

REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO DE SAXITOXINAS (STX E dc-SXT) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA E DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA

Larissa Sousa Silvino¹
*José Capelo-Neto²

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR SAXITOXIN DETECTION (STX AND dc-STX) BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTOR AND PRE-COLUMN DERIVATION

Recibido el 28 de enero de 2014; Aceptado el 11 de septiembre de 2014

Abstract

The method of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC- FLD) and pre-column derivation was validated for the detection and quantification of saxitoxin (STX) and decarbamoil - saxitoxin (dcSTX) provided from an axenic strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. The previously mentioned validation was performed in order to give credibility to analytical method. To that end, it was used parameters, such as selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, precision and robustness to ensure the quality of the method. The results showed good selectivity, demonstrating that the method had the ability to measure the toxins in an array even in the presence of other components. The linearity presented a correlation coefficient (r) greater than 0.999 for STX and dc- STX in a working range of 4.5 to 150 mg L⁻¹ for STX and 3.0 to 132 mg L⁻¹ to dcSTX, showing that the method has the capacity to deliver results directly proportional to the concentration of detected analyte. The method's sensitivity was measured by LOD and LOQ, obtaining satisfactory results for the type of analysis performed. As permitted by the legislation, the method obtained a good precision and accuracy for the toxins studied at different levels of concentration and also proved robust, since it was insensitive to small variations that could occur during the analysis.

Key Words: HPLC, Saxitoxins, Analytical method validation.

¹ Companhia de Água e Esgoto do Ceará, Brasil

² Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Brasil

*Autor correspondente: José Capelo-Neto: Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará. Bloco 713, 1.º Andar, Centro de Tecnologia, CEP 60451-970 – Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Email: zecapelo@hotmail.com

Resumo

O método de cromatografia líquida de fase reversa com detector de fluorescência (CLAE-FLD) e derivatização pré-coluna foi validado para detecção e quantificação das cianotoxinas saxitoxina (STX) e decarbamoil-saxitoxina (dc-STX) proveniente do cultivo da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. Esta validação foi realizada para dar credibilidade ao método analítico e utilizou os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez para assegurar a qualidade do método. Os resultados obtidos apresentaram boa seletividade, comprovando que o método possuía capacidade de medir as toxinas em uma matriz na presença de outros componentes. A linearidade apresentou um coeficiente de correlação (r) maior que 0.99 para STX e dc-STX em uma faixa de trabalho de 4.5 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para STX e 3.0 a 132 $\mu\text{g L}^{-1}$ para dc-STX, mostrando que o método tem a capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos detectados. A sensibilidade do método foi medida através do LD e LQ, obtendo resultados satisfatórios para o tipo de análises realizadas. O método obteve boa precisão e exatidão, visto que para STX e dc-STX os diferentes níveis de concentração estavam com valores dentro dos intervalos permitidos pela legislação, e apresentou-se robusto, pois foi insensível a pequenas variações possíveis de ocorrer durante a análise.

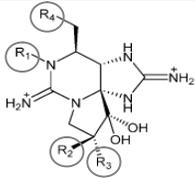
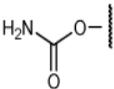
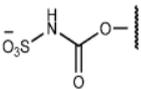
Palavras chave: CLAE, Saxitoxinas, Validação de método analítico.

Introdução

Ecosistemas ricos em nutrientes (nitrogênio e fósforo), com condições ideais de temperatura e pH, entre outras características, favorecem a floração de algas e cianobactérias, que atuam ocasionando sérias alterações ambientais, como a modificação das suas características organolépticas, aumento da matéria orgânica e liberação de cianotoxinas, devido à lise celular das cianobactérias. Isso pode implicar em danos à saúde pública, como lesar o fígado (hepatotoxinas), o sistema nervoso (neurotoxinas), ou irritação na pele (dermatotoxinas) (Chaves, *et al.*, 2009; Ferrão Filho, *et al.*, 2009)

Neste contexto, as neurotoxinas, mitilotoxina ou saxitoxinas (veneno paralisante de moluscos), também chamadas de “paralisante” podem causar fortes efeitos no sistema nervoso (Barbieri, 2009). Segundo Wiese (2010) são conhecidas cerca de 57 toxinas paralisantes com propriedades químicas semelhantes às da saxitoxina (STX), algumas delas mostradas na Tabela 1. As saxitoxinas podem ser identificadas como causadoras de sintomas de intoxicação quando, em humanos, apresentarem: adormecimento da boca e das extremidades, sensação de queimadura na boca e garganta, vertigem, vômito, sede, fraqueza, perda da coordenação motora, paralisia muscular e respiratória, além de taquicardia (Cunha, 2004).

Tabela 1. Estrutura química da STX e seus análogos

Toxinas cabamato	Toxinas N sulfocarbamoil	Toxinas decarbamoil			
		OH			
R4	R4	R4	R1	R2	R3
STX ^a	GTX ^b	dc-STX ^c	-H	-H	-H
GTX2	C1	dc-GTX2	-H	-H	-OSO ₃ ⁻
GTX3	C2	dc-GTX3	-H	-OSO ₃ ⁻	-H
NEO	GTX6	dc-NEO	-OH	-H	-H
GTX1	C3	dc-GTX1	-OH	-H	-OSO ₃ ⁻
GTX4	C4	dc-GTX4	-OH	-OSO ₃ ⁻	-H
11α-OH-STX			-H	-H	-OH
11β-OH-STX			-H	-OH	-H

^aSTX – saxitoxina; ^bGTX – goniautoxinas; ^cdc-STX – decarbamoilsaxitoxinas.

