



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas

Determinación de microcistinas en aguas
de captación y tratadas

N° 446

Sebastián Mari Ardanaz

Tutores: Cecilia Di Risio y Juan Carlos Vuolo

Departamento de Investigaciones
Diciembre 2010

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>



A mis padres, Gustavo y Verónica.
A Juan C. Vuolo y Cecilia Di Risio, por tener fe en mí desde el comienzo.
A Brenda Ruseler, por darme ánimo cuando más lo necesitaba.

Agradecimientos especiales

- A María Carolina González, Alberto H. Domenech, Daniel A. Siroti, Nicolás M. Muñoz, Martín Urquiza y María G. Libonatti por su valiosa colaboración.
- A Adriana Morón, Marcelo Cicchino, María Luján Silva, Alicia Lafuente, Marcos Cervini y Alicia Santos por su apoyo y asistencia.

Índice

Resumen y Objetivos	7
Introducción	8
Desarrollo experimental y resultados	17
Discusión	40
Conclusiones	44
Referencias	45
Bibliografía consultada	46
Glosario	48

Resumen y Objetivos

Debido a su elevada toxicidad y al incremento en su presencia en aguas utilizadas por el hombre, las microcistinas, heptapéptidos producidos por diversas especies de cianobacterias, se han convertido en las últimas décadas en una preocupación creciente para la salud humana. Por ello, resulta necesario su monitoreo frecuente en aguas crudas de captación y aguas potabilizadas, tanto a la salida de planta como en las redes de distribución.

Dentro del marco del convenio firmado entre Agua y Saneamientos Argentinos Sociedad Anónima (AySA S.A.) y la Universidad de Belgrano, se trabajó en el desarrollo e implementación de una técnica analítica de laboratorio por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas, que permitirá dar respuesta en forma rápida y eficiente a la concentración de diversas microcistinas que pudieran darse en eventos estacionales, en particular sobre la más común y potencialmente tóxica, la microcistina-LR.

Con estas pautas, los objetivos planteados para este Trabajo Final de Carrera pueden sintetizarse como sigue:

- Analizar antecedentes sobre la metodología analítica aplicada al análisis de Microcistinas, especialmente las basadas en la detección y cuantificación de su derivado de oxidación, el ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutanoico (MMPB).
- Determinar a partir de los recursos disponibles una vía de derivatización de la toxina que permita su posterior detección.
- Desarrollar e implementar una técnica analítica por cromatografía gaseosa y detección por espectros de masas, utilizando el equipo disponible en el laboratorio, un cromatógrafo gaseoso acoplado a detección por masas marca Varian modelo 4000.

Existe profusa bibliografía sobre las microcistinas, sus efectos sobre la salud y las formas de determinación más ampliamente utilizadas. En la introducción al presente trabajo se ha planteado en forma resumida una recopilación de la información que se ha considerado más pertinente, estructurada en forma de preguntas muy concretas cuyas respuestas pretenden apuntar a explicar, de la forma más clara posible, la información básica necesaria para comprender el trabajo presentado, sin agotar la exposición de toda la información disponible en diversas fuentes, que se presentan en la literatura consultada.

El desarrollo experimental de esta investigación se realizó íntegramente en el Laboratorio Central de AYSA ubicado en planta San Martín de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (figura 1). La organización brindó sus instalaciones, equipos y reactivos necesarios. Se recibió a la vez la permanente colaboración de los sectores de Cromatografía, Microbiología y Jefatura de Área Técnica del Laboratorio Central.

Las microcistinas no poseen una volatilidad lo suficientemente alta como para ser introducidas directamente en un cromatógrafo gaseoso. Por tanto, el interés del presente trabajo ha sido describir una variante metodológica para la detección de microcistinas totales basada en la derivatización vía oxidación de Lemieux y el posterior análisis por cromatografía gaseosa con detección de masas. Se evaluaron las condiciones necesarias para extraer las microcistinas presentes en una matriz acuosa compleja, garantizando la lisis de las cianobacterias y la consecuente liberación de la totalidad de microcistinas contenidas en su interior. Además se estudió la derivatización de las microcistinas por vía oxidativa generando un producto factible de ser analizado por cromatografía gaseosa, el MMPB (ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico). Dado que las variantes de microcistinas poseen distinta masa molar, los resultados obtenidos por este método se informaron como la concentración equivalente en microcistina-LR, la variante más estudiada debido a su frecuencia y toxicidad.

Por otra parte, se realizó un análisis completo de las modalidades de detección en el espectrómetro de masas, concluyéndose que la ionización química resulta más selectiva y sensible con respecto al modo de impacto electrónico. Utilizando entonces la ionización química, se determinó que el modo SIS produce una mayor señal que el modo MS-MS, si bien este último resulta un proceso de monitoreo más selectivo. Debido a esto, se puede concluir que el modo SIS resultará indicado para muestras provenientes de matrices libres de interferencias mayores, como aguas potabilizadas, mientras que el MS-MS es más

adecuado para matrices complejas (aguas de origen natural como ríos y lagos). Ambos modos permiten alcanzar el valor guía establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para agua potable ($1\mu\text{g/L}$ de microcistina-LR), lo que muestra la utilidad del método desarrollado.



Fig. 1: Laboratorio Central de AySA S.A.

Introducción

1.1 ¿Qué son las microcistinas?

Las microcistinas (MCs) son un conjunto de hepatotoxinas de diversa toxicidad producidas por determinadas especies de cianobacterias. Se trata de heptapéptidos cíclicos que contienen tanto aminoácidos proteicos como no proteicos, siendo su fórmula general ciclo(D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-DGlu-Mdha).

Las variaciones de los L-aminoácidos de las posiciones X e Y son los responsables de las más de 70 variedades de microcistinas, cuya estructura básica se muestra en la Figura 1.1. De todas ellas la más estudiada debido a su elevada toxicidad es la microcistina-LR (MC-LR), con una leucina en la posición 2 y una arginina en la 4. Otras variedades relativamente frecuentes son la MC-RR, MC-LA y MC-LR.

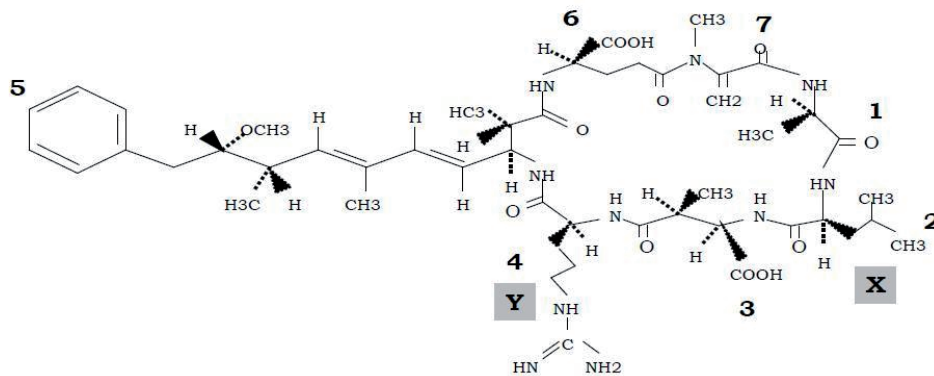


Fig. 1.1: Estructura química de la Microcistina LR (L= X = Leucina; R= Y = Arginina)

1.2 ¿Quiénes las producen?

El principal productor de microcistinas es el género de cianobacterias denominado *Microcystis*, especialmente las especies *M. aeruginosa* y *M. viridis*, aunque también las producen los géneros *Nostoc*, *Dolichospermum*, *Planktothrix* y *Oscillatoria*.

Microcystis es una cianobacteria unicelular, con aspecto cocal, de morfología lobulada, envoltura mucilaginosa incolora y aerótopos. En una primera instancia forman colonias microscópicas, esféricas, irregulares, alargadas, a veces formadas por subcolonias, algunas veces clatradas. Si las condiciones son apropiadas pueden reproducirse velozmente hasta formar floraciones o “blooms” de más de 20.000 células por mililitro (aprox. 10 mg/m³ de clorofila-a).

La Figura 1.2 muestra fotos de cultivos de una de las especies más comúnmente encontrada, la *Microcystis aeruginosa*, y en la Tabla 1.2 se reporta información sobre diferentes variantes de microcistinas y su origen, incluyendo valores de toxicidad.

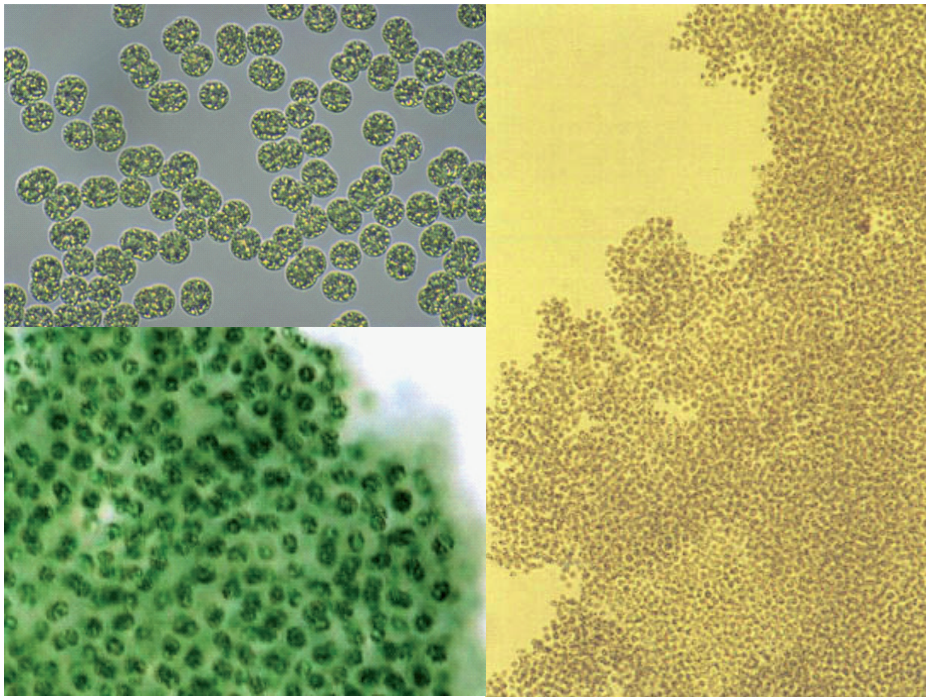


Fig. 1.2: Cultivos de *Microcystis Aeruginosa*

Tabla 1.2 Algunas variantes de Microcistinas reportadas en la literatura científica y su origen. (Chorus et al., 1999)

Microcistina	Masa Molar g/mol)	Toxicidad * (LD ₅₀)	Organismo productor	Referencia
MC-LR	994	50	<i>M. aeruginosa</i> , <i>A. flos-aquae</i> , <i>M. viridis</i>	Botes et al., 1985
MC-LA	909	50	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i>	Botes et al., 1984
MC-RR	1.037	600	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i> , <i>Dolichospermum</i> sp	Kusumi et al., 1987
MC-YR	1.044	70	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i>	Botes et al., 1985
MC-LAba	923	NR	<i>M. aeruginosa</i>	Gathercole, 1987
MC-LL 951	+		<i>M. aeruginosa</i>	Craig et al., 1993
MC-AR	952	250	<i>Microcystis</i> sp	Namikoshi et al., 1992
MC-YA	959	NR	<i>M. aeruginosa</i>	Botes et al., 1985
MC-VF	971	NR	<i>M. aeruginosa</i>	Bateman et al., 1995
MC-LF	985	+	<i>M. aeruginosa</i>	Azevedo et al., 1994
MC-LY	1.001	90	<i>M. aeruginosa</i>	Stoner et al., 1989
[D-Asp3,Dha7]MC-LR	966	+	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Dolichospermum</i> sp	Harada et al., 1991
[D-Asp3,Dha7]MCE(OMe)	969	+	<i>Dolichospermum</i> sp	Namikoshi et al., 1998
(D-Asp3]MC-LR	980	160-300	<i>A. flos-aquae</i> , <i>M. aeruginosa</i>	Krishnamyrthy et al., 1989
[Dha7]MC-LR	980	250	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Dolichospermum</i> sp.	Harada et al., 1991
[DMAdda5]MC-LR	980	90-100	<i>Microcystis</i> sp., <i>Nostoc</i> sp.	Namikoshi et al., 1992
[Dha7]MC-EE(OMe)	983	+	<i>Dolichospermum</i> sp.	Namikoshi et al., 1998

Aba Ácido Aminoisobutílico
Dha Dehidroalanina
DMAdda O-DemetilAdda
E(OMe) Éster metílico de ácido glutámico

* Toxicidad determinada de forma intraperitoneal en ratones ($\mu\text{g kg}^{-1}$); el valor de LD50 es la dosis de una toxina que mata al 50% de la población de animales expuestos. Un '+' denota un efecto tóxico en un bioensayo en ratones no cuantitativo o la inhibición una fosfatasa proteica y 'NR' denota 'No reportada'.

1.3 ¿Dónde y Cuándo se producen las floraciones de cianobacterias?

Las floraciones de cianobacterias se producen en aguas eutróficas, es decir que poseen un elevado nivel de nutrientes, debido a causas naturales o, más frecuentemente, debido a factores antropogénicos tales como aguas cloacales tratadas insuficientemente, presencia de residuos agrícolas, abonos y otros desechos de industrias de ganado (Briand *et al.*, 2003).

En climas templados estas floraciones (como la que se muestra en la Figura 1.3) suelen ocurrir más frecuentemente durante el verano, mientras que en climas tropicales pueden persistir durante todo el año. (Chorus *et al.*, 1999). El viento persistente, condiciones de turbulencia o el aumento del caudal de los cuerpos de agua inducen la desestratificación y mezcla del agua, lo que provoca que la floración pueda desintegrarse rápidamente.

Su crecimiento y muerte provoca un aumento de la materia orgánica en los ambientes acuáticos, cuya descomposición disminuye el oxígeno disuelto, pudiendo ocasionar la muerte de peces y otros organismos. Asimismo, la muerte de cianobacterias de los géneros *Microcystis*, *Dolichospermum* y *Oscillatoria* conllevan el incremento radical en la concentración de microcistinas en agua, ya que el 90% de las toxinas se encuentran dentro de las células mientras viven y son liberadas al medio luego de la lisis celular.



Fig. 1.3: Florecimiento superficial de *Microcystis*

1.4 ¿Qué efecto producen en nuestro organismo las microcistinas?

Las microcistinas no son capaces de cruzar las membranas celulares y por ello no entran en la gran mayoría de los tejidos (Vela *et al.*, 2007). Después de ser ingeridas pasan a través del íleon hacia el torrente sanguíneo por el transportador de ácidos biliares, presente en los hepatocitos y células de la mucosa del intestino delgado. Posteriormente se concentran en el hígado por la captación de los hepatocitos.

Estas toxinas son potentes inhibidores de la serín treonín proteín fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A), tanto de animales como de plantas superiores. (MacKintosh *et al.*, 1990). Una vez que han alcanzado los hepatocitos, provocan la hiperfosforilación de las proteínas hepáticas, afectando principalmente al citoesqueleto, causando la deformación hepática con el consecuente colapso de la estructura del hígado. (Falconer *et al.*, 1992)

La dosis letal 50 (DL50) descrita para la microcistina-LR es de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ cuando se aplica vía intraperitoneal (ip) y oscila entre 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las otras variantes de microcistinas. Sin embargo, al tener una base peptídica, gran parte de las microcistinas ingeridas con el agua o alimento son degradadas e inactivadas en tracto gastrointestinal, siendo el DL_{50} oral 10 veces superior al intraperitoneal.

Un consumo crónico de microcistina lleva a degeneración hepática vía necrosis e incluso tumorigénesis, llegando a provocar la muerte (Ito *et al.*, 1997), sin embargo este tipo de exposición no ha sido suficientemente estudiada.

1.5 ¿Qué antecedentes existen en Argentina y en el mundo?

