

## VII-070 - NOVA METODOLOGIA LIVRE DE ACETONITRILA PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

**Paulo Wagner Pereira Antunes<sup>(1)</sup>**

Bioquímico pela Universidade Federal de Viçosa. Doutorando em Engenharia Ambiental na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

**Sérvio Túlio Alves Cassini<sup>(1)</sup>**

Biólogo (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 1975), PhD Microbiologia pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSSU), EUA (1988), Pós Doutorado em Microbiologia Ambiental pela Universidade do Tennessee – EUA (1997), Professor Adjunto da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Pesquisador responsável pelo Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES.

**Georgette Cristina Salvador Lázaro**

Bióloga (Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Licenciatura em 2007 e Bacharelado em 2008) e Tecnóloga em Saneamento Ambiental (Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, 2008). Mestranda em Engenharia Ambiental (UFES). Pesquisadora do Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES e Laboratório de Fitoplâncton (LabFito) da UFES.

**Regina Keller**

Bióloga (Universidade Estadual do Rio de Janeiro- UERJ). Mestre em Bioquímica (Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ). Doutora em Microbiologia com especialização em Virologia (Universidade Paris VII França).

**Ricardo Franci Gonçalves,**

Engenheiro Sanitarista (Universidade Estadual do Rio de Janeiro- UERJ), D.Ing. Tratamento de águas Toulouse, França. Professor Associado Universidade Federal do Espírito Santo

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Fernando Ferrari, 514 – Goiabeiras – Vitória – ES – CEP: 29.075-910 – Brasil – Tel: (27) 4409-2165 – email: [wpantunes@yahoo.com.br](mailto:wpantunes@yahoo.com.br)

### RESUMO

A modificação dos ambientes aquáticos pelo acúmulo excessivo de nutrientes liberados pelos diversos processos antropogênicos, têm feito com que florações de cianobactérias sejam cada vez mais comuns. A toxina liberada por estes microrganismos representa um risco potencial à saúde humana. Utilizando a microcistina como uma cianotoxina padrão para os estudos de florações, a Legislação Brasileira definiu um limite máximo de  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ , como concentração máxima de microcistinas em águas de abastecimento. A quantificação de microcistinas pode ser realizada por métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Usualmente, os métodos de CLAE utilizam acetonitrila (ACN) acidificada com ácido trifluoracético (TFA) como fase móvel. O uso da ACN permite uma quantificação segura de microcistinas tanto em amostras laboratoriais quanto ambientais. A instabilidade no preço e na capacidade de abastecimento de acetonitrila a nível analítico impulsionou, nos últimos anos, pesquisas de viabilidade do uso de solventes orgânicos alternativos nos métodos cromatográficos.

Seguindo as tendências mundiais, a pesquisa visa validar um método utilizando o metanol como fase móvel. As análises iniciais permitiram padronizar uma metodologia eficiente na separação das diferentes variantes de microcistinas (-RR, -LA e -LR) testadas. O gradiente crescente de metanol (30 a 85%), ao fluxo de  $0,200 \text{ mL.min}^{-1}$ , demonstrou-se eficiente na quantificação das variantes, com valores de coeficiente de correlação lineares acima de 0,99. Além disso, os limites de detecção ( $0,07$  a  $0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e os limites de quantificação ( $0,023$  a  $0,87 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ficaram abaixo do valor limite de microcistinas equivalente  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

**PALAVRAS-CHAVE:** Microcistinas, cromatografia líquida, metanol, validação.

## INTRODUÇÃO

A análise de microcistinas realizadas por cromatografia líquida invariavelmente utilizam acetonitrila (ACN) acidificada com ácido trifluoracético (TFA) como fase móvel. O uso da ACN permite uma quantificação segura de microcistinas tanto em amostras laboratoriais quanto ambientais. Entretanto uma recente escassez global de ACN impôs limitações nas análises por CLAE e resultou na necessidade de se padronizar e validar métodos, baseados em solventes orgânicos alternativos, como uma alternativa viável para as análises cromatográficas de microcistinas.