Há diversos relatos na literatura de intoxicações por cianotoxinas. Em 1996, ocorreu em Caruaru (PE) um caso chamado de “Síndrome de Caruaru”. Este foi o primeiro caso relatado no Brasil de intoxicação fatal com cianotoxinas. Através da utilização de uma fonte de água contaminada por microcistina e cilindrospermopsina, 61 pacientes vieram a falecer após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise (Azevedo, 1996; Jochimsen, *et al.*, 1998).

Este acontecimento contribuiu para a inclusão das cianotoxinas nos padrões de potabilidade brasileiros. Com isso, a Portaria n° 2914/2011 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004) obriga a análise de microcistina e saxitoxina em água potável, adotando um limite de concentração de 1.0 µg L⁻¹ de microcistina e 3.0 µg equivalente L⁻¹ de saxitoxina.

A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* tem um alto potencial na produção de saxitoxinas, e, portanto, torna-se necessário o seu monitoramento e controle nos sistemas aquáticos. Ela tem sido observada em reservatórios de abastecimento público desde a região Nordeste até a região Sul do país, além de ter sido relatada sua ocorrência em diversas partes do mundo (Barros, 2013; Azevedo e Brandão, 2003).

Por outro lado, os métodos de determinação de toxinas não estão totalmente consolidados na literatura, sobretudo os métodos cromatográficos. Para dar uma luz nesta lacuna Boucaina *et al.* (1998) estudaram três tipos de métodos utilizados para a detecção e quantificação de toxinas: o método biológico, bioquímico e físico-químico (cromatográfico). Como há uma tendência na comunidade científica de abolir a utilização de mamíferos em teste de toxicidade, o método físico-químico usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) torna-se uma alternativa para substituir o método de bioensaio (método biológico) (Levin, 1992).

O método físico-químico mais comumente utilizado é a cromatografia líquida de fase reversa com detecção por fluorescência (CLAE-FLD). Como as saxitoxinas não apresentam absorção de UV específico nem de fluorescência necessárias para sua detecção, é fundamental a conversão oxidativa de saxitoxinas a derivados fluorescentes. As toxinas podem ser derivatizadas em substâncias florescentes antes da separação na coluna cromatográfica – Derivatização pré-coluna (Lawrence e Niedzwiadek, 2001) ou pós-coluna (Oshima, 1995).

O método de quantificação das saxitoxinas utilizando CLAE-FLD com derivatização pré-coluna é particularmente atrativo, uma vez que a reação é simples, requerendo apenas periodato diluído ou peróxido a pH fracamente básico. Os reagentes não possuem fluorescência e, portanto, não interferem na detecção dos produtos (Lawrence e Scott, 1995) e a configuração instrumental é fácil devido à simplicidade.

Entre os métodos descritos na literatura para a determinação de saxitoxinas utilizando CLAE-FLD, há o método aprovado como oficial pela Comissão Europeia para a detecção e quantificação de várias saxitoxinas por derivatização pré-coluna (AOAC, 2005). Entretanto, este método foi validado apenas para extratos de mariscos (Cefas, 2008). No entanto, não há relatos de validação do método para análise de saxitoxinas por derivatização pré-coluna em amostras de água de reservatórios artificiais utilizados para abastecimento público.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo a validação da metodologia de detecção e quantificação das cianotoxinas saxitoxina (SXT) e decarbamoil-saxitoxina (dc-STX) por CLAE-FLD com derivatização pré-coluna em uma matriz que simulava uma água contendo saxitoxinas após o processo de filtração em estações de tratamento de água para abastecimento público. Esta matriz foi sintetizada a fim de realizar posteriores estudos de adsorção em carbono ativado, simulando um tratamento real para água para abastecimento público.

Metodologia

Toxinas

Neste estudo, a validação do método de detecção de toxinas foi desenvolvida para as cianotoxinas SXT e dc-STX. A cianobactéria utilizada para a produção destas toxinas foi a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, cepa T3. Ela foi isolada no ano de 1996, na represa de Bilings no estado São Paulo e cedida pela Dra. Sandra Azevedo, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para o seu cultivo na Seção Laboratorial de Qualidade de Água - SELAQUA da Universidade Federal de Ceará. Os padrões STX e dc-STX foram adquiridos no *Institute for Marine Bioscience, National Research Council* em Halifax, Canadá.

Cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 e extração do conteúdo intracelular

Para o crescimento e acúmulo da biomassa da cepa T3, o cultivo ocorreu em um meio ASM-1, com pH ajustado para 8, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade de aproximadamente $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para a luz branca de 470 nm. Ao atingir a fase exponencial de crescimento, após 15 a 18 dias de cultivo aproximadamente, foram realizados repiques da cultura para volumes maiores. No último repique, a cultura permaneceu em um recipiente de vidro de 2 litros com aeração constante utilizando um compressor de ar, segundo metodologia utilizada por Barros (2013). Para a concentração da biomassa, após aproximadamente 25 dias do último repique, dois litros da cultura foram homogeneizados e transferidos para tubos de centrifuga de 15 mL. A centrifugação ocorreu durante 10 minutos a 4000 rpm, em seguida descartou-se o sobrenadante, acumulando-se aproximadamente 15 mL da biomassa contida nos fundos dos tubos, sendo doravante denominada de Extrato T3. Ajustou-se o pH do Extrato T3 para 4 utilizando ácido acético $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Após a acidificação, o Extrato T3 foi congelado e descongelado por três vezes consecutivas para promover a lise das células, ou seja, o rompimento da membrana celular, e a solubilização das toxinas. O Extrato T3 foi então filtrado em microfiltro de fibra de vidro (Macherey-Nagel, porosidade $0.7 \mu\text{m}$) e armazenado a -20°C até sua utilização.