El grupo de las cianobacterias se encuentra ampliamente distribuido en ambientes lóticos y lénticos de Argentina y del mundo. En los últimos años se registraron una serie de floraciones de cianobacterias tóxicas, principalmente de las especies *Microcystis aeruginosa*, *Dolichospermum spiroides* y *circinalis*, en distintos sistemas fluviales de este país: Río de la Plata, río Uruguay, embalse de Salto Grande, río Paraná, embalse de Yacyretá, en embalses de la región semiárida de Córdoba, y en diversos ambientes del Chaco, entre otros, como se muestra en la Figura 1.5. (Giannuzzi *et al.*, 2009).

El principal antecedente de intoxicación con microcistinas ocurrió en Caruarú, Brasil, donde 150 pacientes de un centro de diálisis estuvieron expuestos a elevadas dosis, lo que provocó la muerte a 56 de ellos. (Azevedo *et al.*, 2002).



Fig. 1.5: Principales áreas estudiadas con registro de floraciones de cianobacterias nocivas en la República Argentina (Giannuzzi *et al.*, 2009)

1.6 ¿Cuáles son los niveles aceptables de microcistina en agua potable?

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda valores para los llamados Niveles Guía de Calidad del Agua, sobre la base de los siguientes criterios:

- Los valores guía se fijan para los constituyentes del agua potencialmente peligrosos y proveen una base para obtener la calidad adecuada.
- Un valor guía representa la concentración de un constituyente que no provoca ningún riesgo significativo:
 - a) para la salud del consumidor a lo largo de su vida (agua potable)
 - b) para otros fines definidos según el uso del agua
- Cuando se excede un valor guía se recomienda investigar la causa con el objetivo de proceder a una acción de remediación, y consultar y avisar a la autoridad responsable de la salud pública, a los proveedores de agua potable y a la población en general.
- Los niveles guía describen la calidad de agua que es aceptable para un período de largo consumo: no deberían constituirse en un límite para la calidad deseable (no implican que el agua debe degradarse hasta ese nivel).

Actualmente la OMS sugiere un límite de seguridad de 1,0 µg/L de microcistina LR como nivel guía para agua potable, considerando que el consumo de agua con MC LR por debajo de este límite, aun por largos períodos de tiempo, no tendría consecuencias para la salud. Este límite excluye a las demás variedades de microcistinas, por lo que no representa el potencial tóxico de la totalidad de microcistinas que pudiesen estar presentes en una determinada muestra de agua potable.

El valor guía propuesto por la OMS se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{IDT (vía agua potable)} = \frac{(\text{NOAEL} \times \text{P} \times \text{peso corporal})}{(\text{FS} \times \text{L})} = 0,96 \mu\text{g/L}$$

Donde: IDT = ingesta diaria tolerable
 NOAEL = nivel de efectos adversos no observables, determinado en base a estudios con animales en un valor de 40 µg/kg
 P = factor por vía de ingreso, representando en este caso la ingesta de agua potable el 80 %, se establece un valor P=0,8
 Peso corporal: se estableció un peso promedio de 60 kg
 FS = factor de seguridad, fijado en un valor de 1000
 L = consumo de agua promedio, 2 litros/día

Sin duda son necesarios más estudios para confirmar los niveles propuestos por la OMS, por lo que algunos países proponen en su legislación valores para el nivel guía de 0,5 µg/L. Por otro lado, de confirmarse su posible acción cancerígena no sería posible establecer un valor guía y las microcistinas deberían estar completamente ausentes en el agua potable.

1.7 ¿Qué métodos de análisis se utilizan para su identificación y/o cuantificación?

Actualmente se dispone de una gran variedad de métodos analíticos para determinar cianotoxinas. Sin embargo, no existe un único método capaz de monitorear simultáneamente todas las variantes de cianotoxinas en las distintas matrices de estudio.

Los métodos varían ampliamente en su grado de sofisticación y en la información que otorgan. Aquellos métodos relativamente simples y de bajo costo son los típicamente utilizados para evaluar rápidamente un peligro potencial y permitir una toma de decisiones. En contraste, las técnicas altamente sofisticadas permiten identificar y cuantificar de forma precisa las cianotoxinas presentes. Las técnicas se eligen dependiendo del equipamiento y la experiencia disponibles, junto al tipo de información requerida.

Los dos parámetros claves a evaluar a la hora de elegir un método son la selectividad y sensibilidad. En un extremo se encuentran los métodos de escaneo, rápidos pero que poseen baja sensibilidad y/o selectividad, mientras que en el otro extremo se encuentran los métodos analíticos complejos, de elevada

selectividad y sensibilidad pero demandantes de un tiempo considerable e instrumental costoso. En un punto intermedio se encuentran opciones como la que se desarrolló en este trabajo, de cuantificación de microcistinas totales basado en la detección del compuesto derivado ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutanoico (MMPB) mediante un cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de masas. La Figura 1.7 representa visualmente, considerando tanto la selectividad como la sensibilidad, las técnicas más frecuentemente utilizadas para la detección de cianotoxinas.

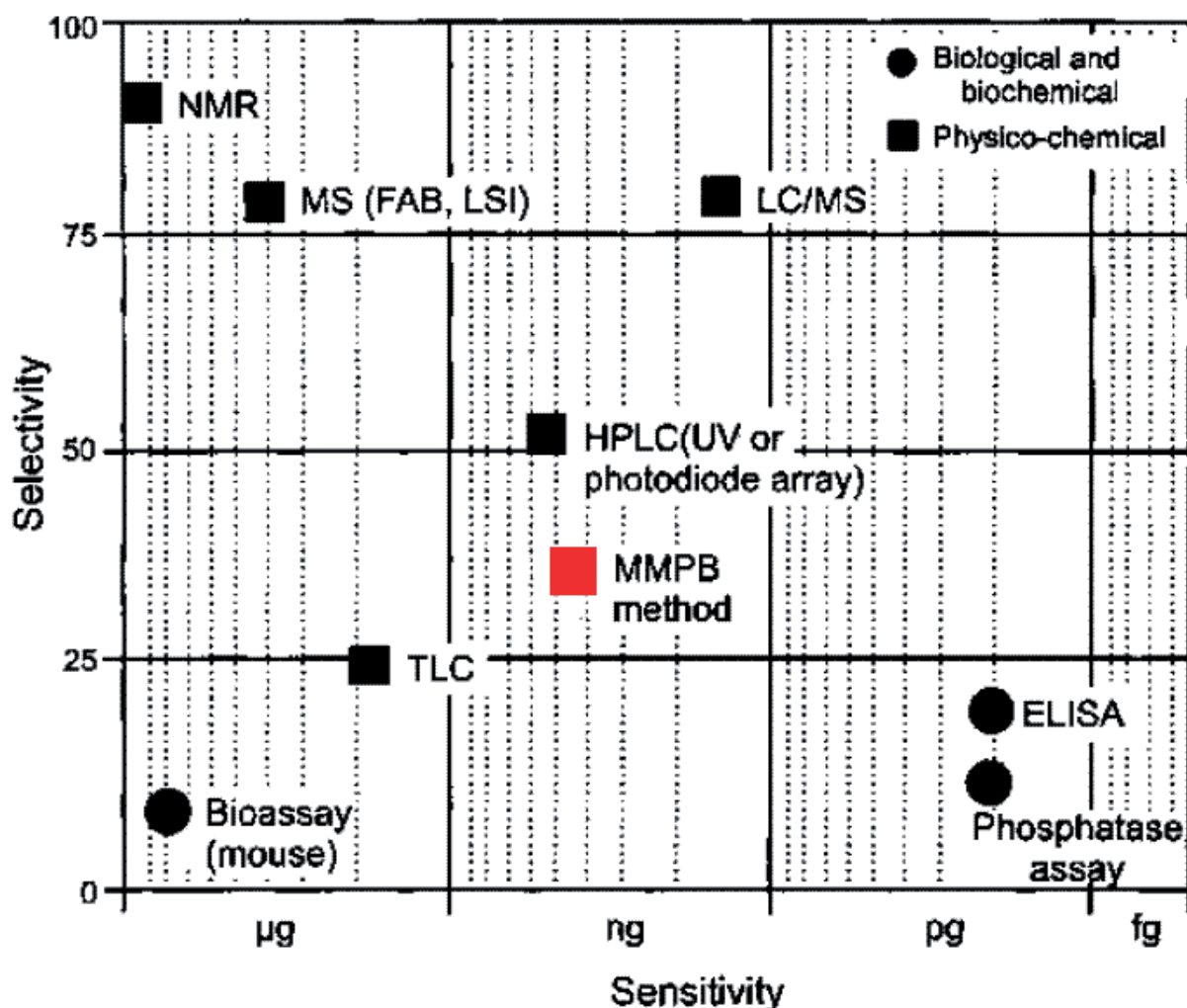


Fig. 1.7: Cuadro que resume la comparación de los principales tipos de métodos utilizados en la identificación y cuantificación de microcistinas según sensibilidad y selectividad (Chorus *et al.*, 1999). En rojo se resalta el método base a partir del cual se desarrolló el presente trabajo.

Como se puede observar en la Figura 1.7, métodos como el ELISA o el ensayo de fosfatasa poseen una mayor sensibilidad pero a costa de tener más interferencias, lo que disminuye considerablemente su selectividad. En cambio, métodos como la resonancia magnética nuclear poseen una elevada selectividad, permitiendo la identificación inequívoca de cada una de las variantes de microcistinas, pero muy baja sensibilidad, siendo su límite de detección muy elevado. El método utilizado de base para este desarrollo, "MMPB method" (por GC/MS o HPLC-PDA), posee una selectividad y sensibilidad intermedias. Lo primero se debe a que no posee interferencias de consideración debidas a la matriz, pero no permite la diferenciación entre variantes de microcistinas ya que todas se cuantifican según un mismo derivado de oxidación. En cuanto a su sensibilidad se puede concluir que es aceptable pero superada por los métodos ELISA y fosfatasa.

El método analítico más difundido para la determinación de microcistinas es el que emplea la cromatografía líquida de alta performance acoplada a un detector por absorción UV (HPLC-UV). En este método

las toxinas son separadas entre sí y de otros compuestos utilizando una columna de fase inversa de C18. (Harada *et al.*, 1988) Luego se determina la absorción a 238 nm. Dado que existen otros compuestos que absorben a esa misma longitud de onda, esta metodología presenta interferencias considerables.

Como variantes de detección acopladas a HPLC se encuentran: el arreglo de foto-diodos (HPLC-PDA) (Lawton *et al.*, 1994) y la espectrometría de masas (HPLC-MS) (Lawton *et al.*, 1995). Ambas disminuyen considerablemente el efecto de posibles interferencias y permiten alcanzar menores límites de detección. La detección por arreglo de diodos permite obtener un espectro completo en el rango UV-Visible para cada pico cromatográfico, una herramienta útil para identificar cada analito. La espectrometría de masas permite establecer prácticamente de manera inequívoca la variante de microcistina que se esté buscando, ya que cada una presenta un espectro de masas característico.

Los métodos basados en ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), utilizan anticuerpos generados para una variante de microcistina que también se ligan a otras variantes de microcistinas (Kfir *et al.*, 1986). El inconveniente de esta metodología es que las distintas variantes de microcistinas no se unen con la misma eficiencia a los anticuerpos. Estas diferencias no se correlacionan necesariamente con las diferentes toxicidades sino que se deben a las diferencias estructurales existentes.

Los métodos basados en fosfatasas se sirven de la inhibición producida por las hepatotoxinas cianobacterianas como las microcistinas y nodularias sobre las enzimas proteicas fosfatasas responsables de la defosforilación de las fosfoproteínas intracelulares. Esta inhibición por hepatotoxinas puede ser determinada utilizando sustratos marcados isotópicamente con el radionucleido ^{32}P (MacKintosh *et al.*, 1990) y midiendo el fosfato marcado producido. Este método es sensible pero tiene la desventaja de que el ^{32}P tiene una vida media corta (14 días), por lo que las proteínas marcadas deben ser preparadas periódicamente. Estas proteínas no están disponibles comercialmente y deben ser sintetizadas mediante técnicas complejas. Además se requiere de ATP radiactivo y enzimas comerciales para su preparación, ambas de elevado costo. Por último se debe mencionar que la mayoría de los laboratorios de análisis de agua no están equipados para llevar a cabo determinaciones de radioactividad.

Con respecto a los bioensayos con ratones, además de ser muy poco selectivos están siendo reemplazados por otras metodologías por cuestiones éticas.

1.8 ¿En qué consiste el método de detección de microcistinas totales por Cromatografía Gaseosa acoplada a masas (GC-MS) vía su derivado MMPB?

Para analizar esta metodología conviene separarla en sus tres módulos, la parte preparativa o de derivatización, la cromatográfica y la espectrometría de masas.

La partición cromatográfica consiste en separar los distintos compuestos que pueda contener una muestra. Esta separación se produce debido a la interacción de dichos compuestos con la fase estacionaria y la fase móvil dentro de una columna cromatográfica. En cromatografía gaseosa la fase estacionaria es generalmente un líquido ligado a un soporte, como el dimetilpolisiloxano que contiene la columna utilizada en este trabajo. La fase móvil es un gas denominado carrier o gas de arrastre, habitualmente nitrógeno, helio o hidrógeno.

Un requerimiento básico de la cromatografía gaseosa es que los analitos deben poder volatilizarse sin degradarse a la temperatura elegida para ello (menor a 300°C). Debido a su elevada masa molar (de alrededor de 1000 g/mol) y su consecuente baja volatilidad, las microcistinas no pueden inyectarse directamente en un cromatógrafo gaseoso ya que quedarían impregnados en el inserto de vidrio del inyector y se degradarían al elevar la temperatura del mismo. Además su coeficiente de partición entre la fase estacionaria líquida y la fase móvil gaseosa está altamente desplazado hacia la fase estacionaria, lo cual vuelve a este tipo de sustancias inviables de ser eluidas en un cromatógrafo gaseoso.

De esta manera, para poder analizarlas por GC se debe realizar una reacción que genere un producto volátil. Para ello se utiliza el hecho de que todas las microcistinas poseen el poco frecuente péptido Adda (ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(E), 6(E)-dienoico), y que éste se

puede transformar por oxidación al compuesto MMPB (ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenil-butanoico), que tampoco se encuentra presente de forma natural en las matrices estudiadas. Esta oxidación se puede realizar por ozonólisis o mediante el uso de los oxidantes permanganato y periodato. La primera opción resulta más rápida que la segunda pero requiere de un equipo especial de ozonólisis, por lo que para el presente trabajo se optó por la segunda, denominada reacción de Lemieux. Dado que las variantes microcistinas poseen distinta masa molar, los resultados obtenidos por este método suelen informarse como la concentración equivalente en microcistina-LR, la variante más estudiada debido a su frecuencia y toxicidad.

El derivado MMPB obtenido puede ser analizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (Kaya and Sano *et al.*, 1999) o por HPLC con detección por fluorescencia (Sano *et al.*, 1992). Para el desarrollo del presente trabajo se optó por la primera técnica, debido a que se dispone de un equipo con la mencionada tecnología de detección por espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que consiste en la ionización en fase gaseosa de los compuestos presentes en una muestra y la posterior detección según la relación masa/carga de estos compuestos ionizados y sus fragmentos producidos por la desestabilización inherente al proceso de ionización. En el caso de la metodología y el instrumental utilizado en este trabajo, el espectrómetro de masas se encuentra acoplado al cromatógrafo gaseoso. Como su nombre lo indica, a la salida de este cromatógrafo los compuestos se encuentran estado gaseoso, por lo que se puede realizar la ionización de forma directa.

Existen diversas formas de ionización en espectrometría de masas, siendo las dos variantes disponibles en el equipo utilizado la de impacto electrónico (electronic impact o EI) y la de ionización química (chemical ionization o CI). En la modalidad de impacto electrónico la ionización se produce mediante un flujo de electrones de elevada energía, habitualmente de 70eV. El impacto de estos electrones ioniza a las moléculas confiriéndoles una carga positiva (debido a la pérdida de 1 o más electrones). En el caso de la ionización química, primero se produce la ionización de un gas (metanol, etanol, metano o isobutano) por impacto electrónico, y luego este gas toma contacto con las moléculas de la muestra ionizándolas, de forma positiva o negativa dependiendo del gas de ionización utilizado.