No final de 2008, a disponibilidade de ACN diminuiu em todo o mundo por diferentes razões, principalmente pela crise econômica mundial que reduziu a demanda por produtos a base destas fibras e resinas. O preço da ACN para fins analíticos chegou a custar 5 vezes mais na Europa, no início de 2009, e o fornecimento chegou a reduzir 80%. Embora seja difícil uma nova combinação de fatores que gere uma queda tão brusca na demanda de ACN, como ocorrido em 2008, é necessário lembrar que o volume deste solvente é gerado mundialmente devido à produção de produtos por um ramo industrial sujeito a crises e/ou retrações.

Outra preocupação quanto ao uso da ACN, está relacionada aos prejuízos potenciais à saúde humana. A acetonitrila é prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal, pela pele e pelos pulmões, distribuindo-se rapidamente por todo o corpo, podendo causar efeitos sistêmicos, devido a sua degradação a cianeto, um forte inibidor da cadeia respiratória.

Estudos citam uma série de solventes alternativos que podem ser utilizados nas análises cromatográficas, dentre eles o metanol. A força orgânica do metanol é menor quando comparada com a acetonitrila. Análises cromatográficas, que utilizam colunas C18, como nos testes de detecção de microcistinas, esta menor força orgânica do metanol é responsável por um aumento na pressão do sistema e exige uma maior concentração na fase móvel para a eluição.

O metanol também possui potencial toxicológico à saúde humana. Contatos por pele, ingestão ou inalação podem desenvolver efeitos adversos semelhantes à acetonitrila, porém quando comparado os níveis de exposição ocupacional, a concentração letal de metanol é cerca de 2 vezes mais alta (1.500 a 2.000 mg/m<sup>3</sup>.h). Os efeitos crônicos da inalação também são menores. O limite de exposição ocupacional recomendado para turnos de 8 horas é de 260mg/m<sup>3</sup> de metanol dissolvido no ar. Este valor é mais de 3 vezes a concentração média de acetonitrila recomendada para se evitar qualquer efeito tóxico sobre o sistema ocular ou nervoso.

Seguindo as tendências mundiais, o projeto apresenta uma proposta de validação de um método utilizando o metanol como fase móvel. O objetivo principal é padronizar uma metodologia eficiente na purificação de diferentes variantes de microcistinas, para validar o método para análise de microcistinas em amostras ambientais por CLAE.

O trabalho está sendo realizado em duas etapas. Na primeira etapa, realizou-se a padronização da condição de eluição mais eficiente para as variantes -RR, -LR e -LA, de microcistinas. Utilizando uma curva de calibração com concentrações de microcistina entre 0,25 e 4,0 µg.mL<sup>-1</sup>, diluídas em metanol, observou-se uma linearidade entre a área dos picos e as concentrações referentes à cada uma das variantes de microcistinas avaliadas. Definida a condição de eluição mais eficiente, os parâmetros de validação segundo o INMETRO estão sendo avaliados, em uma segunda etapa, por meio da utilização de amostras ambientais de lagos e lagoas da Grande Vitória.

Dentre as condições avaliadas, a eluição em TFA 0,1%, com gradiente crescente de metanol (30 a 85%), ao fluxo de 0,200 mL.min<sup>-1</sup> demonstrou ser a mais eficiente e portanto está sendo utilizada para a definição dos parâmetros de validação de método analítico segundo metodologia do INMETRO.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As diferentes variantes de microcistinas (M cyst) utilizadas no estudo foram M cyst-RR (cód.M1537-25UG), -LR (cód.33893), e -LA (cód.M4194-100UG). Todas as variantes testadas foram adquiridas da SIGMA-ALDRICH. As soluções estoque de M cyst foram diluídas em metanol, filtrados em membrana Millex PTFE (0,22µm; 13mm; MILLIPORE CORPORATION) e armazenados em vials, em freezer a -20°C.

