanto, esse método foi validado apenas para extratos de mariscos (CEFAS, 2008; TURNER, 2009).

He et al. (2005) analisaram amostras de fitoplâncton marinho utilizando o método de oxidação pré-coluna com modificações significativas em relação aos métodos até então propostos. Os autores analisaram NEO-STX, STX, GTX1/4 e GTX2/3 e obtiveram boa recuperação e baixos limites de detecção. Diener et al. (2006), por sua vez, propuseram um método similar ao de Oshima (1995), mas usando uma única corrida com diferentes fases móveis para separar e quantificar GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, NEO-STX, dc-STX e STX em suplementos alimentares, encontrando também baixos limites de detecção. Já Silvino e Capelo-Neto (2014) validaram com sucesso uma variante do método proposto por Lawrence et al. (2005) para detecção e quantificação de STX e dc-STX provenientes do cultivo da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. Entretanto, não foram encontrados na literatura registros de validação de método para análise de GTX2/3, dc-GTX2/3 e C1/2 em amostras de água bruta ou tratada.

Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivo principal validar uma metodologia de detecção e quantificação das cianotoxinas GTX2/3, dc-GTX2/3 e C1/2 por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência e derivação pré-coluna, utilizando água tratada como matriz. Como objetivo secundário, estudou-se a estabilidade dessas toxinas e seu impacto nos procedimentos analíticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ampolas contendo os padrões de GTX2/3, dc-GTX2/3 e C1/2 foram adquiridas no Institute for Marine Bioscience (Halifax, Canadá) e mantidas em solução de ácido clorídrico 0,003 M e ácido acético 0,01 M com volume aproximado de 0,5 mL. Os outros reagentes utilizados foram: ácido acético concentrado (Sigma-Aldrich – grau HPLC), ácido clorídrico (Cinética Reagentes & Soluções – grau analítico), ácido periódico e peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina – grau analítico), fosfato de sódio e hidróxido de sódio (Dinâmica Química – grau analítico), tiosulfato de sódio pentahidratado (Synth – grau analítico), acetoneitrila (Merck – grau HPLC), formiato de amônio e metanol (Vetec Química Fina – grau HPLC).

As soluções Estoque 1 foram preparadas a partir da diluição dos padrões em ácido acético 0,01 M em balões volumétricos de 10 mL. O Estoque 1 foi mantido protegido da luz, em pH 4 e a -20 °C. Segundo Lawrence et al. (2005), a validade dessa solução é de um ano se mantida no escuro e a uma temperatura abaixo de 4 °C. A solução de trabalho MIX teve como objetivo facilitar a preparação das amostras e foi preparada diluindo 1,3 mL de cada solução Estoque 1 em ácido acético 0,1 mM em um balão volumétrico de 10 mL. As concentrações dos padrões, das soluções Estoque 1 e da solução de trabalho MIX foram calculadas a partir das concentrações dos padrões e da massa molar de cada toxina, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações das toxinas presentes nos padrões, Estoque 1 e MIX.

Toxina	Padrão (µmol.L ⁻¹)	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Padrão (µg.L ⁻¹)	Estoque 1 (µg.L ⁻¹)	MIX (µg.L ⁻¹)
GTX2/3	157,6	395,4	62.315,04	2.636,60	342,75
dc-GTX2/3	142,1	352,3	50.061,83	2.565,40	333,50
C1/2	147,3	475,4	70.026,42	3.315,50	431,02

A metodologia de validação de GTX2/3, dc-GTX2/3 e C1/2 por CLAE-DFI foi desenvolvida para avaliar a presença dessas toxinas em água tratada após a desinfecção. A água foi coletada da rede pública de abastecimento a partir da torneira de entrada, antes da caixa d'água. Uma gota de tiosulfato de sódio 0,05 M para cada 25 mL de amostra de água tratada foi adicionada, com o objetivo de remover o cloro residual. De forma a permitir a detecção via DFI, foram adicionados grupos cromóforos às moléculas das toxinas por meio da oxidação das amostras com peróxido de hidrogênio. Um volume de 100 µL da amostra foi adicionado em um *vial* contendo 250 µL de solução de hidróxido de sódio 1 M e 25 µL de solução peróxido de hidrogênio 10% m/v. Posteriormente, o *vial* foi homogeneizado e, após 2 min, 20 µL de ácido acético glacial foram adicionados, com a finalidade de parar a reação de oxidação. Uma alíquota de 20 µL foi utilizada para injeção no cromatógrafo. As condições cromatográficas para a quantificação das toxinas foram baseadas no método desenvolvido por Lawrence et al. (2005), com algumas modificações. Foi utilizado um cromatógrafo Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity. Tal sistema consistia de dois reservatórios e uma bomba de alimentação de fase móvel, um injetor de amostra (*loop* de 20 µL), uma coluna de fase reversa mantida a 30 °C (Phenomenex C18, 150 mm x 4,6 mm D.I., 4 µm de tamanho de partícula) e um detector de fluorescência (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity). A fase móvel foi constituída de (A) formiato de amônio (0,1M) e (B) formiato de amônio (0,05 M) com acetonitrila (5%), tendo como gradiente de eluição inicialmente 100% da fase móvel A, mudando nos primeiros 7,5 min de 0% a 20% da fase móvel B, passando posteriormente, nos 3,5 min seguintes, de 20% a 80% da fase móvel B e nos 2 min finais retornando a 100% da fase móvel A. O fluxo do eluente foi de 1,5 mL.min⁻¹, o detector foi ajustado nos comprimentos