Extração das toxinas

Para remoção da matéria orgânica e extração do analito, o Extrato T3 passou por um sistema de filtração a vácuo utilizando um papel filtro (J Prolab, porosidade $14 \mu\text{m}$) e, em seguida, por outro sistema de filtração utilizando um microfiltro fibra de vidro (Macherey-Nagel, porosidade $0.7 \mu\text{m}$) acoplado a uma seringa.

Posteriormente, foi utilizado um cartucho de extração SPE C18 de 3mL (Supelco), previamente condicionado com 6 mL de metanol seguido por 6 mL de água. Após o condicionamento, 1 mL do Extrato T3 filtrado foi percolado no cartucho através da aspiração utilizando um sistema a vácuo (*Primatec*, modelo 131) com pressão relativa de até 500 mmHg. Após todo o Extrato T3 ter percolado no cartucho, a toxina retida nele foi eluída e coletada utilizando 2 mL de água deionizada, denominando-se essa amostra de Extrato T3 pós-extração.

Derivatização pré-coluna das toxinas STX e dc-STX

A metodologia empregada para derivatização e quantificação das toxinas STX e dc-STX foi baseada na derivatização pré-coluna desenvolvida por Lawrence e Niedzwiadek (2001), através da qual é realizada a oxidação das toxinas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para a detecção por fluorescência.

Em um vial de vidro (1.5 mL) adicionou-se 250 μL de NaOH 1 mol L^{-1} e 25 μL de H_2O_2 aquoso 10 % (m/v). Em seguida, 100 μL da solução padrão ou do Extrato T3 pós-extração também foram adicionados. Misturou-se a solução manualmente durante 2 minutos à temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e, posteriormente, 20 μL de ácido acético concentrado foram adicionados e misturados com a solução reagente. Desta solução, uma alíquota de 20 μL foi analisada por CLAE.

Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para a quantificação das toxinas também foi baseada no método desenvolvido por Lawrence e Niedzwiedek (2001) com algumas modificações. Foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo *Agilent Technologies* modelo *1260 Infinity*. O sistema consistia de quatro reservatórios para a fase móvel, uma bomba de alimentação da fase móvel, um injetor de amostra (*loop* de 20 μL), uma coluna de fase reversa (Phenomenex C18, 150 mm x 4.6 mm d.i.; 4 μm de tamanho de partícula.) a qual foi mantida a 30 $^\circ\text{C}$, um detector de fluorescência (*Agilent Technologies* modelo *1260 Infinity*) e um microcomputador ligado a todo o sistema para coleta e processamento dos dados. A fase móvel (A e B) 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 minutos de 0 a 20 % da fase móvel B, passando posteriormente, nos 3.5 minutos seguintes, de 20 a 80 % da fase móvel B e terminando nos 2 últimos minutos em 100 % da fase móvel A. O volume de amostra injetado foi de 20 μL , o fluxo do eluente foi de 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o detector foi ajustado para os comprimentos de onda de 340 nm em excitação e 390 nm em emissão e o tempo total de cada corrida foi de 13 minutos.

Validação do método analítico

A validação da metodologia foi realizada para a matriz do Extrato T3 pós-extração através dos testes de seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. O método foi validado de acordo com critérios estabelecidos pela Resolução RE nº 899, de 29/5/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), pelo documento de referência DOQ-CGCRE - 008: Orientação sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2010) e por literatura pertinente (Ribani *et al.*, 2004; Lanças, 2009):

Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, verificou-se se as curvas analíticas eram paralelas, uma realizada através do método de adição de padrão (STX ou dc-STX com superposição da matriz) e a outra utilizando-se o método de padronização externa (STX ou dc-STX sem superposição da matriz). Utilizou-se o método de adição de padrão para avaliar a seletividade já que a matriz, Extrato T3 pós-extração, não era ausente dos analitos em questão (STX e dc-STX).

A curva analítica foi construída relacionando a quantidade da toxina adicionada à amostra com a resposta de detecção (área do pico). Elas foram obtidas com cinco pontos de concentração. As amostras foram analisadas em triplicata e cada uma foi injetada duas vezes.

Linearidade

A linearidade foi avaliada pelos valores dos coeficientes de correlação das curvas de calibração, feitas com 9 concentrações diferentes para cada toxina, variando a STX de 4.5 a 150.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e dc-STX de 3.0 a 132.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando água ultrapura como solvente. Cada amostra foi injetada duas vezes para uma mesma curva analítica sendo esta realizada em triplicata. A análise de correlação linear foi feita utilizando o método dos mínimos quadrados, sendo a equação da reta obtida.

Limites de detecção e quantificação

Quanto ao limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram analisadas amostras com baixa concentração do analito, preparadas através do método de padronização externa. O método utilizado para determinar o LD e LQ envolveu a relação sinal-ruído, onde, para o LD, o sinal da menor concentração do analito foi 3 vezes maior do que o ruído (N) do sistema, ou seja, $\text{LD} = 3\text{xN}$. Para o LQ, o sinal da menor concentração do analito foi 10 vezes maior do que o ruído (N) do sistema, ou seja, $\text{LQ} = 10\text{xN}$.