O sistema cromatográfico utilizado foi o modelo SHIMADZU CBM-20A, com degaseificador DGU-20AS, bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, forno CTO-20A. Os solventes utilizados foram filtrados em membranas de PTFE (0,45 $\mu$ m; 47mm, MILLIPORE CORPORATION) e degaseificadas em banho de ultrassom (LIMPSONIC®). A coluna analítica de fase reversa utilizada foi a C18 KINETEX 2,6 $\mu$  100A, 2,10 x 100 mm (PHENOMENEX). A temperatura da coluna foi mantida a 37°C. O volume de injeção foi de 30  $\mu$ L e a detecção realizada por detectores de arranjo de diodos - PDA (SPD-M20A) em espectro de 238 nm. A curva de calibração foi obtida com concentrações de microcistinas entre 0,25 e 4,0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. A melhor condição de eluição das variantes de microcistinas ocorreu em TFA 0,1%, com gradiente crescente de Metanol (30 a 85%), ao fluxo de 0,200 mL.min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas obtidos a partir do gradiente representado na Tabela 01 foram analisados em 238 nm com o software LC SOLUTION (SHIMADZU CORPORATION).

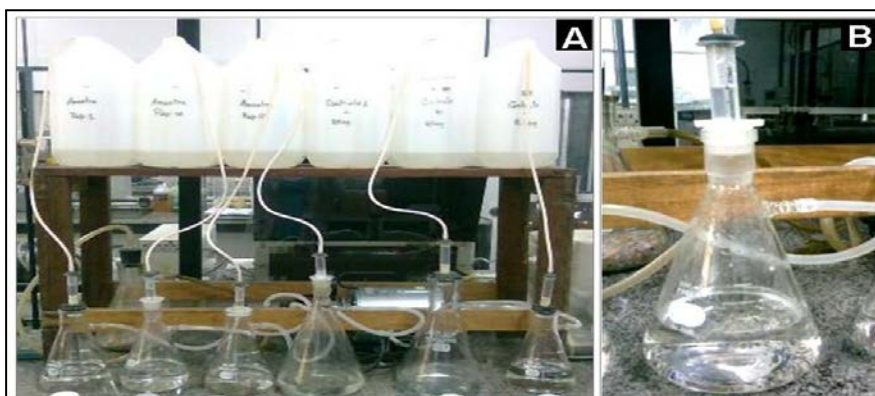
**Tabela 01: Condições de gradiente crescente a 0,200 mL.min<sup>-1</sup> utilizado para análise de microcistinas por CLAE. O solvente A foi TFA 0,1% e o solvente B foi Metanol.**

	TEMPO (min)				
	0	5	20	21	50
SOLVENTE A (%)	70	75	85	70	70
SOLVENTE B (%)	30	25	15	30	30

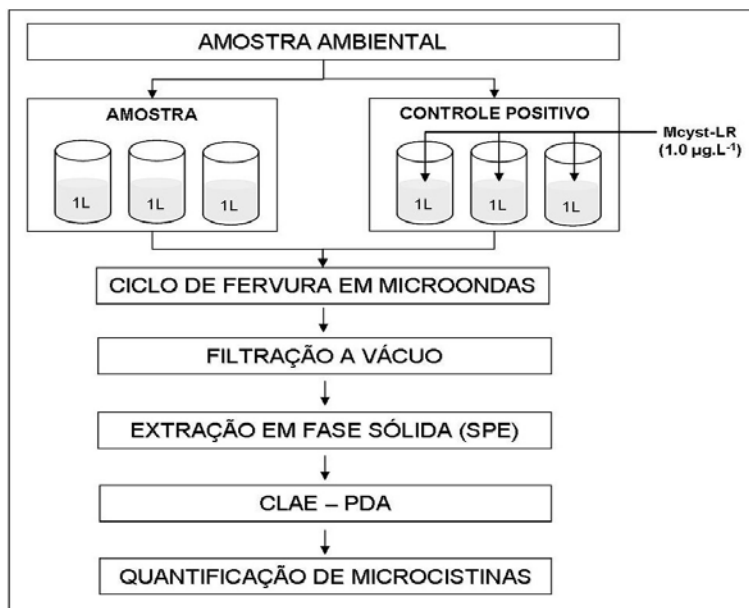
O ensaio de linearidade foi realizado com a construção da curva de calibração analítica com cinco concentrações de variantes de microcistinas: 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, a partir de diluições dos padrões: Mcyst-RR, Mcyst-LR e Mcyst-LA. A linearidade foi definida por análise de regressão linear da relação entre a área do pico e a concentração de toxina, sendo calculada a equação da regressão linear, o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo y ( $\beta$ ), coeficiente angular ( $\alpha$ ) e o erro padrão da média.