de onda de 340 nm em excitação e 390 nm em emissão e o tempo total de corrida foi de 13 min.

As características investigadas no processo de validação para demonstração do desempenho do método foram: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ), precisão e exatidão e robustez. Os parâmetros de validação do método foram definidos de acordo com a Resolução ANVISA nº 899/2003, o método desenvolvido por Youden e Steiner (1975) e recomendado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2010) e o guia de validação proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). A estabilidade das toxinas nas soluções ao longo do tempo também foi investigada.

SELETIVIDADE

A avaliação da seletividade foi realizada a partir da comparação do cromatograma da matriz isenta da substância de interesse e da matriz contendo as toxinas. O teste foi feito em três concentrações diferentes e cada amostra foi injetada duas vezes. Para a constatação da existência ou não do efeito matriz, foram comparadas duas curvas analíticas com o MIX, uma utilizando como diluente a matriz e a outra, água deionizada. Em cada uma das curvas, foram analisados seis pontos, ou seja, seis amostras independentes. O paralelismo entre as curvas foi verificado utilizando a distribuição t de Student para a comparação dos coeficientes angulares das retas.

ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE TRABALHO MIX

A estabilidade foi avaliada numa única concentração da solução de trabalho MIX (342,75 µg.L⁻¹ para GTX2/3, 333,50 µg.L⁻¹ para dc-GTX2/3 e 472,01 µg.L⁻¹ para C1/2), comparando as concentrações iniciais aos resultados obtidos com a mesma solução ao longo de 43 dias.

Tabela 2 – Concentrações das toxinas utilizadas na linearidade e faixa de trabalho.

Toxina	Concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
GTX2/3	10,28	20,57	34,28	51,41	68,55	102,83
dc-GTX2/3	10,01	20,01	33,35	50,03	66,70	100,05

Tabela 3 – Concentrações de GTX2/3 e dc-GTX2/3 utilizadas para a determinação da exatidão.

Toxina	Concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
GTX2/3	10,71	21,42	42,84	85,69	171,38	342,75
dc-GTX2/3	10,42	20,84	41,69	83,38	166,75	333,50

LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO

A linearidade e a faixa de trabalho foram avaliadas utilizando as curvas de calibração em seis concentrações diferentes e água deionizada como diluente (Tabela 2), somente para as toxinas GTX2/3 e dc-GTX2/3, uma vez que C1/2 degradou-se rapidamente, não tendo sido possível prosseguir com sua validação. As concentrações da faixa de trabalho foram escolhidas considerando as concentrações de STX equivalentes encontradas frequentemente em reservatórios superficiais no estado do Ceará (CAGECE, 2013). Três curvas foram realizadas, sendo cada ponto da curva injetado em duplicata. Utilizou-se o método de regressão linear para a obtenção das equações da reta e a análise da correlação linear pelo método dos mínimos quadrados.

LD E LQ

LD e LQ foram estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes até o menor nível detectável e quantificável. Os limites foram determinados pelo método do sinal-ruído, em que é feita uma comparação das amostras em baixa concentração com o branco dessas amostras. As relações sinal-ruído utili-

zadas para LD e LQ foram 3:1 e 10:1, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

PRECISÃO

A repetitividade foi usada para identificar a precisão do método. Foi realizada analisando três concentrações e três repetições para cada concentração. As concentrações utilizadas para as duas toxinas foram de 6,86, 13,71 e 20,57 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de 6,67, 13,34 e 20,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para GTX2/3 e dc-GTX2/3, respectivamente. Como a Resolução ANVISA nº 899/2003 não explicita o critério de aceitação dos resultados de precisão, utilizaram-se como referência os critérios aplicados na validação em fármacos, produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários do MAPA (2011).

EXATIDÃO

A exatidão foi verificada utilizando padronização externa, visto que a matriz empregada (água tratada) não continha GTX2/3, nem dc-GTX2/3. As concentrações dos padrões externos são apresentadas na Tabela 3. Os testes foram realizados em triplicata.