Precisão

A precisão do método foi determinada em condições de repetitividade e precisão intermediária. Os testes foram realizados conforme a ANVISA (2003), onde os resultados partiram de nove determinações, com três níveis de concentrações e três repetições para cada nível, sendo as concentrações variando para STX de 4.48 a 13.44 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para dc-STX de 3.96 a 11.89 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada amostra foi injetada duas vezes, sendo posteriormente utilizada sua média.

Exatidão

No parâmetro de exatidão, foi utilizado o teste por adição de padrão, devido ao branco da matriz utilizada (Extrato T3 pós-extração) não ser ausente de STX e dc-STX. As concentrações dos padrões externos utilizadas na adição de padrão tinham 5 diferentes níveis, variando de 11.95 a 35.85 $\mu\text{g L}^{-1}$ para STX e 10.57 a 31.70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para dc-STX, e o teste foi realizado em triplicata.

Robustez

A robustez do método foi analisada através do teste de Youden e Steiner (1975), método recomendado pelo Inmetro (2010). Foram escolhidos sete parâmetros analíticos e induzidas pequenas variações nas condições nominais do método. Posteriormente, oito análises foram realizadas com o objetivo de determinar a influência de cada parâmetro no resultado final. A Tabela 2 apresenta os sete parâmetros analíticos utilizados, assim como as variações

introduzidas. As condições nominais das variáveis são representadas por letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F e G) e as condições com as variações alternativas são representadas por letras minúsculas (a, b, c, d, e, f e g).

Os sete parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em oito corridas cromatográficas, realizadas em uma ordem aleatória e os resultados das análises foram apresentados por letras de s a z.

Tabela 2. Parâmetros analíticos selecionados para a análise de robustez e suas respectivas variações

Variável	Condições nominais	Condições alternativas
A/a - Concentração da fase móvel	A – 0.10 M	a – 0.12 M
B/b - Estabilidade da solução de trabalho	B - Oxidar a amostra após diluição	b - Oxidar a amostra após 30 minutos da diluição
C/c - Temperatura da coluna	C – 30 °C	c – 33 °C
D/d – Agitação	D – Manual	d – Vortex
E/e - Tempo de injeção	E - Injetar a amostra após oxidação	e - Injetar a amostra após 15 minutos de ter oxidado
F/f - Tamanho da amostra	F - 100 µL	f - 110 µL
G/g - Tempo de oxidação	G - 2 minutos	g - 2:30 minutos

O teste Youden e Steiner (1975) foi realizado em triplicada sendo as concentrações das amostras analisadas para STX e dc-STX de 11.95 e 10.57 µg L⁻¹ respectivamente. Os resultados avaliados em cada combinação foram à área do pico e o tempo de retenção (TR).

Resultados

Validação do método

Seletividade

Conforme observado na Figura 1, pode-se afirmar que o método implementado para a análise de STX e dc-STX é seletivo, pois as curvas analíticas apresentaram-se paralelas, e, segundo Ribani (2004), quando as duas curvas analíticas forem paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz provocada por substâncias co-extraídas na determinação dos analitos.

Para confirmar a seletividade do método, utilizou-se a distribuição *t de Student* comparando os coeficientes lineares das curvas analíticas de cada toxina. Este teste avaliou a hipótese de que não existia diferença significativa entre as médias dos coeficientes lineares das curvas (hipótese nula), ou seja, as médias dos coeficientes lineares eram iguais, considerando o nível de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$). Os resultados novamente confirmaram a seletividade do método, pois, para as duas toxinas, o teste t apresentou valor de *p* acima de 0.05 e a hipótese nula foi aceita.

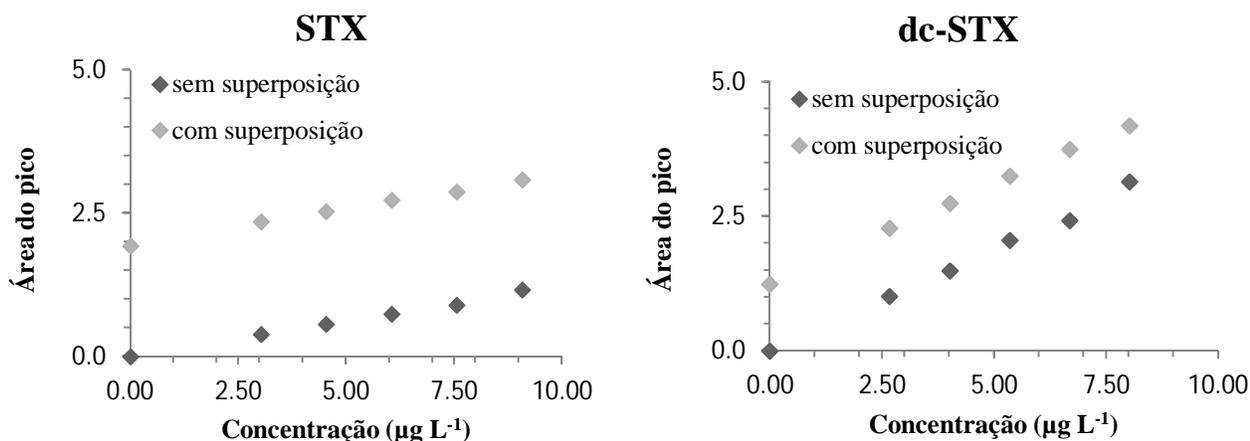


Figura 1. Curvas analíticas obtidas para STX e dc-STX por padronização externa sem superposição da matriz e padronização externa com superposição da matriz

Linearidade

Como o teste de seletividade mostrou que não havia efeito da matriz ou de possíveis interferentes na detecção das toxinas, não houve a necessidade do uso do método de superposição de matriz para quantificação das toxinas. Logo, foi escolhida a padronização externa sem superposição de matriz para fazer os demais testes de validação do método, devido este método ser menos trabalhoso do que o método por adição de padrão.