Los iones producidos se separan mediante un campo magnético según su relación masa/carga, pudiendo tratarse de la molécula original entera (ion molecular) o sus fragmentos de masa menor. Estos iones pueden detectarse y cuantificarse, obteniéndose de este modo el denominado espectro de masas de un compuesto. Dado que hay una directa relación entre el espectro de masas y la estructura de una molécula, este método resulta una excelente forma de identificación y confirmación. Resulta entonces poco habitual que dos compuestos distintos tengan un mismo espectro de masas. Cabe aclarar que los espectros de masas de un mismo compuesto varían según la energía de ionización y en el caso de la ionización química, del gas utilizado. Cuanto mayor sea la energía de ionización, menor será la probabilidad de detección del ion molecular ya que la fragmentación será mayor y aumentará la intensidad de los fragmentos de masas menores.

Como regla general se establece que la ionización química es un método de ionización más suave, implicando procesos de menor energía que desestabilizan con menor intensidad las moléculas favoreciendo la detección del ion molecular. En cambio el método de impacto electrónico, más energético, desestabiliza tanto las moléculas que en muchas ocasiones impide la detección del ion molecular y suele generar un número mayor de fragmentos. Sin embargo, al utilizarse condiciones estandarizadas, la ionización por impacto electrónico permite el uso de bibliotecas de espectros estandarizadas y disponibles comercialmente para la determinación estructural.

Desarrollo experimental y resultados

1. Consideraciones Generales

Este trabajo de investigación se realizó íntegramente en el Laboratorio Central de AYSA ubicado en planta San Martín de la Ciudad de Buenos Aires, donde se dispuso de acceso a las instalaciones, equipos y reactivos necesarios. Se recibió a la vez la permanente colaboración de los integrantes de los sectores de Cromatografía, Microbiología y Jefatura de Área Técnica.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad cromatográfica. Se utilizaron solventes marca Merck de la línea LiChrosolv. Los tubos o cartuchos para la extracción en fase sólida son de marca Merck línea LiChrolut modelo RP-18 (500 mg de partículas de diámetro entre 40 y 63µm en tubos de plástico de 6mL). El agua ultrapura se obtuvo utilizando un equipo Millipore 185 Plus. Se utilizaron soluciones estándar de microcistina LR marca Sigma en envases de 500 µg.

El desarrollo experimental de este método se puede dividir en dos grandes secciones. La primera es el acondicionamiento químico de la muestra, donde se evaluaron las condiciones necesarias para extraer las microcistinas presentes en una muestra con una matriz acuosa compleja, y obtener un extracto final de su derivado de oxidación factible de ser analizado por cromatografía gaseosa con detección de masas.

La segunda sección detalla las variables instrumentales de las distintas opciones de detección estudiadas, todas ellas utilizando la metodología de cromatografía gaseosa acoplada a detección por masas. Se explica el proceso mediante el cual se seleccionaron las condiciones que resultan favorables para la correcta determinación del MMPB.

2. Acondicionamiento Químico de la muestra

Esta sección a su vez se puede dividir en tres áreas:

2.1 Liberación y extracción de microcistinas

2.2 Oxidación de Lemieux (derivatización)

2.3 Extracción del derivado de oxidación MMPB

2.1 Liberación y extracción de microcistinas

Este proceso debe garantizar la lisis de las cianobacterias y la consecuente liberación de la totalidad de microcistinas presentes en su interior. La importancia de esta etapa radica en que usualmente la mayor parte de las toxinas se encuentran dentro de las células cianobacterianas.

Posteriormente se logra extraer y concentrar las microcistinas que estén presentes (desde un volumen original de dos litros de fase acuosa a 2 mL de un extracto en solvente orgánico).

Para desarrollar esta etapa se partió de la metodología utilizada para determinar microcistinas por HPLC, ya que en ambos casos se busca liberar las microcistinas contenidas dentro de las cianobacterias y aumentar su concentración. La principal diferencia radica en que en este método se requiere que el extracto de microcistinas se encuentre en agua para que pueda ocurrir la reacción descrita en la etapa 2.2, mientras que en la metodología por HPLC se busca obtener un extracto en metanol para inyectarlo directamente en el equipo

El procedimiento desarrollado es el siguiente:

- o Acidificar un volumen dado de muestra de agua (2 litros resultaron suficientes para los niveles de detección requeridos mencionados en la sección instrumental) con ácido acético glacial hasta pH=3, verificando con tira reactiva de pH.

- o Sonicar durante 1 hora
- o Centrifugar o dejar decantar en cámara fría
- o Filtrar con prefiltro tipo AP20 ó AP40
- o Acondicionar un cartucho de C18 con 3 mL de cada uno de los siguientes solventes: diclorometano, n-hexano, metanol y agua ultrapura
- o Pasar los 2 litros de muestra por el cartucho (con la ayuda de una bomba de vacío)
- o Lavar el cartucho con 3 mL de una solución de metanol:agua 30:70 %V/V
- o Eluir con 2 porciones de 1,5 mL de solución de metanol:agua 70:30 %V/V
- o Evaporar el eluato a sequedad y redissolver en 2 mL de agua ultrapura

Las etapas de lavado y elución son críticas para la obtención de buenos resultados en el procedimiento, por lo cual fueron ensayadas una serie de variantes antes de decidir la consignada en el procedimiento.

Las variantes de solventes estudiados para la etapa del lavado fueron: éter etílico, hexano, y soluciones de metanol:agua en proporciones 10:90, 20:80 y 30:70. Como variantes de solventes de elución se utilizaron: éter etílico, hexano, metanol y soluciones de metanol: agua en proporciones 70:30, 80:20 y 90:10

La decisión final para la selección tanto de la mezcla de solventes de lavado como el solvente de elución se realizó llevando a cabo una serie de ensayos de recuperación, en los que se estableció que:

- La solución metanol:agua 30:70 %V/V es la que contribuye la remoción de la mayor parte de las interferencias sin eluir el analito de interés.
- La solución metanol:agua 70:30 %V/V asegura la total elución de las microcistinas retenidas en el cartucho, a la vez que eluye la menor cantidad de compuestos no deseados.

2.2 Oxidación de Lemieux

Como fue mencionado anteriormente, la microcistina posee una volatilidad muy baja como para poder introducirla directamente en un cromatógrafo gaseoso. De ser inyectada directamente en el equipo se degradaría térmicamente antes de volatilizarse. Se debe proceder a la derivatización de la microcistina con el fin de poder utilizar la metodología mencionada.

Para realizar la derivatización se eligió la oxidación de Lemieux (Fig. 2.2) debido a su comprobada eficacia en la oxidación de la microcistina para obtener ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutanoico (MMPB) y a la disponibilidad de los reactivos necesarios para su realización. Las condiciones de la reacción fueron tomadas de la bibliografía. Se verificó la importancia del control del pH durante la reacción, ya que si el mismo no es ajustado en valores mayores a 8 el rendimiento para la formación del MMPB resulta bajo.

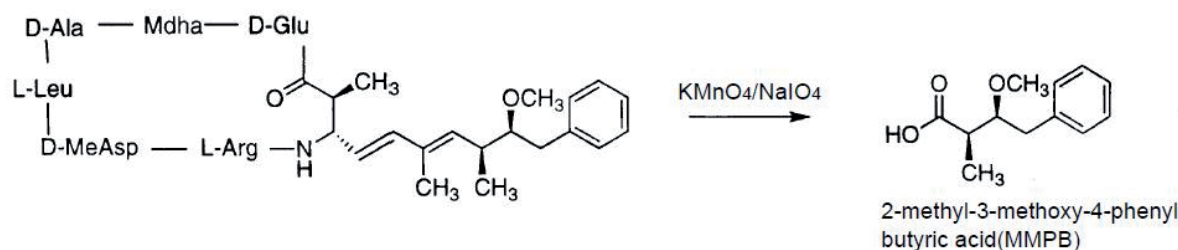


Fig. 2.2a: reacción de Lemieux

El procedimiento correspondiente a esta etapa se detalla a continuación:

- o Verter la solución obtenida en la etapa **2.1.** sobre 5 mL de solución oxidante¹
- o Mantener en agitación durante aproximadamente 12 hs a un pH cercano a 9 (agregando K_2CO_3 en caso de ser necesario).
- o Eliminar el exceso de oxidante por agregado de metabisulfito de sodio sólido.
- o Acidificar la levemente básica solución de reacción con solución de H_2SO_4 10 % (hasta pH 2).

¹: La solución oxidante consiste de 5,7 mg de $KMnO_4$ y 296,3 mg (1385,2 μ mol) de periodato de sodio ($NaIO_4$) en 16 mL de H_2O , conteniendo además 16,7 mg (120,8 μ mol) de K_2CO_3 .

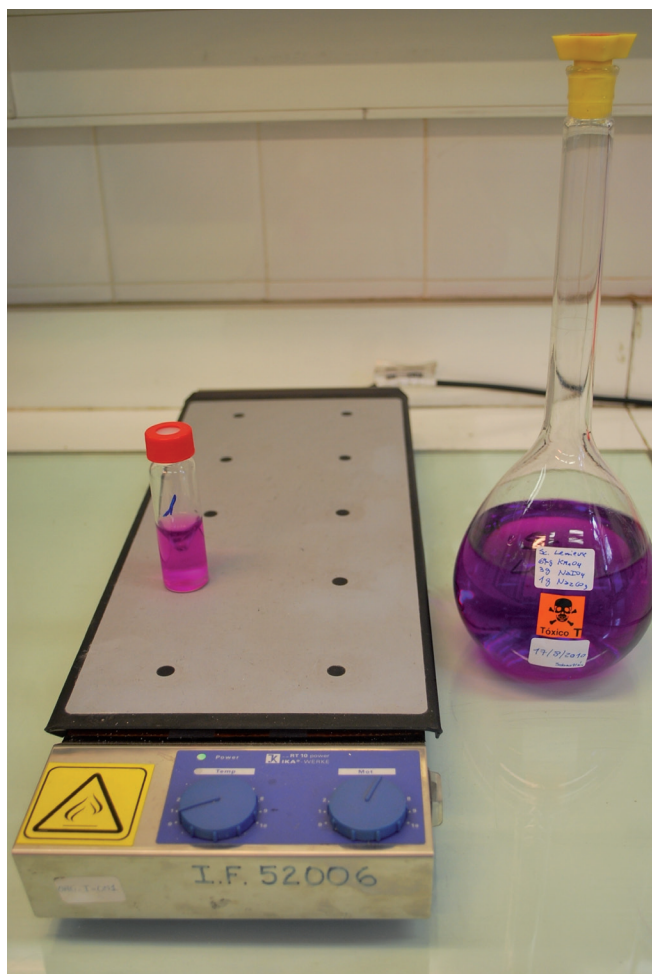


Fig. 2.2b: Agitador magnético utilizado para la reacción de Lemieux

2.3 Extracción del derivado de oxidación MMPB

Luego de realizar la reacción de oxidación de las microcistinas se requiere realizar una extracción para separar el derivado MMPB de los reactivos utilizados, que pueden dañar la columna cromatográfica utilizada. En este paso además se cambia el solvente, de agua a metanol. Esto es necesario debido a que la presencia de agua puede dañar la fase estacionaria de la columna a las altas temperaturas en las que se trabaja en cromatografía gaseosa (hasta 300°C).

Se ensayaron tres variantes de extracción, una del tipo líquido/líquido utilizando como solvente de extracción éter etílico y dos extracciones en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de C18. En una SPE se eluyó con metanol mientras que en la otra se utilizó éter etílico.

2.3.1 El procedimiento utilizado para la extracción líquido/líquido consiste en:

- o Extraer con 2 porciones de 10 mL de éter etílico en balón de decantación.
- o Deshidratar las fracciones de éter combinadas con Na_2SO_4 anhidro.
- o Filtrar y evaporar a sequedad mediante corriente de aire.
- o Redisolver en 250 μL de metanol y colocar en viales adecuados.

Mediante una serie de ensayos, se comprobó que un mayor número de extracciones no conlleva un aumento significativo en la recuperación global del MMPB por lo que se decidió utilizar únicamente 2 porciones de éter.



Fig. 2.3.1: balón de decantación



Fig.2.3.2: cartuchos de C18

2.3.2 El procedimiento para la extracción en fase sólida (SPE) utilizando metanol como eluyente consiste en:

- o Acondicionar un cartucho de C18 con 3 mL de: n-hexano, metanol y agua ultrapura.
- o Pasar la solución que contiene MMPB por el cartucho.
- o Lavar el cartucho con 2 porciones de 1,5 mL de agua ultrapura y n-hexano.
- o Eluir con 2 porciones de 1,5 mL de metanol.
- o Evaporar el eluato a sequedad y redissolver en 250 μL de metanol.

Se recolectaron las fracciones de n-hexano y se comprobó que no eluye al MMPB, por que puede ser utilizado como solvente de lavado sin pérdida de analito.

2.3.3 El procedimiento para la extracción en fase sólida (SPE) utilizando éter etílico como eluyente consiste en:

- o Acondicionar un cartucho de C18 con 3 mL de: n-hexano, metanol y agua ultrapura.
- o Pasar la solución que contiene MMPB por el cartucho.
- o Lavar el cartucho con 2 porciones de 1,5 mL de agua ultrapura y n-hexano.
- o Eluir con 2 porciones de 1,5 mL de éter etílico.
- o Evaporar el eluato a sequedad y redissolver en 250 μL de metanol.



Fig.: Recipiente utilizado para la extracción en fase sólida facilitado por vacío

Se realizó la comparación de la recuperación de las tres variantes de extracción mencionadas manteniendo constantes las variables instrumentales del equipo utilizado. Los resultados se muestran en la Figura 2.3.3

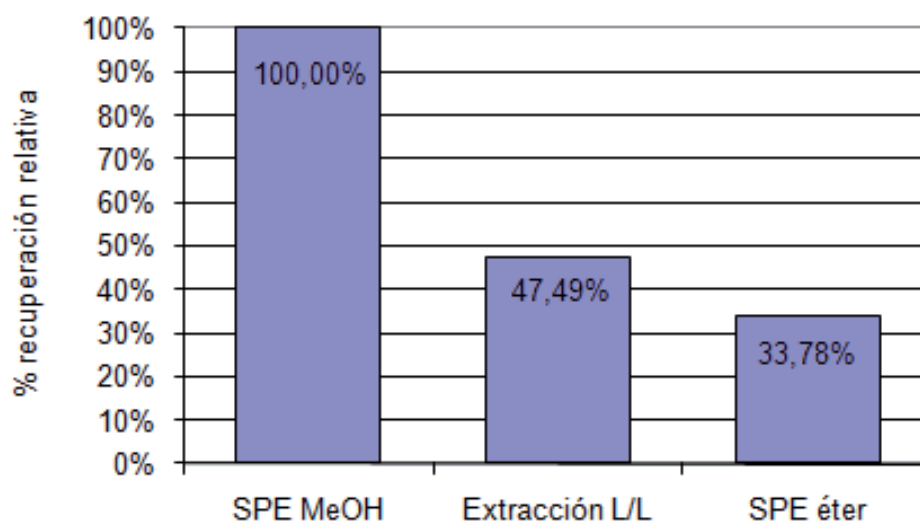


Fig. 2.3.3: Comparación de la recuperación relativa entre las variantes de extracción utilizadas

A partir de estos resultados se puede apreciar que la mejor variante para la extracción del MMPB resulta ser la SPE utilizando metanol puro como eluyente. Como ventajas adicionales de la modalidad de extracción en fase sólida se deben mencionar su sencillez, velocidad y bajo consumo de solventes. Este método fue entonces el elegido para realizar la determinación.

3 Variables instrumentales

En esta sección se presentará el equipo utilizado para la detección del derivado MMPB y se describirá brevemente el desarrollo realizado para encontrar las variantes de configuración del mismo que permitieron alcanzar los mejores resultados.

El equipo utilizado consta de tres módulos (figura 3):

3.1 Inyector automático marca CTC Analytics modelo Combipal.

3.2 Cromatógrafo gaseoso marca Varian modelo 3800GC.

3.3 Espectrómetro de masas marca Varian modelo 4000MS.



Fig. 3: Equipo utilizado para el desarrollo de este trabajo. El módulo de inyección se encuentra montado sobre del cromatógrafo gaseoso. El módulo del espectrómetro de masas se ubica a la derecha del cromatógrafo

A continuación se describirán las configuraciones utilizadas para cada uno de ellos:

3.1 Configuración del inyector automático:

Para la determinación del volumen de inyección ideal se realizaron ensayos con distintos volúmenes permitidos por el módulo de inyección (desde 1 a 10 μL) manteniendo todas las demás variables fijas.