Quadro 3 – Condições normais e alteradas para a análise da robustez.

Variável		Condições normais		Condições alteradas
Concentração da fase móvel	A	0,10 M	a	0,12 M
Estabilidade da solução de trabalho	B	Oxidar a amostra após a diluição	b	Oxidar a amostra após 30 min da diluição
Temperatura da coluna	C	30 °C	c	33 °C
Agitação	D	Manual	d	Vórtex
Tempo de injeção	E	Injetar a amostra após oxidação	e	Injetar a amostra após 15 min da oxidação
Tamanho da amostra	F	100 µL	f	110 µL
Tempo de oxidação	G	2 min	g	2,3 min

ROBUSTEZ

A robustez foi determinada a partir do método desenvolvido por Youden e Steiner (1975) e recomendado pelo INMETRO (2010), uma vez que não há referência para esse teste na metodologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). Sete parâmetros analíticos foram escolhidos para a avaliação, os quais foram alterados, sendo os efeitos dessas alterações avaliados no fim de cada uma das oito análises. A variância (s^2) foi utilizada para verificar se o efeito na alteração dos parâmetros foi significativo ou não. O Quadro 3 mostra os parâmetros avaliados e suas respectivas alterações, sendo as condições “normais” representadas por letras maiúsculas e as condições alteradas por letras minúsculas. A robustez foi analisada em triplicata para as concentrações 27,42 µg.L⁻¹ para GTX2/3 e 26,68 µg.L⁻¹ para dc-GTX2/3. Os resultados foram avaliados quanto a mudanças na área do pico e no Tempo de Retenção (TR).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises físico-químicas da matriz

De forma a fornecer maior conhecimento sobre a matriz utilizada, a caracterização físico-química da água tratada é apresentada no Quadro 4. Os procedimentos analíticos para essa caracterização foram baseados nas metodologias descritas pela American Public Health Association (APHA, 2005).

C1/2

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 1, observa-se que as toxinas C1/2 eluíram no tempo de 6,84 min, próximo ao obtido por Lawrence et al. (2005) para extratos de mexilhão após a limpeza com extração em fase sólida (SPE) C18. A constatação da não interferência da matriz foi avaliada a partir da comparação entre as duas curvas analíticas (Figura 2), as quais se mostraram paralelas. Os coeficientes angulares das curvas apresentaram uma diferença inferior a 1% e o teste t (Po=5%) mostrou que eles não são significativamente diferentes.

Quadro 4 – Caracterização físico-química da água tratada usada como matriz.

Parâmetro	Unidade	Resultado
Turbidez	μT	0,35
Cor aparente	μH	2,5
pH	-	7,78
Alcalinidade – hidróxidos	$\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$	< 0,01
Alcalinidade – carbonatos	$\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$	< 0,01
Alcalinidade – bicarbonatos	$\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$	105,18
Dureza total	$\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$	156,44
Cálcio	$\text{mg Ca}\cdot\text{L}^{-1}$	23,76
Magnésio	$\text{mg Mg}\cdot\text{L}^{-1}$	23,31
Condutividade	$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	639
Cloreto	$\text{mg Cl}\cdot\text{L}^{-1}$	12,7
Sódio	$\text{mg Na}\cdot\text{L}^{-1}$	39,93
Potássio	$\text{mg K}\cdot\text{L}^{-1}$	10,72
Nitrato	$\text{mg N-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$	0,02
Nitrito	$\text{mg N-NO}_2\cdot\text{L}^{-1}$	< 0,001
Amônia – Nesslerização	$\text{mg N/NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$	0,32
Alumínio	$\text{mg Al}\cdot\text{L}^{-1}$	0,07
Fluoreto	$\text{mg F}\cdot\text{L}^{-1}$	0,8
Manganês	$\text{mg Mn}\cdot\text{L}^{-1}$	< 0,02
Ferro total	$\text{mg Fe}\cdot\text{L}^{-1}$	0,02
Oxigênio consumido	$\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$	2,75
Carbono orgânico total	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	8,27

A solução Estoque 1 de toxinas C1/2 foi completamente degradada em menos de uma semana, mesmo tendo sido protegida da luz e a uma temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, transformando-se em toxinas do grupo carbamato (GTX2/3, STX e NEO) (dados não apresentados). A diminuição das concentra-

ções das toxinas C1/2, mesmo em um pH baixo (3 a 5), foi observada anteriormente por Indrasena e Gill (2000) e European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EURLMB, 2011), mas numa velocidade menor. Portanto, não foi possível finalizar o processo de validação para as toxinas C1/2.