Quanto à linearidade do método, conforme a ANVISA (2003), as toxinas apresentaram uma ótima capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais às suas concentrações, com coeficiente de correlação maior que 0.999 para as duas toxinas (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados para seletividade e linearidade

Toxina	Seletividade		Linearidade	
	Valor P	Faixa da curva (µg L ⁻¹)	Eq. da reta	Coefficiente de correlação (r)
STX	0.81	4.5 à 150	$y = 0.0331x - 0.0982$	0.9997
dc-STX	0.17	3.0 à 132	$y = 0.0938x - 0.1405$	0.9999

Limites de detecção e quantificação

Levando-se em consideração que as amostras foram diluídas no processo de oxidação, as áreas dos picos presentes no cromatograma indicavam o limite de detecção e de quantificação do instrumento (LD_i e LQ_i). Os valores de limite de detecção e de quantificação do método (LD_M e LQ_M) foram obtidos após considerar a diluição sofrida pelas amostras.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram determinados através do método sinal-ruído. Este método mostrou-se funcional e os analitos apresentaram boa detectabilidade com LD_M de $2.53 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ_M de $3.45 \mu\text{g L}^{-1}$ para STX e LD_M de $1.83 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ_M de $2.24 \mu\text{g L}^{-1}$ para dc-STX.

A Tabela 4 compara o presente trabalho com estudos que também avaliaram o limite de detecção e quantificação da STX e dc-STX, porém utilizando diferentes instrumentos, métodos de oxidação ou tipos de matrizes.

Tabela 4. Estudos de LD e LQ para a determinação de STX e dc-STX

Referência	Autor	Freitas (2007)	Cefas (2008)	Helme <i>et al.</i> (2011)
Técnica/Detecção	HPLC-FLD	HPLC-FLD	HPLC-FLD	HILIC-MS/MS
Método de oxidação	Pré-coluna	Pós-coluna	Pré-coluna	*
Tipo de matriz	Extrato T3 pós-extração.	Água deionizada com toxina após lise celular da cepa T3	Extrato de molusco	Matriz de algas
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	STX – 2.53 dc-STX – 1,83	STX – 3 dc-STX – 3	STX – 18 dc-STX – 7	STX – 3 dc-STX - ***
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	STX – 3.45 dc-STX – 2.24	**	STX – 40 dc-STX – 10	STX – 11 dc-STX - ***

HILIC-MS/MS - Cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplado 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.

Observa-se que os dados de limite de detecção e de quantificação obtidos neste trabalho foram inferiores que os obtidos por outros autores. Concluindo assim que os testes apresentaram resultados satisfatórios para a análise destas toxinas na matriz estudada.

Precisão

A precisão foi calculada através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Para o teste de repetitividade o CV variou entre 0.23 e 7.50 % para a área do pico (análise quantitativa) e entre 0.08 e 4.79 % para o tempo de retenção (análise qualitativa). Para o teste de precisão intermediária o CV variou entre 0.12 e 2.36 % para a resposta de detecção e entre 0.03 e 2.04 % para o tempo de retenção.

Baseado na concentração do analito presente na amostra é que se define o valor máximo permitido do CV para os testes de precisão (Brasil, 2011). Como as concentrações das toxinas utilizadas para este teste ficaram entre 3.96 e 13.44 $\mu\text{g L}^{-1}$, os valores de CV alcançados no método não ultrapassaram o valor máximo permitido de 6.70 %, demonstrando, portanto, que o método é preciso.

Exatidão

Para cada nível de concentração calculou-se a exatidão (%) conforme a Equação 1. A Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos no teste de seletividade que também foram utilizados para calcular o valor de exatidão, neste caso, estão presentes os cromatogramas do 3º nível de concentração (ponto 3) das curvas analíticas com a concentração do padrão de 23.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ de STX e 21.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ de dc-STX, sendo (a) branco da matriz (Extrato T3 pós-extração), (b) padronização externa sem superposição da matriz, ou seja, concentração do analito apenas no padrão e (c) padronização externa com superposição da matriz (quantidade do analito presente na matriz após adição do padrão). Observa-se nos cromatogramas que os analitos presentes estão bem separados, com tempos de retenção para STX de $12.54 \pm 0,03$ min e para dc-STX de 7.21 ± 0.04 min, e que a linha de base não apresentou sinais de interferentes provenientes de possíveis substâncias co-extraídas.

$$\text{Exatidao (\%)} = \frac{V_t - V_s}{V_v} \times 100$$

Equação (1)

Onde:

Vt – Valor do analito presente na matriz após adição do padrão;

Vs – Valor do analito no branco da matriz;

Vv – Valor do analito no padrão.