La Figura 3.1 representa gráficamente la tabla de valores que se muestra a continuación, donde se evalúa el área de la señal obtenida en función del volumen de inyección ensayado.

Volumen de inyección	Área
1	148
2	276
5	451
10	593

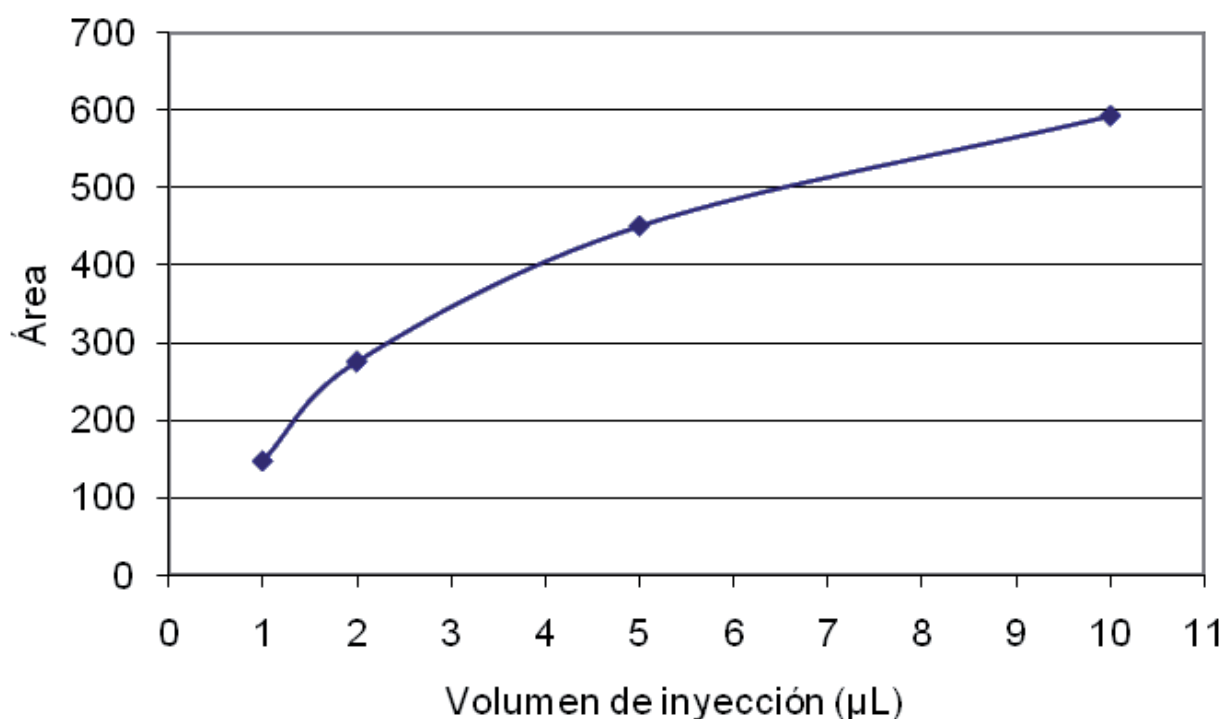


Fig. 3.1: Curva de la señal obtenida para el MMPB en función del volumen de inyección.

A partir de estos resultados se puede observar que un volumen de inyección de 5 µL produce un aumento considerable de la señal obtenida con 1 y 2 µL. Sin embargo, al aumentar el volumen a 10 µL el aumento es menor y se observa un ensanchamiento del pico. Por ello se estableció que el volumen de inyección con mejores resultados fue el de 5 µL, valor utilizado para todas las determinaciones posteriores.

A lo largo de las pruebas para el desarrollo del método, se comprobó la necesidad de agregar enjuagues de la jeringa con agua pre y pos-inyección, ya que en los extractos de MMPB se presentaron pequeñas cantidades de sales que taparon y dañaron varias de ellas.

Se utilizó la máxima velocidad de inyección permitida por el módulo de inyección, para disminuir lo más posible el ancho del pico cromatográfico correspondiente al MMPB.

La configuración establecida a partir de estos ensayos es la siguiente:

- Lavados de jeringa pre-inyección: dos con agua y dos con metanol
- Enjuagues con muestra: dos

- Volumen de inyección: 5 μ L
- Velocidad de llenado de jeringa: 0,5 μ L/seg
- Velocidad de inyección: 10 μ L/seg
- Lavados de jeringa post-inyección: cuatro con agua y cuatro con metanol

3.2 Configuración del cromatógrafo gaseoso:

Partiendo de las condiciones mencionadas en la bibliografía y considerando el material existente en el Laboratorio Central de AySA, fueron estudiadas algunas variables cromatográficas a los fines de encontrar las mejores condiciones de resolución, selectividad y sensibilidad.

Se realizaron pruebas con una columna de idéntica fase estacionaria pero de menor longitud y diámetro interno. La columna de mayor longitud (30 metros) presentó la mejor resolución de los picos cromatográficos, por lo que fue la elegida para este método.

En cuanto al programa de temperaturas, se comenzó trabajando con una pendiente constante de 8°C/min desde los 80°C hasta los 280°C. Luego se decidió comenzar en 100°C y aumentar la pendiente a 20°C después de los 15 min de corrida. Todo esto se realizó con el objetivo de acortar el tiempo de la corrida, sin modificar considerablemente la resolución del pico de MMPB de otras sustancias con similares tiempos de elución. Adicionalmente se aumentó la temperatura final del programa hasta 300°C para asegurar la elución de todos los compuestos que pudieran haber quedado en la columna y evitar los denominados “picos fantasma” en posteriores determinaciones.

La configuración final establecida para el cromatógrafo gaseoso es la siguiente:

- Columna VF-1ms:
 - 30m x 0,25mm D.I. x 0.25 μ m
 - Fase estacionaria: 100% dimetilpolisiloxano (de bajo sangrado).
 - Columnas equivalentes: Agilent DB-1, DB-1ms, HP-1 y HP-1ms; Supelco SPB-1 y Equity-1; Altech AT-1; Restek Rtx-1 y Rtx-1ms; SGE BP1; Quadrex 007-1; Machery-Nagel Optima-1
- Tipo de inyección: splitless durante 1 min, luego split relación 1:10
- Temperatura inyector: 250°C
- Gas carrier: Helio de grado de pureza 6.0
- Flujo en columna: 1 mL/min en modo constante
- Programa de temperatura del horno: a continuación se presenta la tabla de datos correspondiente, los que se representan gráficamente en la Figura 3.2

T inicial	T final	Pendiente	Tiempo parcial
100°C	100°C	0°C/min	1 min
100°C	220°C	8°C/min	15 min
220°C	300°C	20°C/min	4 min
300°C	300°C	0°C/min	1 min
Tiempo total			21 min

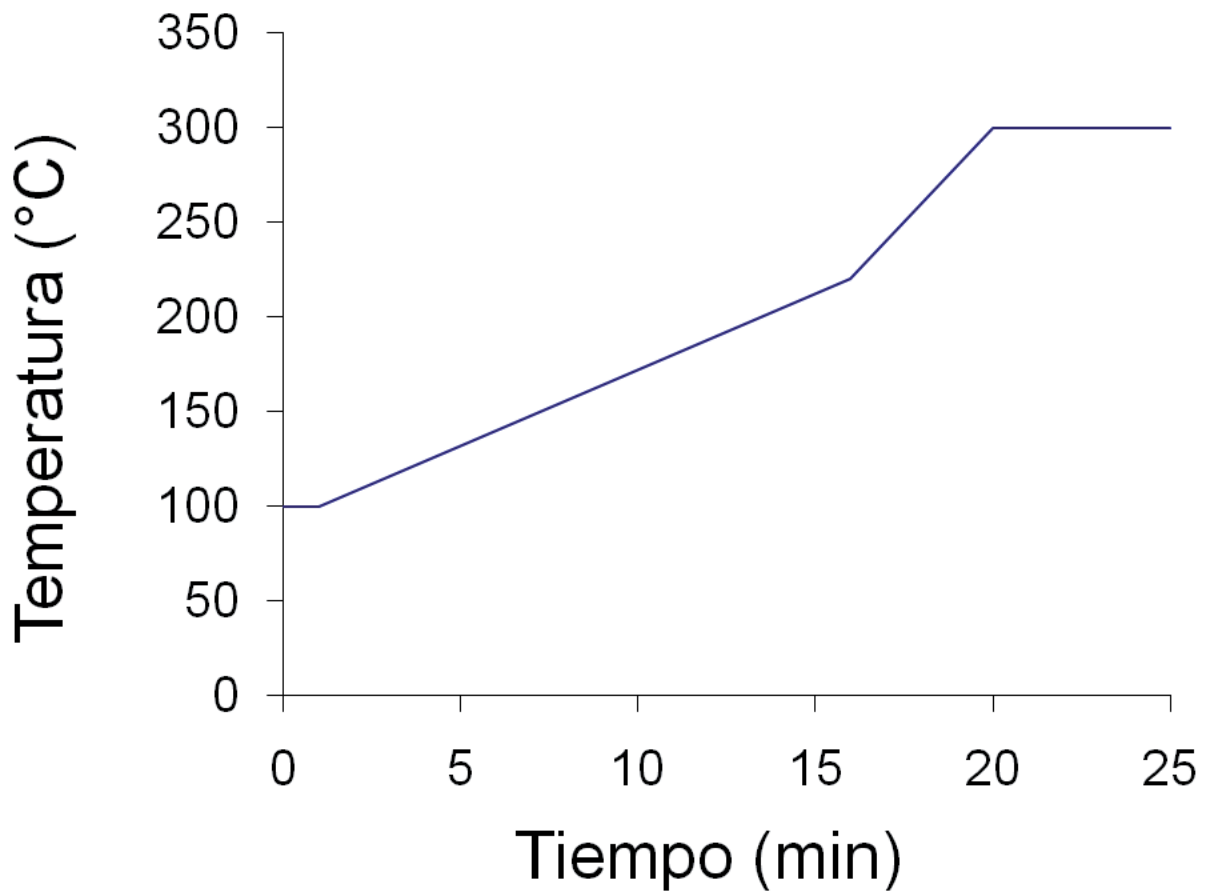


Fig. 3.2: Programa de temperatura del horno del cromatógrafo gaseoso

3.3 Configuración del espectrómetro de masas Varian 4000 MS/GS:

Manteniendo las configuraciones de los módulos mencionadas anteriormente, se estudiaron seis variantes en la configuración del espectrómetro de masas:

- 3.3.1. EI – FULL SCAN: Ionización por Impacto electrónico – modo escaneo completo
- 3.3.2. EI – SIS: Ionización por Impacto electrónico – almacenamiento selectivo de iones
- 3.3.3. EI - MS/MS: Ionización por Impacto electrónico – espectrometría de masas en tándem
- 3.3.4. CI – FULL SCAN: Ionización química – modo escaneo completo
- 3.3.5. CI – SIS: Ionización química – almacenamiento selectivo de iones
- 3.3.6 CI – MS/MS: Ionización química - espectrometría de masas en tándem

Se describen a continuación las variantes de ionización y de escaneo enumeradas, así como los resultados obtenidos por cada una de ellas. Se proponen las vías de fragmentación que justifiquen los espectros de masas observados y se incluyen las curvas de calibración para las variantes que presentan un límite de cuantificación y una linealidad aceptables.

Se comenzó con la variante de ionización por impacto electrónico y escaneo completo. Este modo consiste en la ionización de las sustancias químicas (en este caso eluyentes de la columna cromatográfica) en una corriente de electrones de elevada energía (70eV) seguida del monitoreo completo de los iones producidos como consecuencia del proceso de ionización. Se trata de condiciones estandarizadas de ionización que facilitan la identificación estructural a través de la comparación de los espectros obtenidos experimentalmente con los más de 400.000 espectros almacenados en una biblioteca disponible comercialmente y que se encuentra incorporado al software del espectrómetro de masas utilizado en este trabajo.

De este modo, correlacionando los espectros obtenidos con los de la biblioteca existente se pudo identificar el tiempo de elución característico del MMPB. Luego se analizó el espectro obtenido para este tiempo de elución en la modalidad de ionización química y se establecieron las vías de fragmentación principales para ambas formas de ionización.

3.3.1 EI – FULL SCAN: Ionización por impacto electrónico – modo escaneo completo

La configuración utilizada en esta metodología fue la siguiente:

- Tipo de ionización: impacto electrónico – masas (EI-MS)
- Rango escaneo: m/z 100 – 230
- Escaneos promediados por punto: 5
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

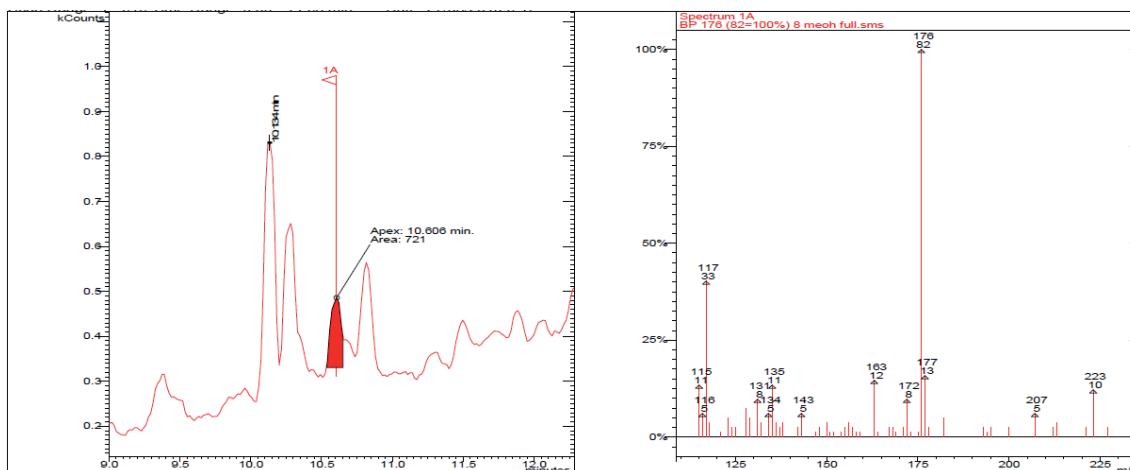


Fig. 3.3.1a: Cromatograma realizado en modo EI-FULL inyectando 5µL de extracto MMPB (provenientes de 5µg/L de microcistina-LR) y espectro correspondiente a los 10,6 min. Relación señal / ruido = 3

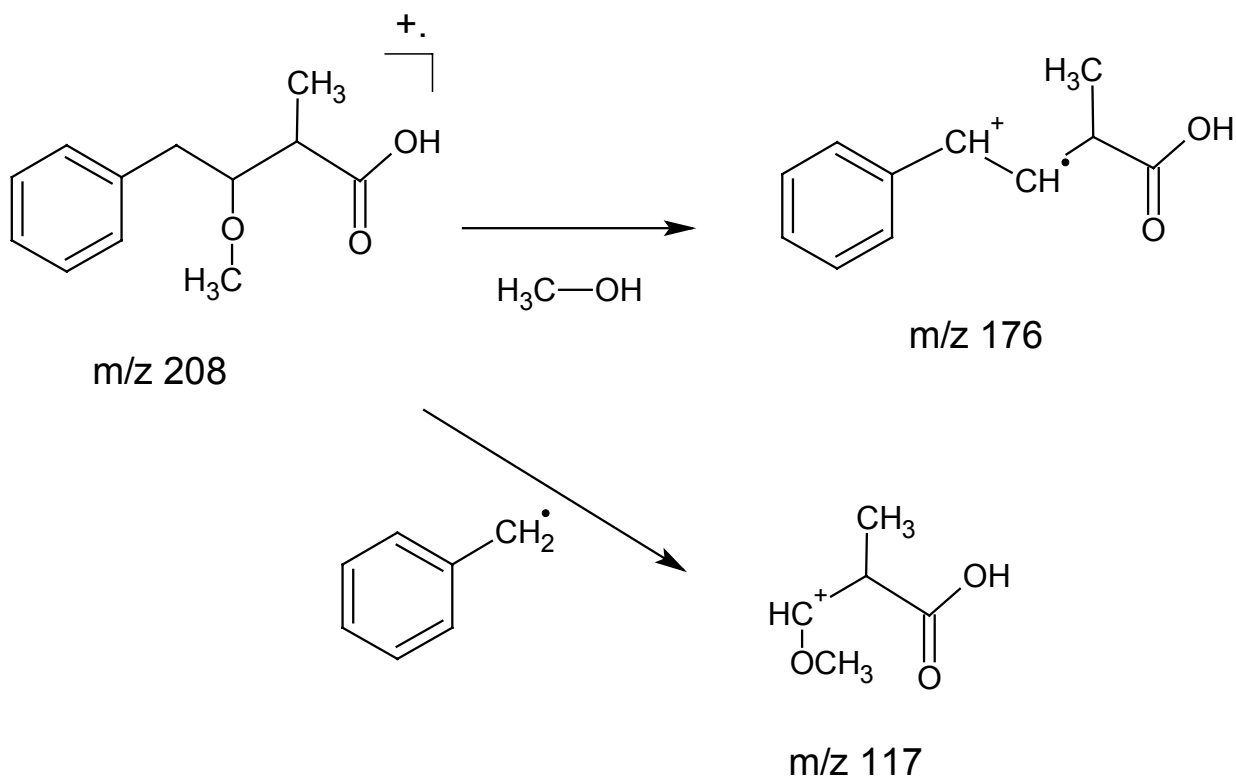


Fig. 3.3.1b: Interpretación espectro de masas para la ionización por impacto electrónico del MMPB

En la Figura 3.3.1b se pueden apreciar las dos principales rutas de fragmentación del ion molecular. Debido a la elevada energía de ionización utilizada en este método (70eV) y a la baja estabilidad del ion molecular, éste no llega a ser detectado. De los fragmentos producidos mayoritariamente, el de mayor abundancia es el m/z 176, ya que posee un núcleo aromático que estabiliza la carga positiva del ion y por lo tanto favorece esta vía de fragmentación. Le sigue en abundancia el fragmento de m/z 117. La presencia de fragmentos de esta relación de m/z es concordante con la estructura del ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutanoico.