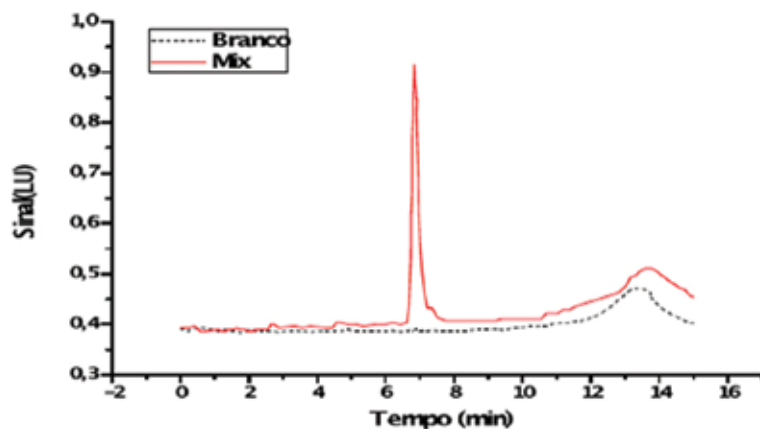


Figura 1 – Cromatogramas da matriz sem (linha pontilhada) e com (linha vermelha) toxina C1/2.

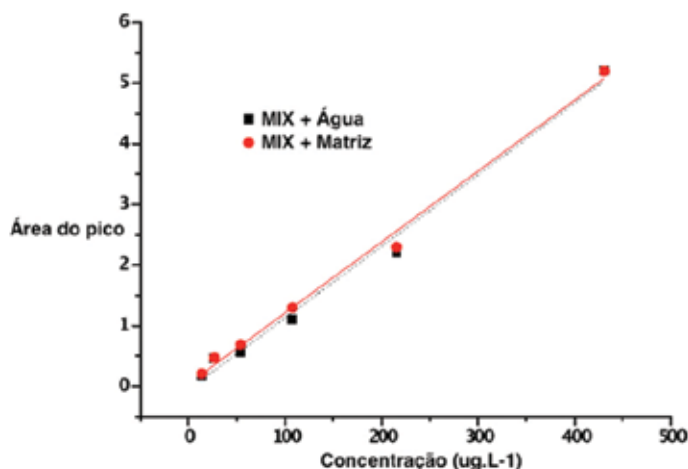


Figura 2 – Curvas analíticas para C1/2 obtidas por MIX + água deionizada e MIX + matriz.

GTX2/3 E DC-GTX2/3 Estabilidade das toxinas

Apesar de todos os requisitos de preservação de amostra sugeridos por Indrasena e Gill (2005) terem sido obedecidos, percebeu-se uma diminuição nas concentrações das toxinas. Segundo o Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS, 2008), caso seja manti-

da nas condições adequadas, a solução de trabalho pode ser utilizada em até um ano. Já para Indrasena e Gill (2005), GTX2/3 e dc-GTX2/3 apresentam degradação significativa em aproximadamente três a quatro meses a 25 °C e pH 7. No caso desta pesquisa, a solução de trabalho MIX, mantida protegida da luz, em pH 4 e a -20 °C, apresentou diminuição da concentração em 61% ao longo de 43 dias (Figura 3).

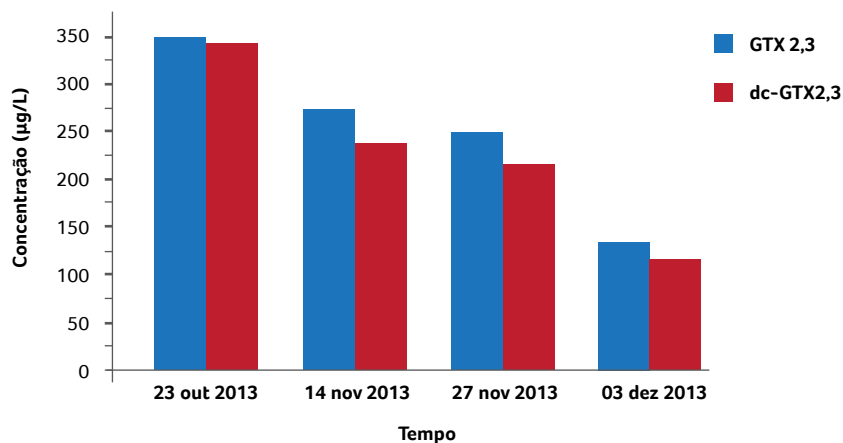


Figura 3 – Diminuição da concentração da solução MIX de GTX2/3 e dc-GTX2/3 ao longo do período de estudo.