O parâmetro de recuperação será avaliado adicionando concentrações diferentes de Mcyst-LR (0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) à matriz. A matriz utilizada no estudo estava sendo amostras de água da lagoa da UFES, aos baixos níveis de recuperação, esta etapa será realizada com amostras de água do Reservatório de Água de Duas Bocas (Cariacica-ES). A avaliação em triplicata utiliza como matriz branca, amostras de água sem adição da toxina. Já os valores de concentração de toxina adicionados estão sendo relacionados com os valores quantificados pelo método, para a determinação do fator de recuperação e dos demais parâmetros de validação. Da mesma forma, 8 repetições da concentração alvo de Mcyst-LR (1,0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) serão utilizadas para a determinação da repetitividade do método.

Amostras ambientais coletadas na subsuperfície de duas lagoas e de um reservatório de abastecimento da Grande Vitória em frascos de polietileno (1,0L) estão divididas em dois tratamentos. O primeiro, denominado de amostra, trata-se da água bruta, na qual será quantificada a presença de microcistinas, pelo método desenvolvido. E o outro tratamento, em que se adiciona solução padrão de microcistina-LR à amostra coletada, denomina-se controle positivo. Após a divisão dos tratamentos, as amostras são submetidas ao processo de extração em fase sólida, utilizando cartuchos tipo SPE-Solid Phase Extraction (C18ec, 6mL, 500mg, CHROMABOND®), sob fluxo de 0,200 mL.min<sup>-1</sup> (Figura 01) e a quantificação em CLAE, segundo o fluxograma da figura 02.



**Figura 01: (A) extração em fase sólida dos tratamentos Amostra Padrão e Controle Positivo. (B) amostra percolando o cartucho de extração.**

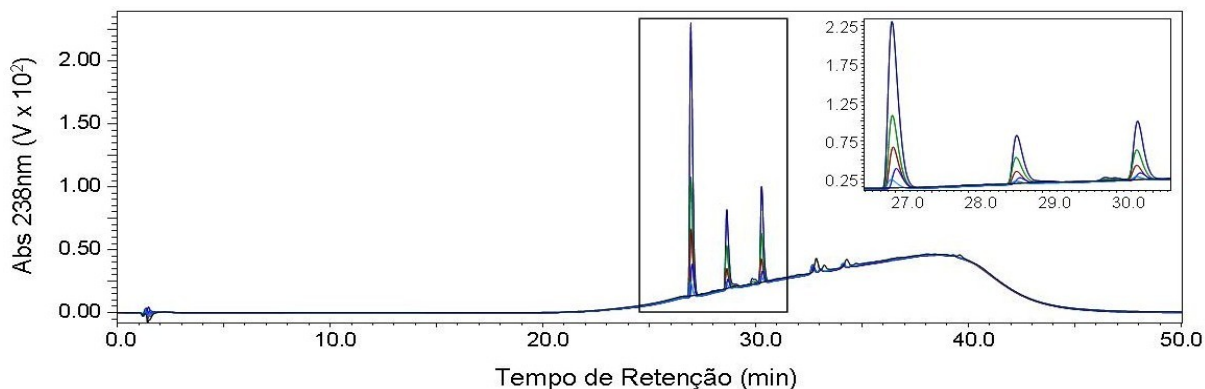


**Figura 02:** Fluxograma do procedimento adotado para as análises de Mcyst-LR em amostras ambientais.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