Na tabela 5 pode-se observar que o método alcançou uma boa exatidão devido os resultados estarem dentro do intervalo permitido, de 80 a 110 %, conforme estabelecido pela ANVISA (2003).

Tabela 5. Resultados para o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão

Toxina	Limite de detecção e quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Precisão – CV (%) [*]				Exatidão (%) ^{**}
	LD _I	LQ _I	LD _M	LQ _M	Repetitividade		Precisão Intermediária		
					Área	T.R	Área	T.R	
STX	0.58	0.76	2.53	3.45	1.28	0.02	0.64	0.14	108.36
dc-STX	0.46	0.57	1.83	2.24	2.78	0.27	2.31	0.44	100.64

^{*} Coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos e dos tempos de retenção das toxinas obtidos a partir da concentração $8.96 \mu\text{g L}^{-1}$ de STX e $7.92 \mu\text{g L}^{-1}$ de dc-STX.

^{**} Valor de exatidão do teste de adição de padrão realizado com a concentração do padrão de $23.9 \mu\text{g L}^{-1}$ de STX e $21.13 \mu\text{g L}^{-1}$ de dc-STX (3° nível de concentração).

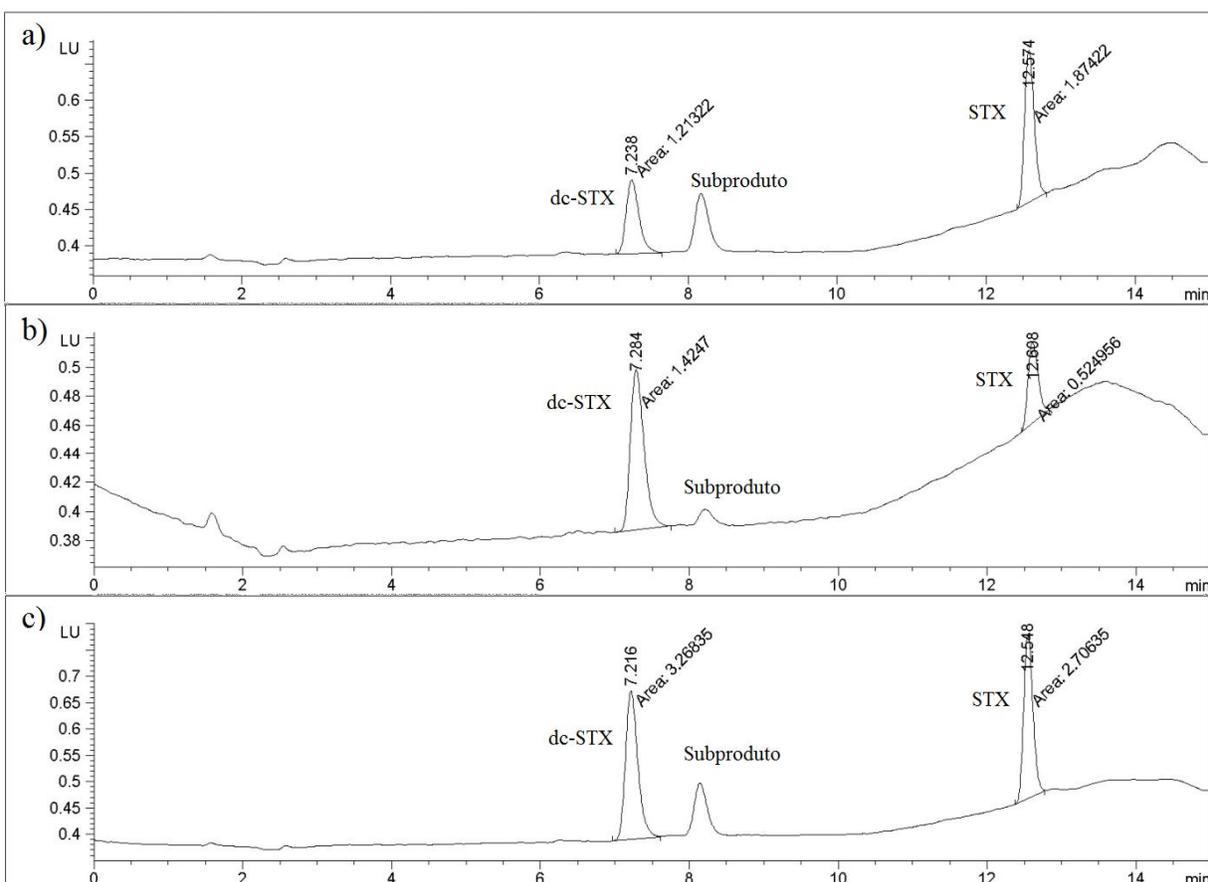


Figura 2. Cromatogramas obtidos pelo CLAE-FLD das amostras com as toxinas presente (a) no branco da matriz, (b) no padrão externo e (c) na matriz após adição do padrão para calcular o valor de exatidão da STX e dc-STX

Robustez

Os resultados das 8 análises realizadas representados por letras de s a z no ensaio de robustez foram utilizados para avaliar o efeito de cada variável (diferença entre a média dos resultados das 4 análises com letra maiúscula e a média dos resultados das 4 análises com letra minúscula), bem como o desvio padrão entre os 8 resultados. Por exemplo, para avaliar o efeito da temperatura da coluna no resultado final da análise, empregou-se a seguinte equação:

$$\text{Efeito da temperatura (C / c)} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4} \quad \text{Equação (2)}$$

Se o valor de efeito da variável for maior do que o critério (desvio padrão dos 8 resultados (s) multiplicado pela raiz quadrada de dois - sv_2), a variável analisada é considerada significativa (Youden e Steiner, 1975) e, portanto, altera a resposta analítica. Analisando a área do pico (análise quantitativa), o resultado para o critério (sv_2) para STX foi igual a 0.0379 e para a dc-STX foi igual a 0.1679. A tabela 6 apresenta os valores de efeitos das variáveis e, de acordo com esta tabela, para todas as variáveis nenhum efeito foi maior do que o critério sv_2 , ou seja, nenhum fator testado influencia significativamente na resposta analítica quantitativa (área do pico).