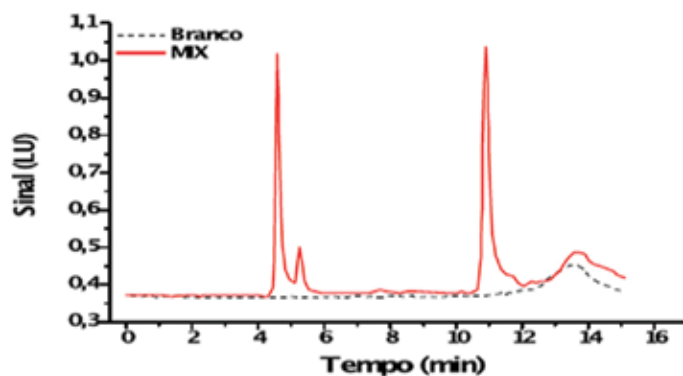


Figura 4 – Cromatogramas obtidos pela matriz isenta de toxina (branco) e com presença de toxina (MIX).

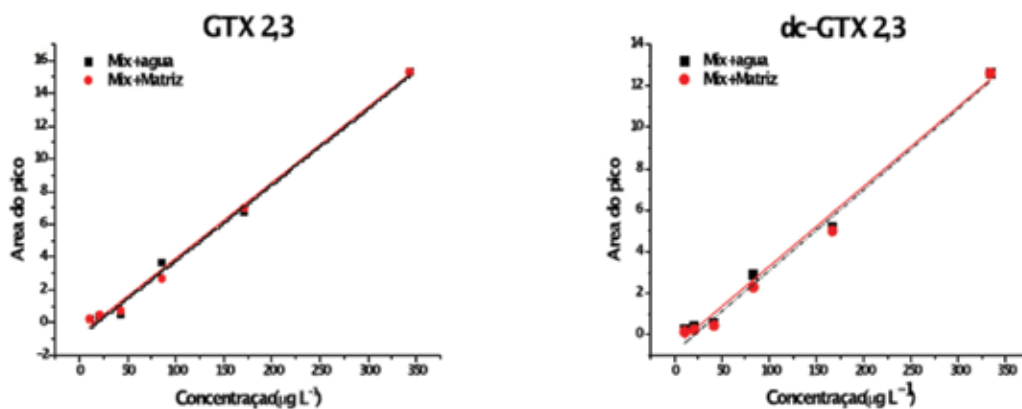


Figura 5 – Curvas analíticas para GTX2/3 e dc-GTX2/3 obtidas com MIX + água deionizada e MIX + matriz.

Tabela 4 – Parâmetros das curvas analíticas das curvas MIX + água deionizada e MIX + matriz para GTX2/3 e dc-GTX2/3.

	Eq. da reta	R ² (coeficiente de correlação)	Valor P (t de Student)
GTX2/3			
MIX + água deionizada	$y = 0,0935x - 0,2694$	0,9968	0,94
MIX + matriz	$y = 0,0947x - 0,3825$	0,9964	
dc-GTX2/3			
MIX + água deionizada	$y = 0,0763x - 0,1608$	0,9972	0,96
MIX + matriz	$y = 0,0773x - 0,4031$	0,9865	

SELETIVIDADE

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 4, pode-se afirmar que o método desenvolvido para a análise de GTX2/3 e dc-GTX2/3 é seletivo, pois as toxinas eluíram em tempos diferentes (10,73 min para GTX2/3 e 4,61 min para dc-GTX2/3) e na mesma sequência observada por Lawrence et al. (2005). Não foi observada interferência da matriz na detecção dessas toxinas.

A não interferência da matriz no procedimento analítico foi identificada a partir da comparação das curvas analíticas da Figura 5, as quais se apresentaram paralelas. Percebeu-se que os coeficientes de correlação foram iguais considerando o nível de confiança de 95% (Tabela 4), confirmando, portanto, a inexistência do efeito matriz.

LINEARIDADE

As concentrações escolhidas para o método variaram de 10,28 a 102,83 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de 10,01 a 100,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para GTX2/3 e dc-GTX2/3, respectivamente. Essas faixas de concentração foram escolhidas considerando a abrangência das concentrações de STX encontradas em reservatórios superficiais na região (CAGECE, 2013). Na Figura 6 e Tabela 5, pode-se verificar a linearidade, apresentando coeficientes de correlação acima de 0,99 e indicando que as áreas dos picos são linearmente proporcionais às concentrações, conforme exigido pela ANVISA (2005). Comparando os coeficientes de correlação deste estudo com os obtidos para STX por Halme et al. (2012) ($R^2 = 0,9768$), percebe-se uma melhoria significativa dos resultados obtidos nesta pesquisa em relação aos da literatura atual.