3.3.2 EI – SIS: Ionización por impacto electrónico – almacenamiento selectivo de iones

En esta modalidad, el equipo opera en el mismo modo de ionización descrito en el punto 3.3.1. El monitoreo de iones en modo SIS consiste en la detección selectiva de uno o más iones definidos por el operador. Los iones no seleccionados son eyectados de la trampa de iones y no forman parte de la señal registrada. Se obtiene así un espectro de iones que muestra una línea base de mejor ruido con respecto a la línea de base del monitoreo “full scan”. Resulta entonces una modalidad de mayor sensibilidad debido al incremento de la relación señal/ruido, como se puede observar en la figura 3.3.2a. En modo SIS no es factible el uso de bibliotecas espectrales.

La configuración utilizada para este modo fue la siguiente:

- Tipo de ionización: impacto electrónico – masas (EI-MS)
- Ion analizado: m/z 176
- Escaneos promediados por cada punto: 5
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

Se optó por realizar el escaneo selectivo para el ion 176 debido a que éste fue el de mayor intensidad observado en el escaneo completo. Al detectar únicamente esta relación masa/carga se produce una baja considerable del ruido de base, lo que permite una identificación y cuantificación más eficiente del pico de señal correspondiente al MMPB.

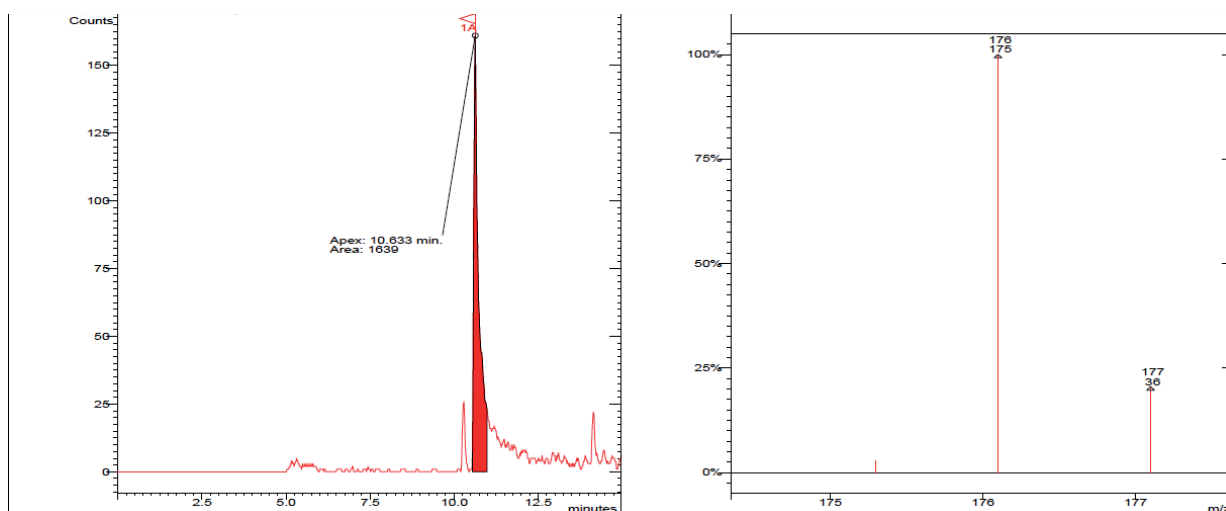


Fig. 3.3.2a: Cromatograma realizado en modo EI-SIS inyectando 5µL de extracto MMPB (provenientes de 5,0 µg/L de microcistina-LR) y espectro correspondiente a los 10,6 min.
Relación señal / ruido = 63

La Figura 3.3.2b presenta la curva de calibración obtenida a partir de los datos de la tabla siguiente:

	Concentración original de microcistina-LR	Área
Blanco	0,00 µg/L	49
Nivel 1	5,00 µg/L	1191
Nivel 2	10,0 µg/L	2527
Nivel 3	100 µg/L	16226

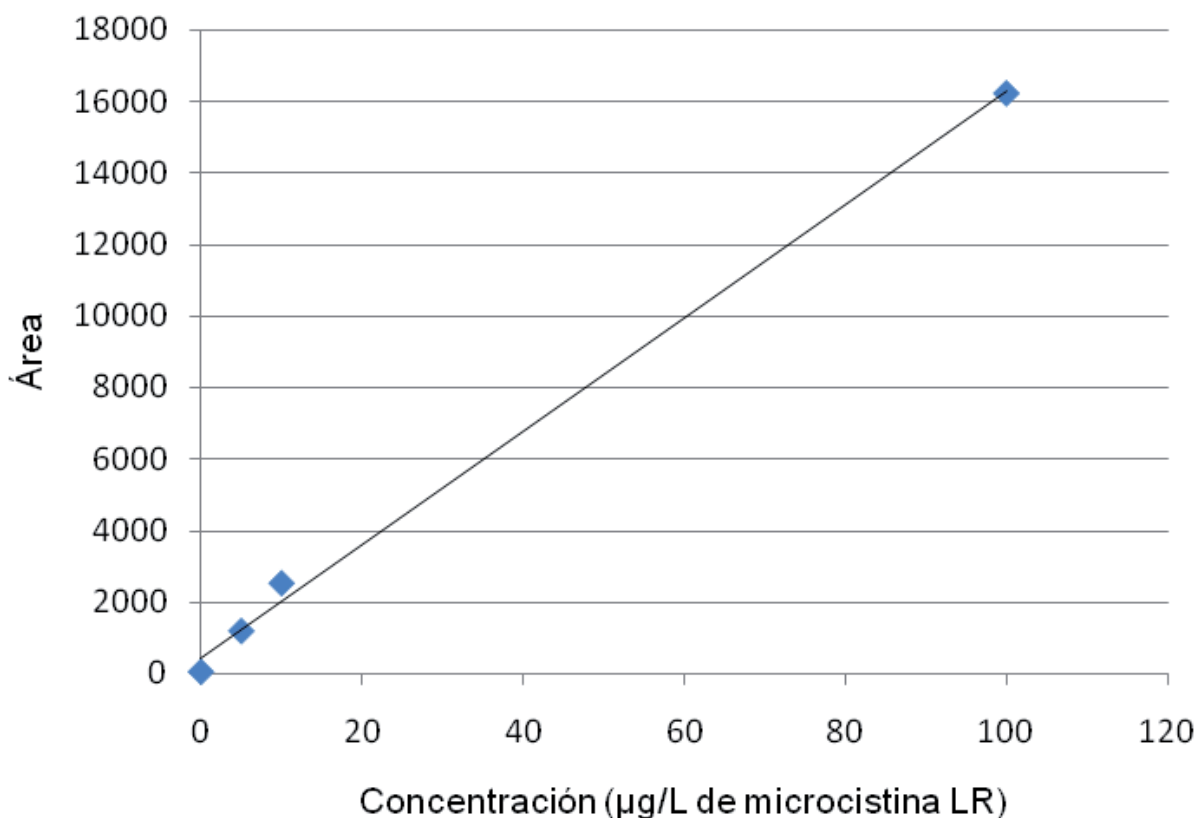


Fig. 3.3.2b: Curva de calibración en modo EI-SIS. R=0,9988

Como consecuencia de la baja repetibilidad y de un elevado nivel de ruido base, esta modalidad no permite alcanzar el valor guía establecido por la OMS para la concentración de microcistinas en agua potable, que es de 1,0 µg/L de microcistina-LR.

3.3.3 EI - MS/MS: Impacto electrónico – espectrometría de masas en tándem

El monitoreo del tipo masas-masas (MS/MS o masas en tándem) consiste en la detección de un ion producto generado a partir de la fragmentación de un ion denominado “precursor”. La trampa de iones es capaz de seleccionar uno más iones precursores (fragmentos de la molécula original) y someterlos a condiciones de fragmentación que generen los mencionados iones “productos”. La energía más adecuada para la fragmentación de ion precursor (amplitud de excitación) se determina al evaluar las rupturas de este ion al someterlo a una serie de energías crecientes que mostrarán cada uno de ellas distintos espectros para el mismo ion precursor. Típicamente valores crecientes de energía mostrarán espectros de masas con abundancia creciente de iones de menor relación m/z. Este proceso para encontrar la amplitud de excitación se denomina AMD (automated method development o desarrollo automático de método).

Para realizar la espectrometría de masas en tándem se partió del ion 176 utilizado en el modo EI-SIS, debido a que resulta ser el fragmento de mayor abundancia relativa y mayor relación masa/carga, ambas características que favorecen la detección de los iones producidos por las subsecuentes rupturas de este fragmento. Se determinó que la fragmentación más frecuente del ion 176 produce el ion 131, debido a la elevada estabilidad de este último.

Uno de los parámetros clave que se debe fijar para el modo MS/MS es la mencionada amplitud de excitación. Para determinar la amplitud de excitación más adecuada en los métodos que utilizan masas-

masas se debe realizar previamente una corrida cromatográfica de la mencionada sustancia de interés en el modo AMD. Mediante este modo se pueden obtener simultáneamente hasta 10 cromatogramas, cada uno con un potencial de excitación distinto.

La configuración utilizada para elegir el potencial de excitación en este caso fue la siguiente:

- Tipo de ionización: impacto electrónico
- Ion precursor: m/z 176
- Ion producto: m/z 131
- Escaneos promediados por punto: 1
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

Se realizaron dos corridas cromatográficas, una para los potenciales de excitación desde 0V a 0,5V en intervalos de 0,05V y otra para los potenciales desde 0,5V hasta 0,95V. En la figura 3.3.3a se muestran los cromatogramas obtenidos para dichos potenciales y en la figura 3.3.3b se graficó la intensidad de señal obtenida para el ion producto de m/z 131 en función del potencial de excitación aplicado.

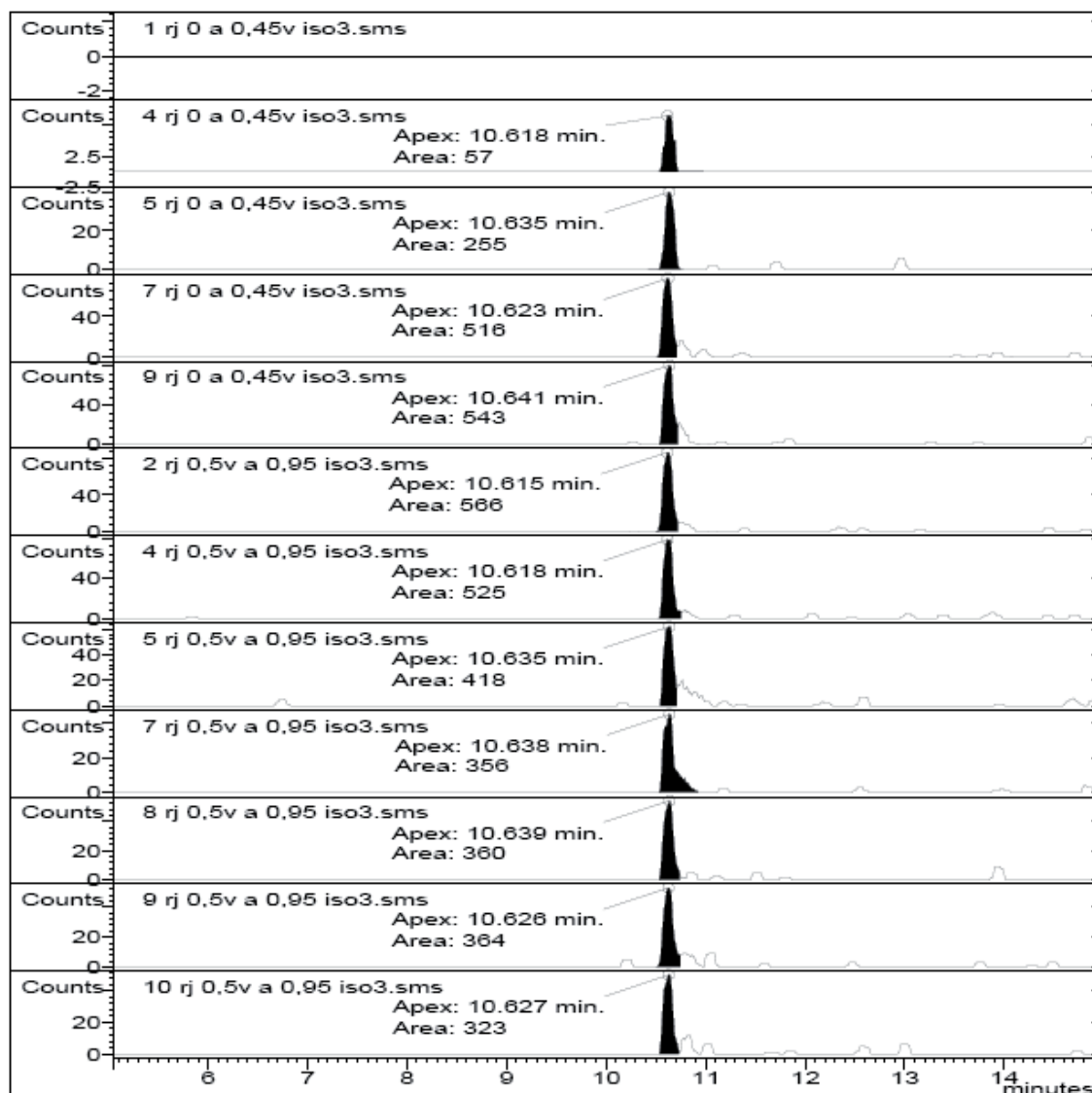


Fig. 3.3.3a: resultados obtenidos en modo EI-AMD para potenciales: 0,00V, 0,15V, 0,20V, 0,30V, 0,40V, 0,55V, 0,65V, 0,70V, 0,80V, 0,85V, 0,90V, 0,95V respectivamente.