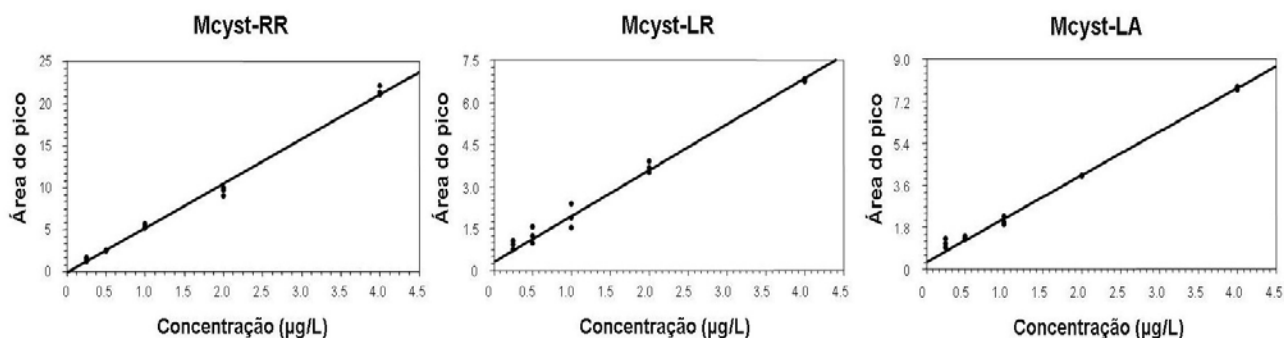
Diferentes estudos demonstram a alta eficiência da separação das variantes de microcistinas em CLAE. Seja utilizando métodos isocráticos ou em gradiente, a maioria dos procedimentos incluem o uso do gradiente de acetonitrila acidificada com ácido trifluoracético (TFA) como fase móvel. Porém a partir de 2008, a disponibilidade global de acetonitrila sofreu uma alta redução, impondo limitações a inúmeros procedimentos nos estudos químicos e das ciências da vida, dentre os quais, as análises de microcistinas em CLAE. Essa escassez resultou na necessidade de desenvolvimento de métodos eficientes e viáveis de análises de microcistinas em CLAE, que não exigem o uso de acetonitrila.

Os experimentos da primeira parte demonstraram que as condições de gradiente crescente de Metanol ao fluxo 0,200 mL.min<sup>-1</sup>, permite uma eficiente separação entre as variantes de microcistinas avaliadas, confirmando que esse solvente pode ser uma importante alternativa ao uso da acetonitrila nos processos de quantificação de microcistinas por CLAE. Com esta metodologia observou-se a eluição diferenciada para as três variantes da toxina. Os picos relativos a cada uma das variantes apresentaram uma alta absorvância em 238 nm e tempos de retenção bem distintos: Mcyst-RR (26 min), Mcyst-LR (28 min) e Mcyst-LA (30 min). Com relação à área, o perfil cromatográfico obtido demonstrou picos estreitos e bem definidos, característicos de uma alta eficiência na eluição e separação das variantes da toxina (Figura 03).



**Figura 03:** Perfil cromatográfico dos padrões Mcyst-RR (27 min), Mcyst-LR (28.5 min) e Mcyst-LA (30 min) nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

Os gráficos obtidos a partir da correlação entre as áreas dos picos cromatográficos (eixo y) e as concentrações crescentes de microcistina demonstraram alta linearidade na faixa de 0,25 a 4,0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 04). Desta forma, para cada uma das variantes, calculou-se a equação de regressão linear, o coeficiente de correlação linear (r) e o erro padrão da média. Os valores calculados demonstraram alta porcentagem de correlação (> 0,99), atendendo aos requisitos de linearidade exigidos pelo INMETRO. O ensaio de linearidade permitiu o cálculo de limites de detecção e quantificação e o intervalo ou faixa linear do método refere-se ao limite de quantificação até a concentração máxima da linearidade igual 4,0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Tabela 02).