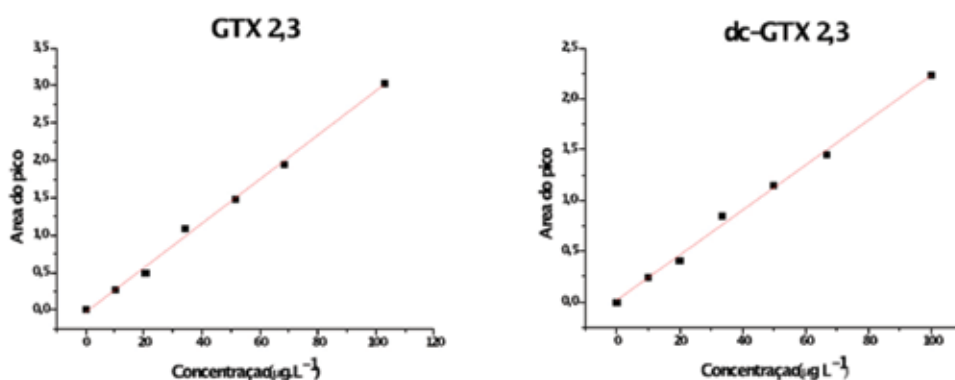


Figura 6 – Relação área do pico versus concentração obtida para GTX2/3 e dc-GTX2/3.

Tabela 5 – Faixas de trabalho utilizadas nas curvas de calibração de GTX2/3 e dc-GTX2/3.

Toxina	Faixa da curva ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Eq. da reta	R2
GTX2/3	10,28 a 102,83	$y = 0,0296x - 0,0305$	0,997
dc-GTX2/3	10,01 a 100,05	$y = 0,0221x + 0,0184$	0,996

Tabela 6 – LD e LQ do instrumento e do método para cada toxina.

Toxina	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Instrumento		Método	
	LD	LQ	LD	LQ
GTX2/3	0,69	1,21	2,74	4,80
dc-GTX2/3	0,68	1,18	2,67	4,67

Quadro 5 – LD e LQ para STX e dc-STX apresentados na literatura.

Referência	Silvino e Capelo-Neto (2013)	Freitas (2007)	CEFAS (2008)	Halme et al. (2012)
Técnica/deteção	HPLC-FLD	HPLC-FLD	HPLC-FLD	HILIC-MS/MS
Método de oxidação	Pré-coluna	Pós-coluna	Pré-coluna	*
Tipo de matriz	Extrato de cianobactérias CR-T3 pós-extração	Água deionizada com toxina após lise celular CR-T3	Extrato de molusco	Matriz de algas
LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	STX – 2,53 dc-STX – 1,83	STX – 3,0 dc-STX – 3,0	STX – 18,0 dc-STX – 7,0	STX – 3,0 dc-STX – ***
LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	STX – 3,45 dc-STX – 2,24	**	STX – 40,0 dc-STX – 10,0	STX – 11,0 dc-STX – ***

Notas: HILIC-MS/MS = cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplada a um espectrômetro de massa (HILIC-MS/MS). * Não necessitou oxidar a amostra devido à utilização de um espectrômetro de massa. ** Não apresentou o dado de LQ. *** O trabalho analisou apenas STX.

Tabela 7 – Resultados do parâmetro de precisão para GTX2/3 e dc-GTX2/3 em três diferentes concentrações.

Toxina	Coeficiente de variação (%)		
	6,86 µg L ⁻¹	13,71 µg L ⁻¹	20,57 µg L ⁻¹
GTX2/3	12,42	5,58	10,59
dc-GTX2/3	12,43	5,59	10,58

Tabela 8 – Resultados do parâmetro de exatidão para GTX2/3 e dc-GTX2/3 em seis diferentes concentrações.

Toxina	Exatidão (%)					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
GTX2/3	185,65	115,65	84,77	100,80	92,45	102,15
dc-GTX2/3	178,25	118,71	80,07	98,81	96,60	101,01

LD E LQ

Os valores encontrados para LD e LQ do instrumento e do método são apresentados na Tabela 6. LD e LQ do instrumento foram determinados a partir das áreas dos picos obtidos dos cromatogramas e LD e LQ do método foram calculados considerando a diluição das amostras durante a etapa de oxidação. Os valores de LD e LQ do instrumento e de LD do método mostraram-se inferiores ao valor exigido pela Portaria MS nº 2.914/2011 (3,0 µg L⁻¹), enquanto o LQ do método ficou acima. De qualquer forma, os LQs do instrumento mostraram-se inferiores aos resultados obtidos por outros autores para STX diferentes (Quadro 5), indicando um bom potencial do procedimento analítico ora implementado.