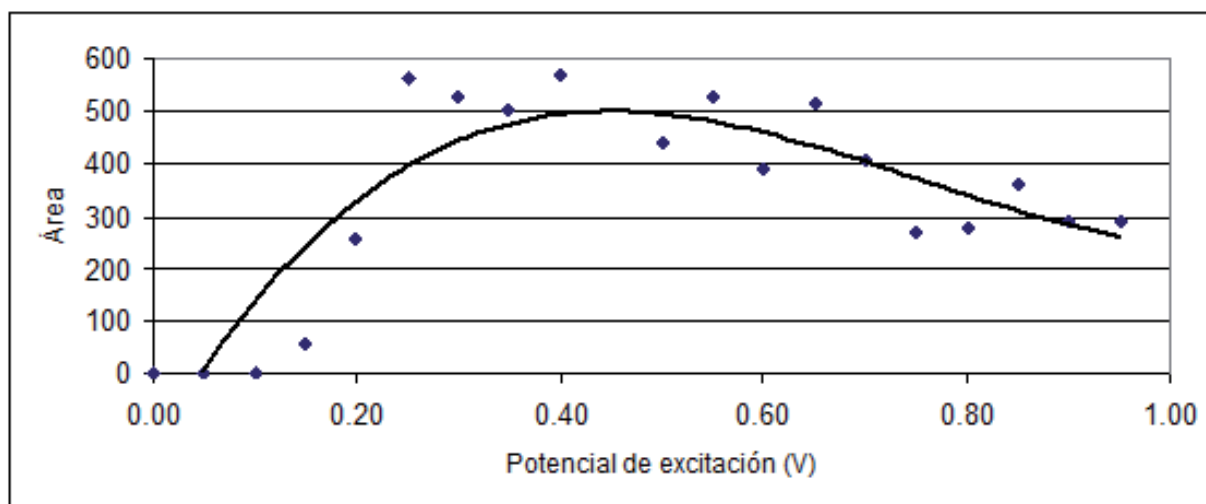


Fig. 3.3.3b: Intensidad de señal obtenida para el ion 131 en función del potencial de excitación aplicado
A partir de los resultados obtenidos se optó por el potencial de excitación de 0,4V.

La configuración final utilizada para el modo EI-MS/MS resulta entonces:

- Tipo de ionización: impacto electrónico – masas/masas (EI-MS/MS)
- Amplitud de excitación: 0,4 V
- Ion precursor: m/z 176
- Ion producto: m/z 131
- Escaneos promediados por punto: 5
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

Como fue mencionado anteriormente, para la modalidad EI-MS/MS se partió del ion 176, debido a que resulta ser el fragmento de mayor abundancia relativa y masa, características que favorecen la detección de los iones producidos por las subsecuentes rupturas de este fragmento. Luego se determinó que la fragmentación más frecuente del ion 176 produce el ion 131, debido a la elevada estabilidad relativa de este último. Este proceso de fragmentación se muestra en la figura 3.3.3d donde se plantean y postulan las estructuras químicas de los iones precursor y producto.

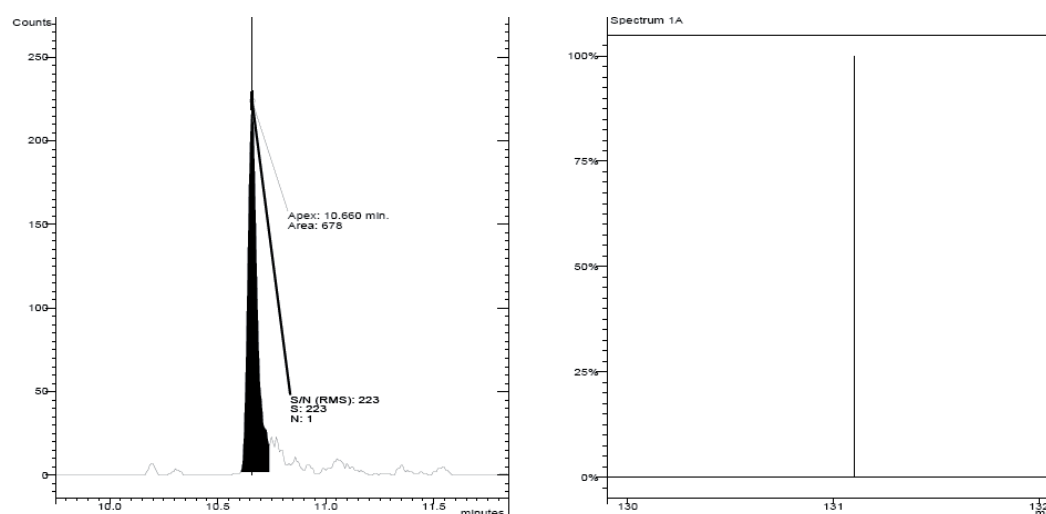


Fig. 3.3.3c: inyección de 5 μ L de extracto de MMPB partiendo de 2 L de solución conteniendo 5 μ g/L de microcistina-LR utilizando metodología EI-MS/MS. Relación señal / ruido = 223

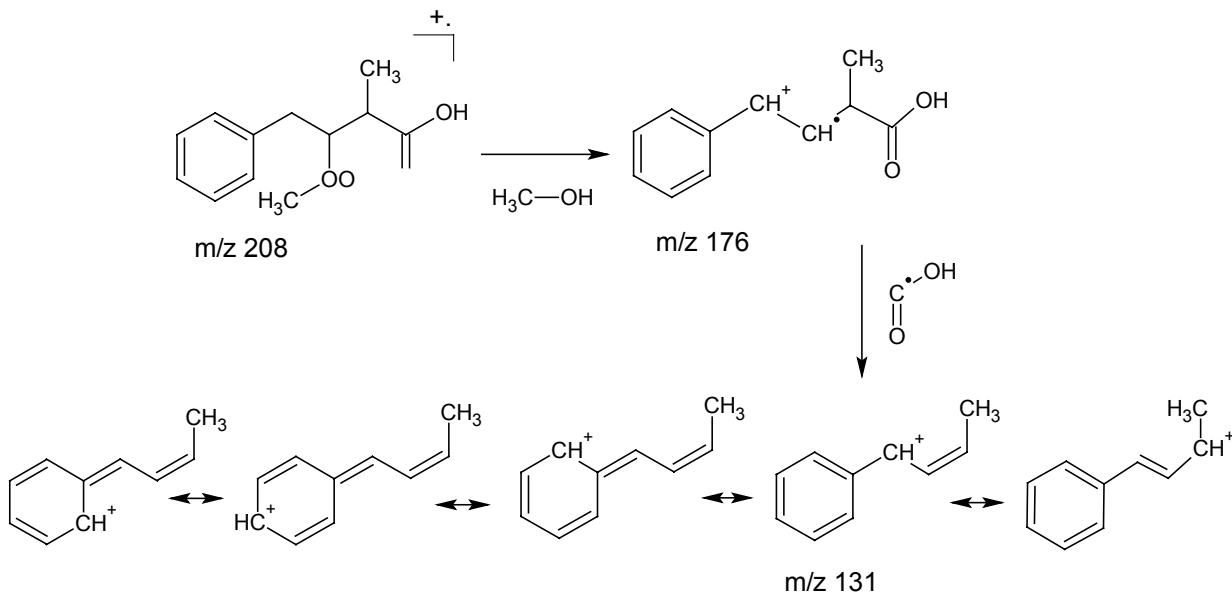


Fig. 3.3.3d: Interpretación de espectro del modo EI-MS/MS (incluyendo estructuras resonantes para el ion producto de m/z 131).

La Figura 3.3.3e presenta los resultados de la curva de calibración obtenida a partir de los datos de la tabla siguiente:

	Concentración original de microcistina-LR	Área
Blanco	0,0 µg/L	12
Nivel 1	5,0 µg/L	95
Nivel 2	50,0 µg/L	473
Nivel 3	100,0 µg/L	948

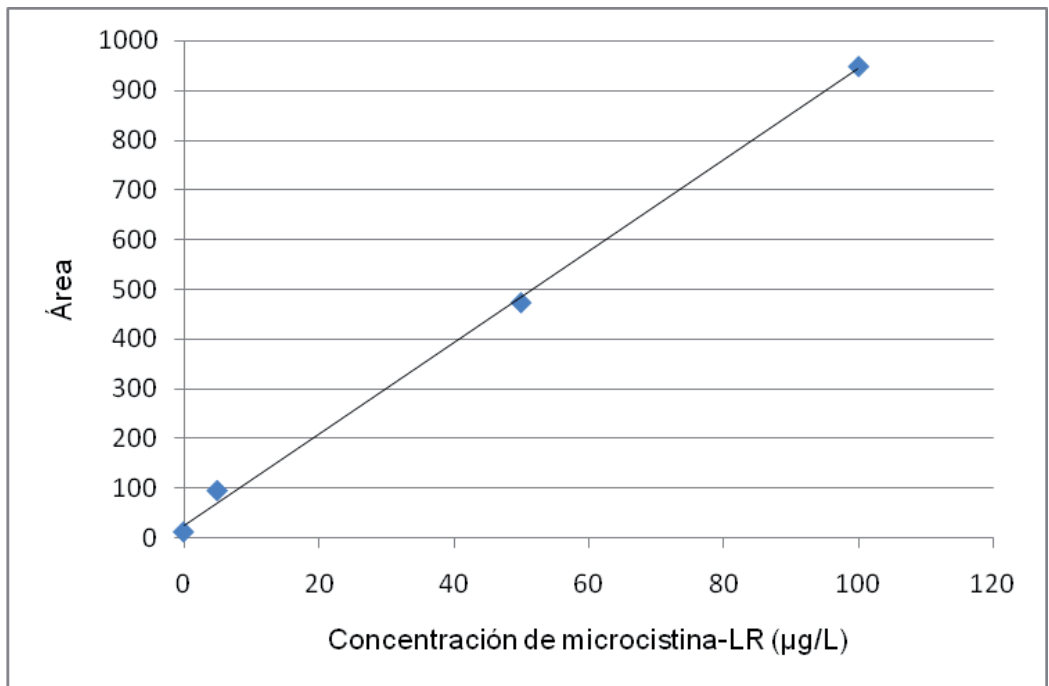


Fig. 3.3.3e: Curva de calibración en modo EI-MS/MS. R=0,9992

Si bien se logra un incremento de sensibilidad basado en el mejoramiento de la relación señal/ruido con respecto a los modos EI FULL y EI SIS, aun no se alcanzan valores de repetibilidad que permitan alcanzar el valor guía establecido por la OMS para agua potable de $1\mu\text{g/L}$ de microcistina-LR.

3.3.4 CI – FULL: Ionización química – modo escaneo completo

La ionización química es una variante de ionización en cual el agente que produce la ionización de las moléculas eluyentes del cromatógrafo en una especie química ionizada que por colisión podrá desprender e- o adicionarse a la molécula target.

Este proceso resulta menos energético que el impacto electrónico de 70eV. Por ello se observa que se producen espectros con abundancias mayores del denominado ion molecular y de los iones de mayor masa.

En ionización química tampoco pueden utilizarse bibliotecas espectrales para la comparación con los resultados experimentales.

La configuración utilizada para este modo es la siguiente:

- Tipo de ionización: ionización química – espectrometría de masas (CI-MS)
- Gas de ionización: metanol
- Rango escaneo: m/z 150-210
- Escaneos promediados por punto: 5
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

En la figura 3.3.4a se presenta como ejemplo un cromatograma obtenido mediante el modo CI-FULL y el espectro correspondiente para el tiempo de elución del MMPB. En él se puede observar la presencia de interferencias debido a la gran selectividad de esta metodología.

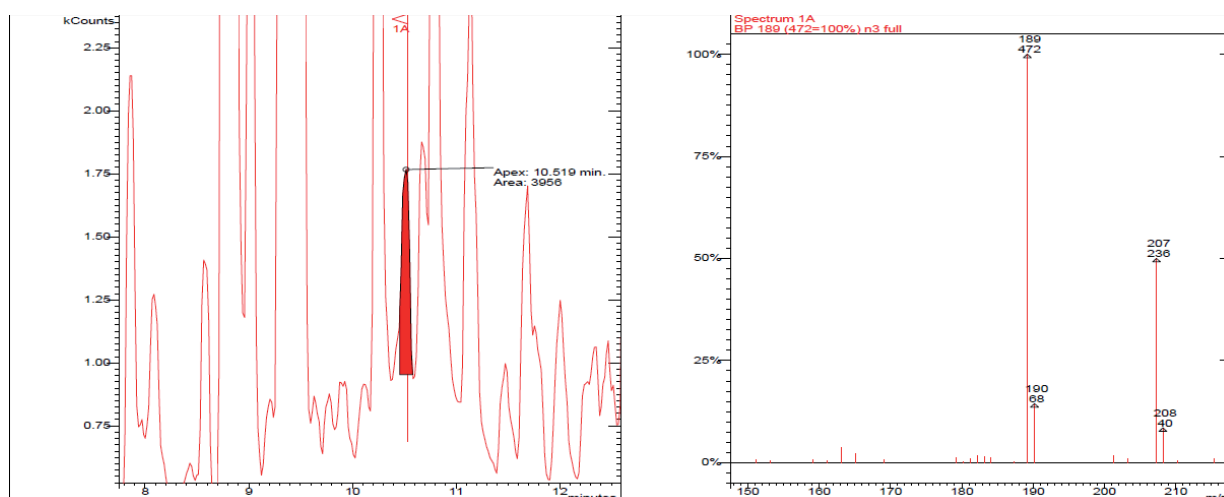


Fig. 3.3.4a: Cromatograma realizado en modo CI-FULL inyectando $5\mu\text{L}$ de extracto MMPB (provenientes de $5\mu\text{g/L}$ de microcistina) y espectro correspondiente al MMPB.
Relación señal / ruido = 15

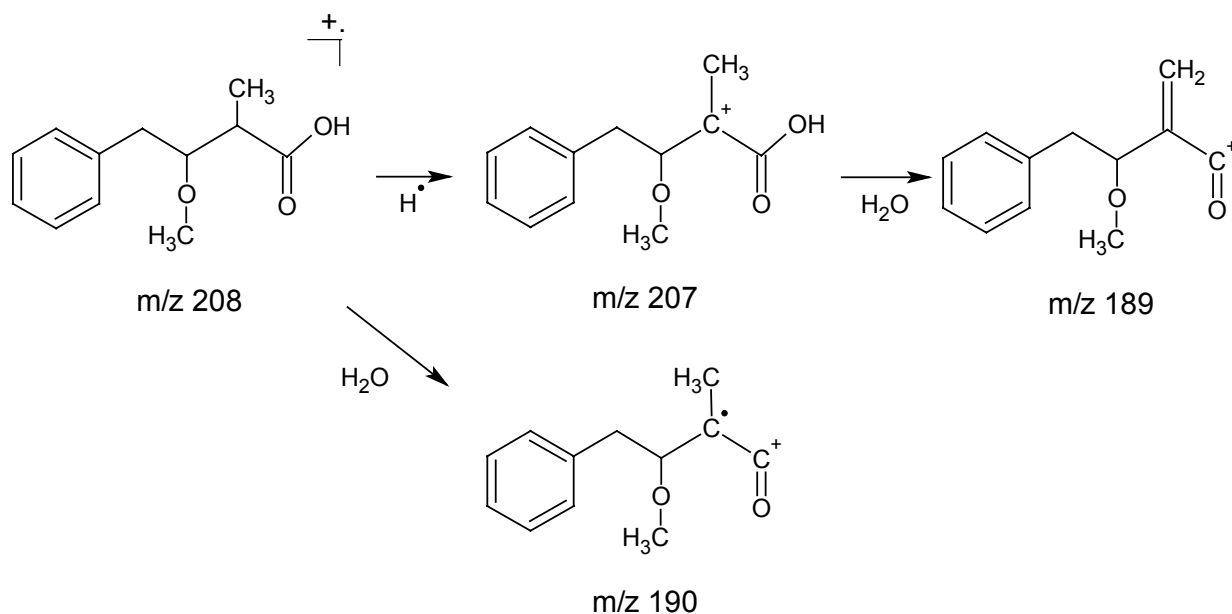


Fig. 3.3.4b: interpretación espectro de masas para la ionización química

Como se puede observar en la Figura 3.3.4b, se plantean dos vías de fragmentación, de las cuales la más favorable es la que produce el ion 189, pico base del espectro obtenido para el MMPB en estas condiciones. Como resultado de un proceso de ionización menos energético que el Impacto electrónico, la ionización química produce menos fragmentaciones y se llega a detectar el ion molecular M^+ de masa 208 y el M^+-1 de masa 207. Nótese la menor abundancia relativa de iones de masas bajas.