Tabela 6. Valores de efeitos obtidos a partir dos resultados do tempo de retenção de acordo com o teste de Youden e Steine (1975)

Variável	Valores efetivos para área do pico		Valores efetivos para tempo de retenção	
	STX	dc-STX	STX	dc-STX
Concentração da fase móvel	-0.0098	0.0059	-0.0213	-0.0297
Estabilidade da solução de trabalho	-0.0026	0.0406	0.0383	0.0858
Temperatura da coluna	-0.0087	0.0223	0.4135	0.4939
Agitação durante a oxidação	0.0018	0.0417	0.0050	0.0073
Tempo de injeção após oxidação	0.0072	-0.0006	0.0088	0.0458
Tamanho da amostra	-0.0231	-0.0623	0.0075	0.0336
Tempo de oxidação	0.0154	-0.0256	0.0022	0.0207

Quanto ao tempo de retenção (TR), análise qualitativa do método, o critério sv_2 para a STX foi de 0.3145 e para a dc-STX foi de 0.3824. Ao calcular os valores efetivos para cada uma das sete variáveis, todas tiveram resultados menores do que o critério sv_2 , exceto para a variável temperatura da coluna (variável C/c). Este resultado pode ser comprovado observando os cromatogramas apresentados na Figura 3. Observa-se que para os ensaios com temperatura da coluna de 30 °C (variável C), o TR para STX foi igual a 12.66 ± 0.03 min e para dc-STX foi igual a 7.30 ± 0.05 min. Entretanto, para os ensaios com temperatura da coluna de 33 °C (variável c) os cromatogramas apresentaram um valor menor, obtendo um TR para a STX igual a 12.23 ± 0.03 min e para a dc-STX igual a 6.74 ± 0.04 min.

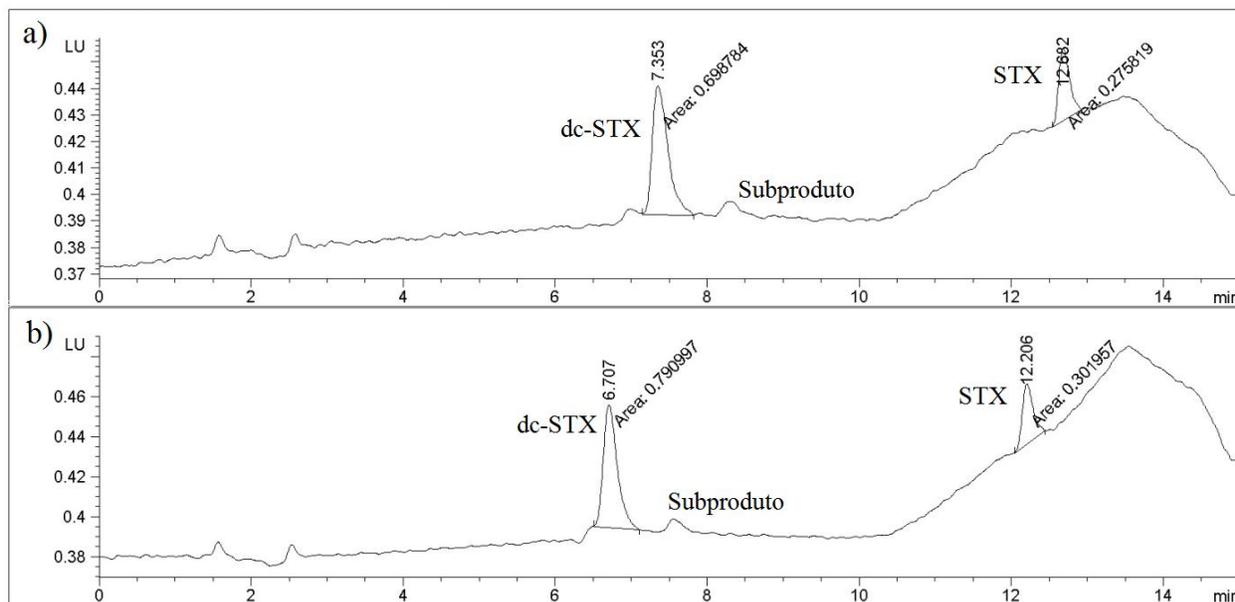


Figura 3. Cromatogramas obtidos no teste de robustez, sendo (a) análise combinatória com variável C (temperatura da coluna igual a 30 °C) e (b) análise combinatória com variável c (temperatura da coluna igual a 33 °C).

Com isso, conclui-se que para o tempo de retenção, dos sete fatores testados, apenas a temperatura da coluna apresentou uma alteração significativa na resposta de detecção para análise de STX e dc-STX, ou seja, quando há um aumento na temperatura da coluna, o tempo de retenção tende a diminuir.

