

APLICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE NODULARINA EM ÁGUAS BRASILEIRAS

**KUNRATH, Nathália Araujo
COSTA, Luiza Dy F.
YUNES, João Sarkis
nathalia.kunrath@hotmail.com**

**Evento: 14ª MPU-FURG
Área do conhecimento: Oceanografia química**

Palavras-chave: Nodularina; Cromatografia Líquida; detecção por UV.

1 INTRODUÇÃO

A nodularina é uma ficotoxina produzida pela cianobactéria *Nodularia*. A maioria das espécies ocorrem em ambientes marinhos, salobros e estuarinos. A ocorrência de uma floração dessas espécies em um corpo hídrico promove a perda da qualidade da água, tornando-a inapropriada para consumo, recreação ou estações de cultivo intensivo.

O presente estudo visa o aprimoramento de métodos que permitam identificar e quantificar a presença de nodularina a partir de uma amostra de uma floração em águas de cultivo de camarões da Estação Marinha de Aquicultura da FURG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) caracteriza-se pela utilização da fase móvel em alta pressão, permitindo a utilização de diâmetros reduzidos de partículas na fase estacionária (coluna cromatográfica) que resulta em um aumento significativo da área de adsorção promovendo uma eficiente separação dos componentes da amostra (Lanças, 2009).

Para a obtenção de perfis espectrais a partir de amostras separadas pelo cromatógrafo, utiliza-se um detector DAD (diode array detectors) ou também referido como detector PDA-HPLC. Um fotodiodo acoplado faz a detecção dos componentes separados pela fase estacionária de acordo com o peso molecular, hidrofobicidade ou carga iônica. Alguns desses detectores abrangem um espectro desde UV 190nm até próximo a faixa do infravermelho, outros podem apresentar apenas um comprimento de onda (Shimadzu Corporation, 1997).

O PDA-HPLC tem sido muito utilizado para determinar e quantificar alguns peptídeos tóxicos como microcistina e nodularina (Dow et al. 1994). Outra forma de quantificar estes peptídeos é a partir do imunoensaio, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), (Chu et al. 1989). Neste princípio, anticorpos específicos as Nodularinas reagem em oposto ao desenvolvimento da cor da amostra. Após, a análise é completada pela leitura de absorbância da amostra em comparação a uma curva de calibração providenciada pelo fabricante (Beacon Analytical systems, Inc. Saco, ME-USA).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de água, contendo a cianobactéria *Nodularia* foi identificada, coletada e liofilizada resultando em um pó desidratado e unialagal. Uma porção de 500mg desse pó foi pesado e dissolvido em uma solução contendo 8mL de metanol e 7mL de água milli-Q. Essa solução ficou em agitação por 24h. Após esse período, a amostra foi rotoevaporada até alcançar uma fração de 6mL. Posteriormente, essa solução foi ultrassonificada em três ciclos de 30 segundos. Assim obteve-se a amostra de nodularina.

A amostra foi analisada utilizando dois cromatógrafos distintos. Um modelo mais antigo (SCL-10AVP Shimadzu e detector SPD-10A) e outro mais moderno (LCMS Solution Shimadzu e detector SPD-20A). No entanto, na fase estacionária foi utilizada a mesma coluna C18 5 μ L (Phenomenex) e na fase móvel os mesmos eluentes constituído de 0,05% Ácido Trifluoracético (TFA) em Acetonitrila (eluente A) e água milli-Q com 0,05% de TFA (eluente B). O gradiente também foi o mesmo nos dois equipamentos conforme método Carmichael et al.(1988).

Uma amostra de nodularina também foi preparada para análise por imunoensaio precisando ser diluída em 10.000 vezes para entrar no limite de detecção do método.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

As análises realizadas no PDA-HPLC apresentam maior confiabilidade quando comparadas ao imunoensaio, uma vez que apresenta melhor seletividade do analito e facilidade de identificação do mesmo. O equipamento moderno é mais linear, estável, preciso e seletivo que o antigo.

A utilização do imunoensaio pode ser uma alternativa mais econômica e menos complexa para a quantificação de peptídeos tóxicos, contudo, seu limite de detecção é restrito entre 0,04 μ g L⁻¹ e 1 μ g L⁻¹, o que não é verificado no PDA-HPLC.

O PDA-HPLC torna-se mais versátil, pois apresenta alto rendimento com menor consumo de amostra.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do PDA-HPLC ser indicado para peptídeos tóxicos, o imunoensaio pode ser uma alternativa viável quando utilizado em análises rápidas de monitoramento de potabilidade de água.

REFERÊNCIAS

- Chu, P.S.; Hung, X; Wel, R.D. ; Carmichael, W.W. 1989. *Production and characterization of antibodies against microcystins*. Applied Environmental Microbiology, 55: 1928-1933.
- Dow, C.S.; Swoboda, U.K.; Firth, P.; Smith, N.1994. Application of HPLC and Mass Spectrometry (MALDI) to the detection and Identification of toxin from Microcystis, Oscillatoria and Ap,hanizomenon from several Freshwater reservoirs. In: Codd, G.A, Jeffereis, T.M, Keevil, C.W, Potter, E. Royal Society 1994. pp.64-68.
- Carmichael, W.W.; Eschedor, J.T.; Patterson, G.M.L.; Moore, R.E.1988. Toxicity and Partial structure of a Hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. Applied and Environmental Microbiology, 54: 2257-2263.
- Lanças, F.M. 2009. Cromatografia Líquida Moderna - HPLC / CLAE. pp.384. Editora Atomo.
- Shimadzu Corporation, 1997. Instruction Manual SPD-10A VP, Tokio, Japan.