PRECISÃO

Os valores dos coeficientes de variação para os testes de precisão, expressos na Tabela 7, não ultrapassaram o valor máximo permitido de 11,7% (MAPA, 2011), com exceção do resultado para a concentração de 6,86 para GTX2/3 e 6,67 µg L⁻¹ para dc-GTX2/3. Esse fato pode ter ocorrido devido ao decréscimo das concentrações observado em baixas concentrações. Os resultados revelam que o método fornece precisão aceitável segundo a referência adotada utilizando o parâmetro da repetitividade, para concentrações igual ou superior a 13,71 µg L⁻¹ e 13,34 µg L⁻¹, para GTX2/3 e dc-GTX2/3, respectivamente. Silvino e Capelo-Neto (2014) analisaram a precisão de método similar para STX e dc-STX em concentrações entre 4,48 e 13,44 µg L⁻¹ e de 3,96 a 11,89 µg L⁻¹,

Tabela 9 – Valores dos efeitos obtidos a partir dos resultados das áreas dos picos e do TR, de acordo com o teste de Youden e Steiner (1975).

Variável	Área do pico		TR	
	GTX2/3	dc-GTX2/3	GTX2/3	dc-GTX2/3
Concentração da fase móvel	-0,0908	-0,0858	-0,1211	0,0396
Estabilidade da solução de trabalho	0,1192	0,0825	0,0571	0,0314
Temperatura da coluna	-0,1042	-0,0075	0,7838	0,1266
Agitação durante a oxidação	-0,0575	-0,0458	0,0056	-0,0109
Tempo de injeção após oxidação	-0,0442	0,0275	0,0059	0,0323
Tamanho da amostra	-0,1608	-0,1708	0,0137	0,0141
Tempo de oxidação	-0,0008	-0,0625	-0,0121	-0,0179
s^2	0,1919	0,1693	0,6012	0,1076

respectivamente. Para o teste de repetitividade, os coeficientes de variação variaram entre 0,23% e 7,50 % para a área do pico. Deve-se levar em consideração, entretanto, que as toxinas STX e dc-STX são mais estáveis que as utilizadas nesta pesquisa (INDRASENA; GILL, 2000).

EXATIDÃO

Seis diferentes concentrações, entre 10,42 e 342,75 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foram utilizadas para a avaliação da exatidão. Os valores obtidos pelo método (Tabela 8) ficaram dentro da faixa de 80% a 110%, de acordo com o guia de validação proposto pelo MAPA (2011), com exceção dos valores obtidos para as menores concentrações. Novamente, isso pode ter acontecido devido à instabilidade da toxina em menores concentrações.

ROBUSTEZ

Comparando os valores de referência e os valores dos efeitos obtidos a partir das respostas das áreas dos picos (Tabela 9), percebe-se que as áreas dos picos não são influenciadas pela variação de nenhum parâmetro. Já com relação às respostas do TR, observa-se que todos os resultados foram menores do que o valor do critério s^2 , exceto o do parâmetro temperatura da coluna, conforme também observado por Silvino e Capelo-Neto (2014) e Cassini et al. (2013). Portanto, o método apresentou sensibilidade à variação da temperatura da coluna em 3 °C. Essa sensibilidade não deve representar um problema na prática, uma vez que o sistema cromatográfico consegue manter a temperatura da coluna com uma diferença inferior a $\pm 0,1$ °C.

CONCLUSÕES

A toxina C1/2 sofreu degradação rápida durante o experimento, o que impossibilitou a conclusão de sua validação. Observou-se, entretanto, que existem uma boa seletividade e uma correlação próxima entre o sinal e a concentração, indicando uma boa linearidade na faixa de trabalho escolhida. Os resultados obtidos permitem concluir que o método empregado para análise de GTX2/3 e dc-GTX2/3 é seletivo, eficiente, exato, preciso e robusto, com exceção da precisão e exatidão para baixas concentrações. Já os limites de quantificação do método (4,80 µg.L⁻¹ para GTX2/3 e 4,67 µg.L⁻¹ para dc-GTX2/3) ficaram acima do valor permitido pela Portaria MS nº 2.914/2011. Esses resultados sugerem que um método de concentração pré-análise (SPE, liofilização ou evaporação) é necessário para atender ao requerimento da portaria, contribuindo também para minimizar os erros analíticos encontrados em baixas concentrações.

Observou-se também que a estabilidade das soluções mais diluídas dessas toxinas apresentou uma validade menor que a encontrada na literatura. Isso sugere não só que todo o processo de validação, mas também a análise e amostragem de águas tratada e natural, deve ser executado em um curto espaço de tempo. A instabilidade dessas toxinas em condições controladas, principalmente no caso das toxinas C1/2, permite inferir que sua detecção em águas naturais ou tratadas é improvável, a menos que técnicas de coleta de amostras e técnicas analíticas apropriadas sejam adotadas.