3.3.5 CI – SIS: Ionización química – almacenamiento selectivo de iones

Sobre la base de lo explicado en los 3.3.2 y 3.3.4 se buscó combinar los aspectos favorables de la ionización química y del escaneo SIS.

Para este modo se utilizó la configuración mencionada a continuación:

- Tipo de ionización: ionización química – masas (CI-MS)
- Gas de ionización: metanol
- Ion escaneado: m/z 189
- Escaneos por punto: 5
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

En este modo se optó por el escaneo selectivo del pico base observado en el modo CI-FULL, el ion de relación masa/carga 189. Como se muestra en las figuras 3.3.4a y 3.3.5a, cuando se comparan los modos de escaneo SIS y FULL se puede observar una considerable baja del nivel de la línea base (ruido) así como la prácticamente anulación de los picos adyacentes al del correspondiente al MMPB.

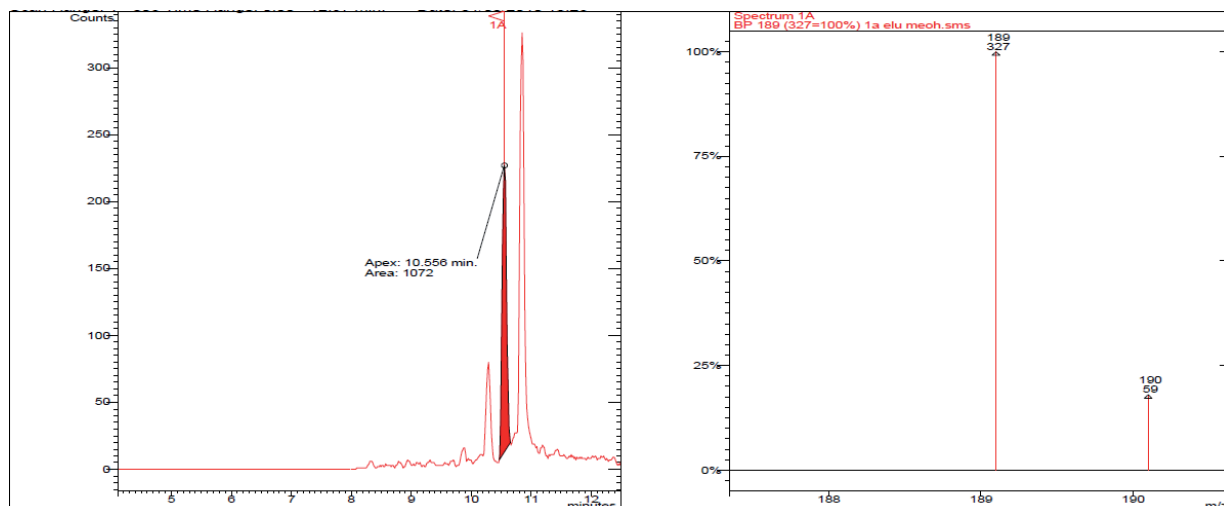


Fig. 3.3.5a: Cromatograma realizado en modo CI-SIS inyectando 5µL de extracto MMPB (provenientes de 5µg/L de microcistina-LR) y espectro correspondiente a los 10,56 min. Relación señal / ruido = 435

La Figura 3.3.5b presenta la curva de calibración obtenida a partir de los datos de la tabla siguiente:

	Concentración original de microcistina-LR	Área
Blanco	0,0 µg/L	10
Nivel 1	0,5 µg/L	920
Nivel 2	1,0 µg/L	1313
Nivel 3	2,5 µg/L	3418
Nivel 4	5,0 µg/L	6847

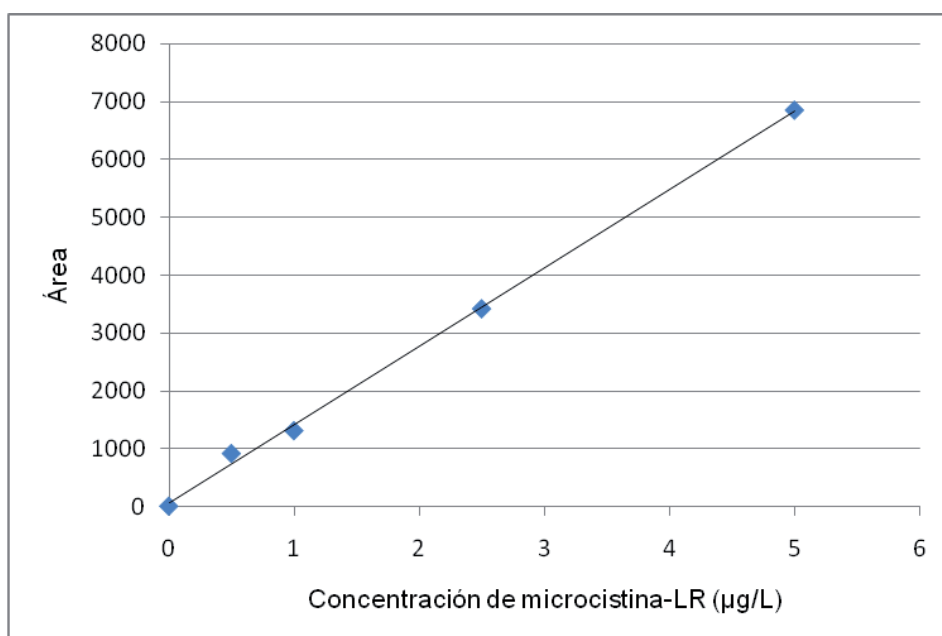


Fig. 3.3.5b: Curva de calibración en modo CI-SIS. R=0,9992

Estos resultados muestran un ámbito dinámico lineal aceptable para el rango de concentración evaluado. Puede verse que esta metodología permite alcanzar adecuadamente el nivel guía establecido por la OMS de 1,0 µg/L para la MC-LR.

3.3.6 CI – MS/MS: Ionización química - espectrometría de masas en tándem

Al igual que para el modo EI-MS/MS, se determinó el potencial de excitación adecuado para el modo CI-MS/MS mediante la herramienta AMD (desarrollo automatizado de método) mencionado en el punto 3.3.3.

La configuración utilizada en este caso fue la siguiente:

- Tipo de ionización: ionización química (CI-AMD)
- Gas de ionización: metanol
- Ion precursor: m/z 189
- Ion producto: m/z 131
- Escaneos promediados por punto: 1

En la figura 3.3.6a se presentan los resultados obtenidos para algunos potenciales de excitación a modo de ejemplo, y en la figura 3.3.6b se muestra en forma gráfica la variación de la señal producida en función del potencial de excitación, con un valor máximo para 0,6V.

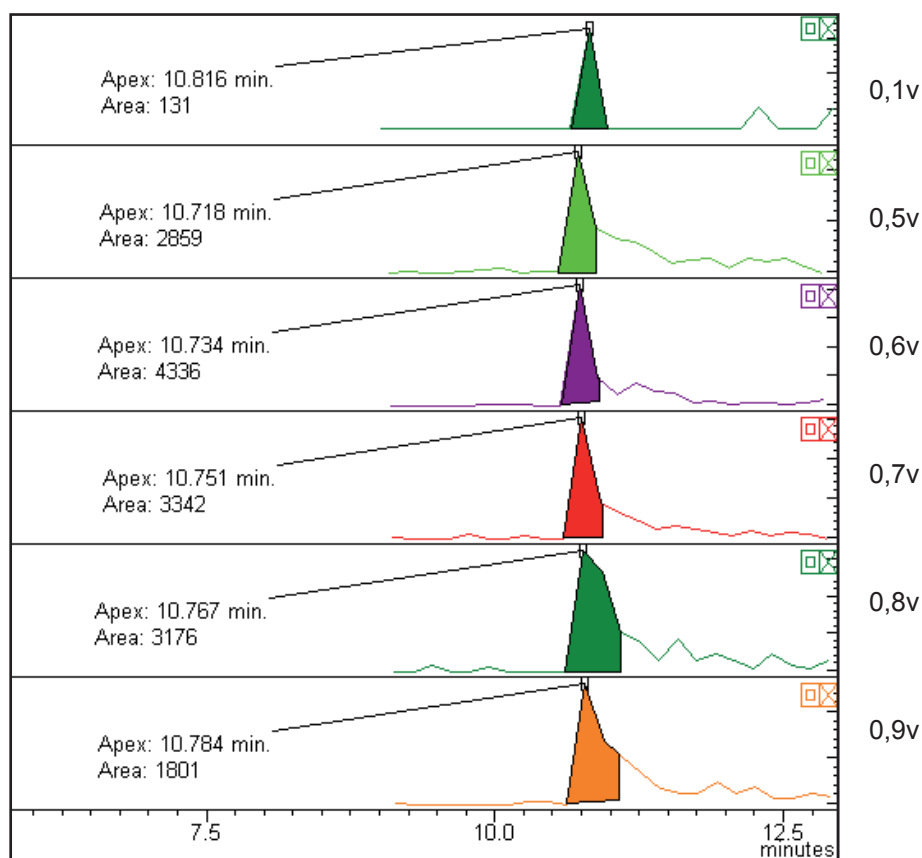


Fig. 3.3.6a: Cromatogramas realizados en modo CI-AMD inyectando 5µL de extracto MMPB (provenientes de 5µg/L de microcistina-LR) para potenciales de excitación entre 0,1V y 0,9V.

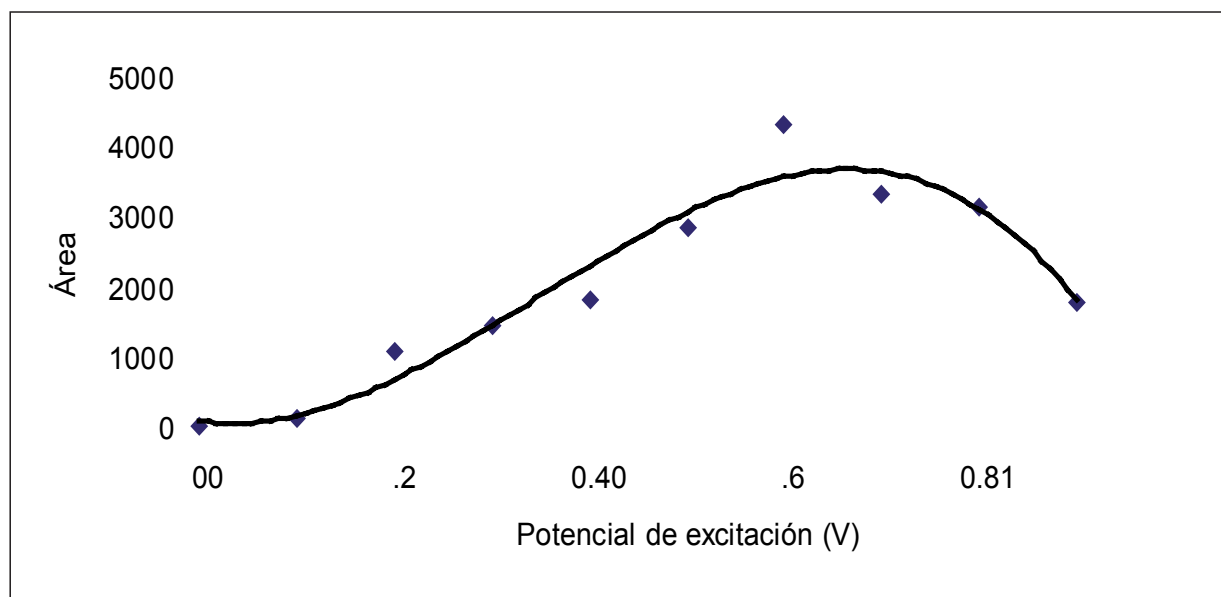


Fig. 3.3.6b: Señal obtenida para el ion 131 en función del potencial de excitación aplicado

Como se puede observar en la figura 3.3.6b, la máxima señal para el ion 131 se obtiene al aplicar el potencial de excitación de 0,6V. Por ello la configuración final utilizada para el modo CI-MS/MS fue la siguiente:

- Tipo de ionización: ionización química – masas/masas (CI-MS/MS)
- Gas de ionización: metanol
- Amplitud de excitación: **0,6 V**
- Ion precursor: m/z 189
- Ion producto: m/z 131
- Escaneos promediados por punto: 5
- Frecuencia de datos: 1.0 Hz

En el punto 3.3.3 se comentaron las ventajas de un monitoreo o escaneo del tipo masas-masas (MS/MS). Puede verse en la figura 3.3.6b el pico cromatográfico del MMPB bajo la configuración arriba mencionada. Como se evidencia, la línea de base o ruido es reducida a valores nulos. Esto es consecuencia del escaneo altamente específico del proceso MS/MS, donde la señal cromatográfica resulta del monitoreo de un ion producto proveniente de un único ion precursor. Así es posible reducir casi completamente los problemas de interferencias de una determinación. Estos inconvenientes de interferencias suelen presentarse cuando se realizan monitoreos en matrices complejas, tales como aguas de cursos naturales, donde el aporte de sustancias químicas a la propia matriz es elevado en variedad y concentración.

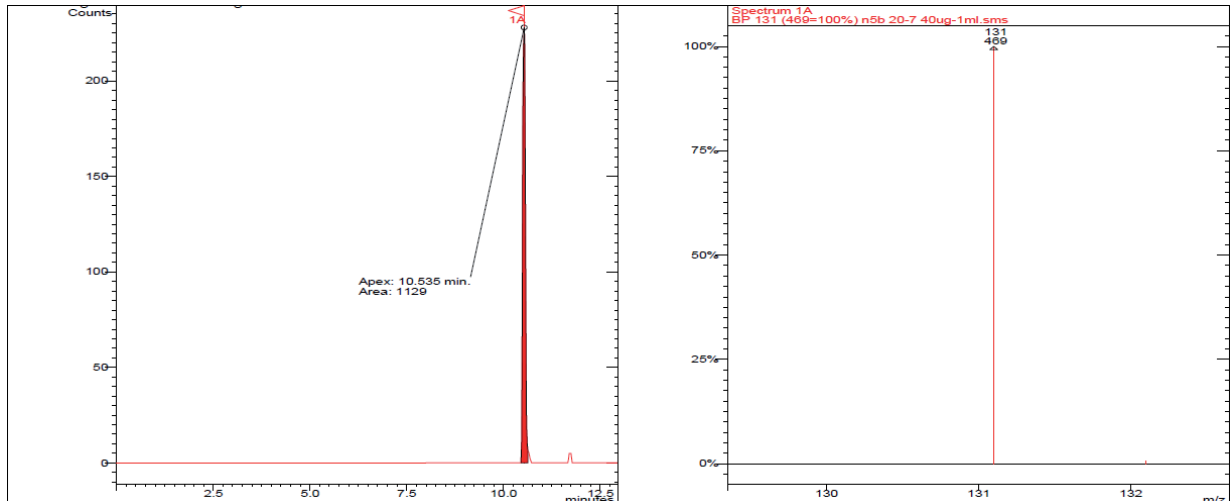


Fig. 3.3.6b: Cromatograma realizado en modo CI-MS/MS inyectando 5 μL de extracto MMPB (provenientes de 1 $\mu\text{g/L}$ de microcistina-LR) y espectro correspondiente a los 10,54 min. Relación señal / ruido = 689

En la figura 3.3.6c se presenta la interpretación del espectro de masas obtenido mediante el modo CI-MS/MS. Se puede observar que el ion producto observado de m/z 131 es el mismo que el obtenido mediante el modo EI-MS/MS debido a su gran estabilidad relativa.