Conclusões

O método mostrou-se seletivo, uma vez que as curvas analíticas (padronização externa com e sem superposição da matriz) apresentaram-se paralelas, sendo este teste comprovado pelo teste de hipótese *t de Student*, com probabilidade maior que 0.05. Verificou-se, também, que o método é linear na faixa de concentração para STX de 4.5 a 150.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para dc-STX de 3.0 a 132.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ pois os coeficientes de correlação foram superiores a 0.999.

O LD_i, LQ_i e LD_M apresentaram-se satisfatórios, ou seja, com concentrações menores que os limites máximos permitidos pela legislação (Brasil, 2011). Apenas o LQ_M para a STX (3.45 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentou valor um pouco acima do limite máximo exigido por Brasil (2011) (3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, portanto seria necessário novos testes para aperfeiçoar este parâmetro.

Os resultados para a análise de exatidão e de precisão foram satisfatórios, visto que para as duas toxinas, os diferentes níveis de concentração estavam com valores dentro do intervalo permitido pela ANVISA (2011).

Para o parâmetro de robustez, o método apresentou-se insensível a pequenas variações possíveis de ocorrer durante a análise. Com exceção da sensibilidade com o aumento da temperatura (+3 °C) para a análise qualitativa do método.

Portanto, o método empregado para análise de STX e dc-STX, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e derivatização pré-coluna, além de rápido e prático, é confiável, eficiente, exato e preciso, uma vez que os parâmetros analisados para a validação tiveram resultados em conformidade aos valores aceitos nas normas brasileiras.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da FINEP – Projeto tratamento de águas de abastecimento (tema 1.1) – Processos de separação por membranas ou carvão ativado - Chamada pública saneamento ambiental e habitação 07/2009, Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológica (Funcap), Universidade Federal do Ceará (UFC), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003) Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, Distrito Federal.
- AOAC, (2005). Official Methods of Analysis, 18th ed. *AOAC International*, Gaithersburg, MD. Method 2005.06.
- Azevedo, S. M. F. O. (1996) Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy, *Proc IV Symposium of Brazilian Society of Toxicology*, **83**.
- Azevedo, S.M.F.O., Brandão, C.C.S. (2003) Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. *Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde*, Brasília, 56 pp.
- Barbieri, E. (2009). O Perigo das Biotoxinas Marinhas. *Instituto de Pesca*, São Paulo.
- Barros, M. U. G. (2013) 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, Ceará, 100 pp.
- Brasil. (2011) Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. *Secretaria de Defesa Agropecuária*, Brasília.
- Brasil. Portaria nº. 2914. (2004) Ministério da Saúde. *Secretaria de Vigilância em Saúde*. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental, Brasília.
- Bouaicha, N.; Via-Ordorika, L.; Vandeveld, T.; Fauchon, N.; Puiseux-Dao, S. (1998) Toxic cyanoprokaryotes in resource waters: monitoring of their occurrence and toxin detection. *OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water*. Paris, França, 1-9.

- Cefas. (2008) 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*.
- Chaves, P. F.; Rocha, S. B. L.; Dutra, A. T. M.; Yunes, J. S. (2009) Ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas no rio dos sinos (rs) entre os anos de 2005 e 2008. *Oecologia australis*, **13**, 319.
- Cunha, N.T. (2004) Metodologias para concentração e detecção de toxinas paralisantes em amostras ambientais. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 92 pp.
- Ferrão-Filho, A. S.; Soares, M. C.; Rocha, M. I. de A.; Magalhães, V. F., Azevedo, S. M. F. O. (2009) Florações de Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: dinâmica sazonal e consequências para o zooplâncton. *Oecologia Brasiliensis*, **13**, 346-365.
- 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, 107 pp.
- Halme, M.; Rapinoja, M. L.; Karjalainen, M.; Vanninen, P. (2012) 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**, 50-57.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). (2010) *Orientação sobre validação de métodos analíticos*, DQO-CGCRE- 008, Rio de Janeiro – RJ: Coordenação Geral de Acreditação.
- Jochimsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E. M.; Antunes, B. C.; Melo Filho, D. A.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S. T.; Azevedo, S. M. F. O; Jarvis, W. R. (1998) *The New England Journal of Medicine*, **338**, 873-878.
- Lanças, F. M. (2009) *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*. Ed. Átomo: Campinas, 382 pp.
- Lawrence, J. F.; Niedzwiedek, B. (2001) Quantative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish by Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, **84**, 1099-1108.
- Lawrence, J. F.; Scott, P. M. (1999) HPLC methods for the determination of Mycotoxins and Phycotoxins. *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance*. Elsevier Science B.V., 432-437.
- Levin, R. E. (1992) Paralytic Shellfish toxic: Their origin, characteristics and methods of detection: a review. *Journal of Food Biochemistry*, **15**, 405-417.
- Oshima, Y. (1995) Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, IOC Manuals and Guides, **33**, United Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), Paris, 81-94.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, **27**, 771-780.
- Wiese, M.; D'Agostino, P.M.; Mihali, T.K.; Moffitt, M.C.; Neilan, B.A. (2010) Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, **8**, 2185-2211.
- Youden, W. J.; Steiner E. H. (1975) Statistical Manual of the AOAC – Association of Official Analytical Chemistry, *AOAC International: Arlington*, **48**, 88 pp.