AGRADECIMENTOS

Os pesquisadores agradecem à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento para o desenvolvimento das pesquisas e à Companhia de Água e

Esgoto do Ceará (Cagece) e seus colaboradores pelo apoio e informações disponibilizadas.

REFERÊNCIAS

- ANDRINOLO, D.; IGLESIAS, V.; GARCÍA, C.; LAGOS, N. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon* 40, 2002. p.700.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899/2004, de 25 maio de 2003. Diário Oficial da União. Brasília. 2005.
- AOAC (2005). Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. Method 2005.06.
- APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for Examination of Water & Wastewater. 21st Edition. USA: Baltimore, Maryland, 2005.
- BARROS, M. U. G. Prospecção de *Cylindrospermopsis raciborskii* em reservatórios no ceará e efeitos da depleção de nutrientes na sua concentração celular. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2013, p.100.
- CAGECE - Companhia de Água e Esgoto do Ceará -. Comunicação Pessoal, 2013.
- CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetoneitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova* 36 (8), 2013, p. 1208-1213.
- CEFAS. Refinement and in-house validation of the AOAC HPLC method (2005.06): the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in mussels by liquid chromatography and fluorescence detection. Final report. 2008.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. New York and London.: E&FN Spon. 1999.
- DIENER, M.; ERLER, K.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; LUKAS, B. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *Eur Food Res Technol* 224: 2006, p.147-151
- EURLMB - European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins -Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Espanha, 2011.
- FALCONER, I. R. & HUMPAGE, A. R. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Bluegreen Algal) Toxins in Drinking Water. *International Journal of Environment Research and Public Health* 2, 2005, p. 43-50.
- FREITAS, M. S. (2007) Remoção de microcistina e Saxitoxinas por meio de oxidação com hipoclorito de sódio: avaliação em escala

- de bancada. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, p. 107.
- HALME, M.; RAPINOJA, M. L.; KARJALAINEN, M.; VANNINEN, P. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* 880, 2012, p. 50-57.
- HARA, Y.; DONG, J.; UEDA, H. Open-sandwich immunoassay for sensitive and broadrange detection of a shellfish toxin gonyautoxin. *Analytica Chimica Acta* 793, 2013, p. 107- 113.
- HE, H.Z.; LI, H.B.; JIANG, Y.; CHEN, F. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in cultured microalgae by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* 383: 2005, p.1014–1017
- HUMPAGE, A.R.; MAGALHAES, V.F.; FROSCIO, S.M. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poison toxin. *Anal Bioanal Chem* 397, 2010, 1655-1671.
- INDRASANA, W.M. & GILL, T.A.,. Thermal degradation of partially purified paralytic shellfish poison toxins at different times, temperatures, and pH. *Journal of Food Science* 65 (6), 2000, 948-953.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DQOCCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Coordenação Geral de Acreditação. Rio de Janeiro, 2010.
- LAWRENCE, J.F.; NIEDZWIADK, B.; MENARD, C. Quantative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 88, 2005, p. 1714-1732.
- LOPES, I. K. C. Identificação de cianobactérias produtoras de Saxitoxinas em reservatório de usos múltiplos no semiárido cearense. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental) – Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA), Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2013.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Brasília, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Portaria nº 2914/2011. Brasília, 2011.
- MONDARDO, R. I. Avaliação da filtração em margem como pré-tratamento à filtração direta descendente na remoção de células de cianobactérias e Saxitoxinas. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis - SC, Brasil, 2009.
- OSHIMA, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal AOAC International* 78, 1995. p. 528 – 532.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27, 2004, p. 771 - 780.
- SILVINO, L.S. & CAPELO-NETO, J. Validation of analytical method for saxitoxin detection (STX and dc-STX) by high performance liquid chromatography with fluorescence detector and pre-column derivation. *Revista AIDIS* 7 (3):. 2014, 243-258.
- SIVONEN, K. & JONES, G. Em Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I.; Bartram, J., eds., CRC Press: London, 1999, cap. 3.
- TURNER, A.D.; NORTON, D.M.; HATFIELD, R.G.; MORRIS, S.; REESE, A.R.; ALGOET, M.; LEES, D.N. Refinement and extension of AOAC method 2005.06 to include additional toxins in mussels: single laboratory validation. *Journal AOAC International* 92: 2009, 190–207
- YOUNG, W. J. & STEINER E. H. Statistical Manual of the AOAC – Association of Official Analytical Chemistry, AOAC International: Arlington, 48, 1975, p. 88. ZHANG, R.; ZHANG, C.; YANG, X.; QIN, X.; LIN, H.; ZHAO, Y. A novel method for preparing complete antigens of gonyautoxin 2,3 and their feature of immunogenicity. *Toxicon* 68, 2013, p. 24–29.