**Figura 04:** Gráficos de linearidade entre a concentração das variantes (-RR, -LR e -LA) de microcistinas e a área do pico correspondente dos perfis cromatográficos de CLAE.

**Tabela 02:** Parâmetros do ensaio de linearidade obtido para as três variantes de microcistinas: equação de regressão linear, coeficiente angular ( $\alpha$ ), intersecção com o eixo y ( $\beta$ ), coeficiente de correlação (r) e erro padrão da média (s), limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ).

Parâmetros	Mcyst-RR	Mcyst-LR	Mcyst-LA
Equação da reta	$y = 5,292x - 0,084$	$y = 1,637x + 0,317$	$y = 1,860x + 0,315$
Coeficiente angular ( $\alpha$ )	5,292	1,637	1,860
Intersecção com o eixo y ( $\beta$ )	-0,084	0,317	0,315
Coeficiente de correlação (r)	0,998	0,994	0,996
Erro padrão da média (S)	0,529	0,269	0,235
Limite de Detecção (LD) ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0,07	0,26	0,08
Limite de Quantificação (LQ) ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0,23	0,87	0,26

A utilização do sistema de CLAE requer o preparo prévio da amostra, ou seja, é necessária uma etapa de concentração e purificação das amostras antes de serem submetidas à cromatografia. Nesse estudo pretende-se utilizar a extração em fase sólida (SPE) para a concentração das amostras ambientais e para eliminar contaminantes da matriz. Como esta etapa é um processo de extração que envolve interação química, se faz necessário o cálculo do fator de recuperação para diferentes concentrações do analito dissolvido em uma matriz ambiental. A obtenção do valor médio de recuperação associado a cálculo de precisão são importantes para a validação do método.

## CONCLUSÕES

Os parâmetros de validação analisados até o presente momento demonstram que a linearidade apresenta-se de acordo com os requisitos do INMETRO para a validação de métodos analíticos. E os limites de detecção e quantificação possuem valores abaixo da referência máxima permitida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que estabelece o limite de microcistinas equivalente 1,0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Testes de recuperação estão sendo desenvolvidos com matriz ambiental, para promover a validação completa do uso do metanol na detecção e quantificação de microcistinas por meio de CLAE. Para definir os parâmetro de recuperação e presição do método proposto, iniciamos um estudo de monitoramento com relação à presença



de microcistinas em amostras de águas de duas lagoas e de um lago, que é utilizado como reservatório de abastecimento para a região da Grande Vitória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. (2002). Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. *Analytica Chinica Acta*. n.466, p.213-231.
2. MERILUOTO, J.; CODD, G.A. (2005). *TOXIC : cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Abo: Abo Akademi University Press. v.65. n.1. 164p.
3. MOUNTFORT, D.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. (2005). Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. *Toxicon*. v.45. p.199-206.
4. ALBUQUERQUE JÚNIOR, E.C.; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. (2006). Use of solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [D-Leu1]MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*. v. 52, n. 1, p.1-9.
5. HASHIMOTO, K.; MORIMOTO, K.; DOBSON, S. (1993). *Environmental Health Criteria for Acetonitrile*. World Health Organization Library.
6. FISHBEIN, L. (1997). *Environmental Health Criteria for Methanol*. World Health Organization Library.
7. BRASIL (2003b). INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. 36p.
8. HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E&FN Spon, p.369-405, 1999).
9. LAWTON, L.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. Extraction and high-performance liquid chromatography method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, v.119, p. 1525-1530, 1994.
10. PURDIE, E.L.; YOUNG, F.M.; MENZEL, D.; CODD, G.A. A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase. *Toxicon*, p.1-4, 2009.