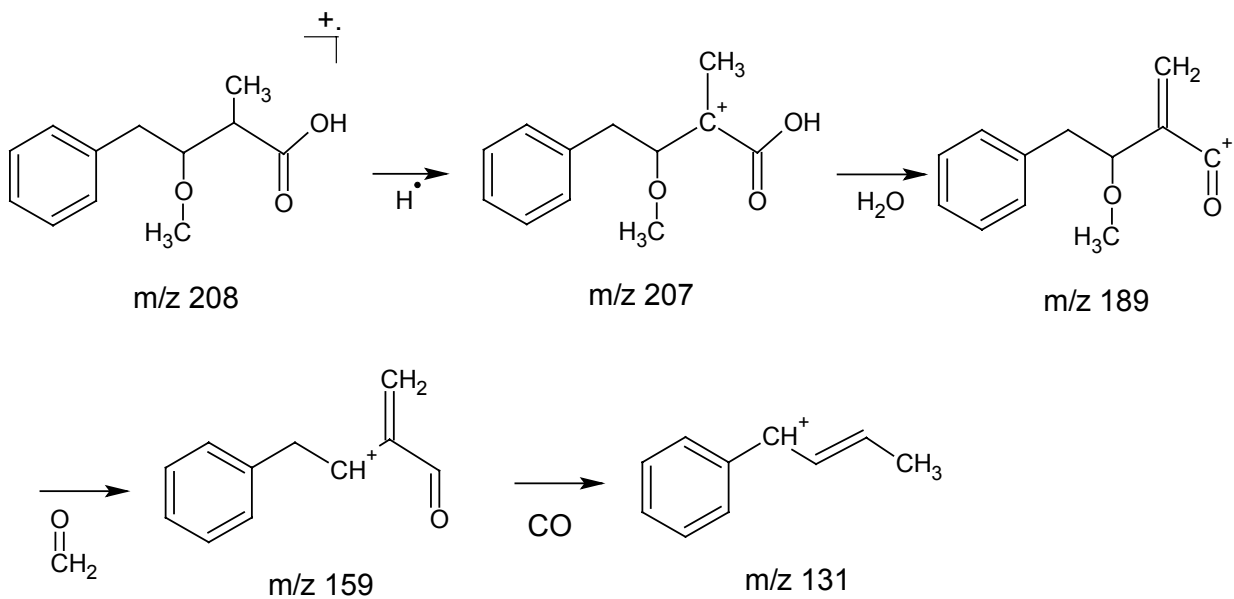


Fig. 3.3.6c: Justificación espectro de CI-MSMS

La Figura 3.3.5d presenta la curva de calibración obtenida a partir de los datos de la tabla siguiente:

	Concentración original de microcistina-LR	Área
Blanco	0,0 $\mu\text{g/L}$	13
Nivel 1	0,5 $\mu\text{g/L}$	401
Nivel 2	1,0 $\mu\text{g/L}$	811
Nivel 3	2,5 $\mu\text{g/L}$	2693
Nivel 4	5,0 $\mu\text{g/L}$	3613

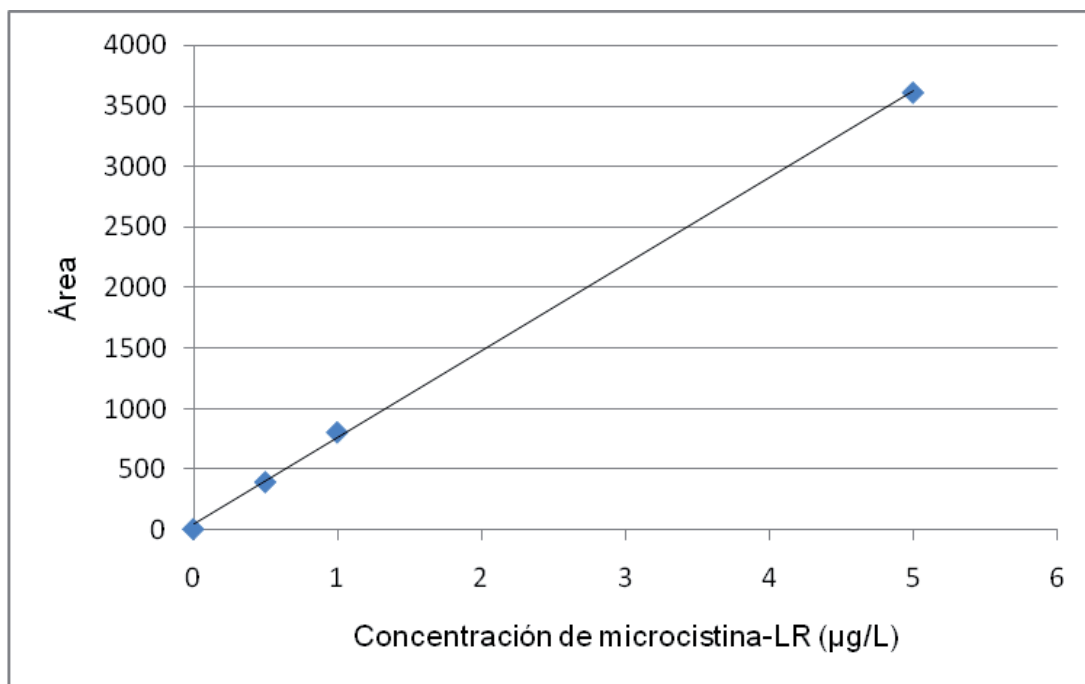


Fig. 3.3.6d: Curva de calibración en modo CI-MS/MS. R=0,9997

Al igual que en la configuración CI-SIS, el modo CI-MS/MS muestra resultados de LD y LQ, repetibilidad y relación señal/ruido adecuados para alcanzar el nivel guía de 1,0 µg/L de microcistina-LR establecido por la OMS para agua potable. El ajuste de la calibración que se muestra en la figura 3.3.6d ofrece muy buen ámbito lineal para el rango de concentración ensayado.

Discusión

Como se puede observar en la Figura 4a y en las curvas de calibración presentadas en la sección de desarrollo experimental y resultados, se puede afirmar que la metodología de ionización química resulta adecuada para el análisis del derivado MMPB y permite obtener la mejor intensidad de señal y alcanzar un nivel de detección más bajo.

Al comparar los espectros obtenidos por ionización química con los de impacto electrónico se puede apreciar que los primeros producen un menor número de fragmentaciones. Esto resulta favorable para la detección y cuantificación de compuestos que requieren del monitoreo de su ion molecular. Sin embargo, al no tratarse de condiciones estandarizadas de ionización, no es posible la identificación inequívoca por comparación con bibliotecas de espectros.

Por otro lado, la ionización por impacto electrónico produce un mayor número de fragmentaciones que bajo condiciones estandarizadas permiten obtener un espectro característico para el compuesto buscado que puede verificarse mediante bibliotecas de espectros.

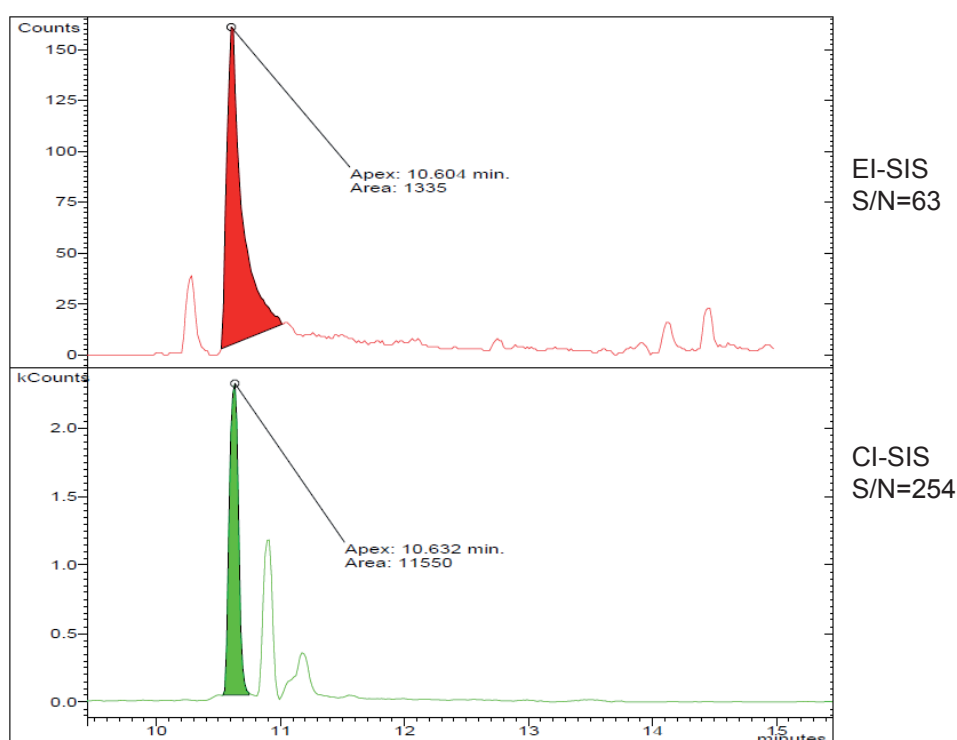


Fig. 4a: Comparación de los cromatogramas obtenidos en los modos EI-SIS y CI-SIS.

A partir de estos estudios previos se decidió comenzar el desarrollo experimental utilizando el modo de impacto electrónico, que permitió a partir del análisis de las fragmentaciones establecer la identidad del pico correspondiente al MMPB y definir su tiempo de retención para las condiciones establecidas inicialmente en el cromatógrafo gaseoso. Luego se realizaron ajustes en el programa de temperatura para disminuir el tiempo total de la corrida cromatográfica sin alterar significativamente el tiempo de retención del MMPB.

Una vez determinado el tiempo de elución mediante la ionización por impacto electrónico, se pudo establecer el espectro correspondiente al MMPB para la modalidad de ionización química. Se observó que el ion característico de la ruptura del MMPB frente a esta forma de ionización es el de relación m/z 189. Al realizar el monitoreo selectivo para este ion, se observó una notable disminución de las potenciales interferencias debido a compuestos con tiempos de elución cercanos al del MMPB.

Se estudió la aplicación del modo masas/masas para los modos EI y CI utilizando los iones de m/z 176 y 189 respectivamente como precursores. Se determinó que el principal producto de fragmentación para ambos modos posee una relación m/z 131. Este modo permitió atenuar notablemente el ruido y las señales

debidas a otros compuestos cercanos en tiempo de elución, lo que disminuye aún más la posibilidad de interferencias. Como es de esperar, este modo también conlleva una disminución en la respuesta para una misma cantidad de analito, pero esto se compensa con la atenuación de la línea base, obteniéndose una mejor relación señal/ruido, como se muestra en las Figura 4b y 4c.

El modo de ionización química y escaneo selectivo de iones (CI-SIS), por su mayor sensibilidad, resulta favorable para muestras con baja concentración de analito y matrices simples como aguas tratadas. En cambio el modo de ionización química y escaneo por masas en tándem (CI-MS/MS), es el ideal para trabajar con matrices complejas como aguas de reservas naturales debido a su mayor selectividad.

Se observó que tanto la metodología CI-SIS como la CI-MS/MS tienen una repetibilidad aceptable para este tipo de análisis. Como se presentará en la siguiente sección, se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación para el modo CI-MS/MS.

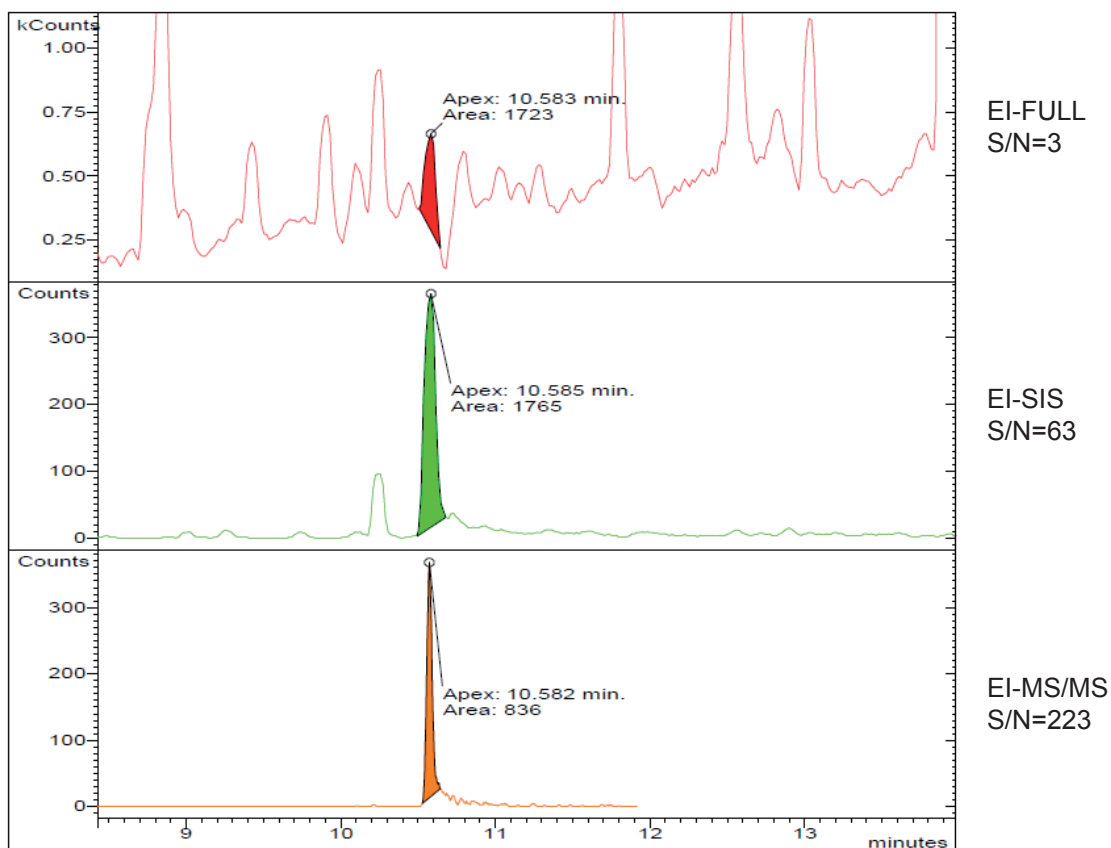


Fig. 4b: Comparación entre distintos modos de escaneo para la ionización por impacto electrónico

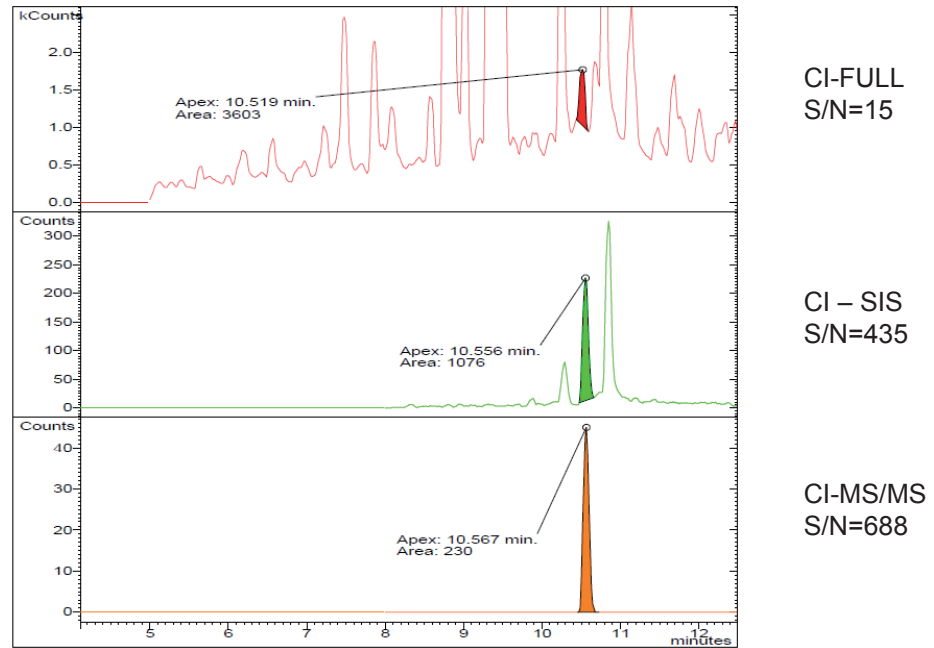


Fig. 4c: Comparación entre distintos modos de escaneo para la ionización química

Estudio de repetibilidad (para el modo CI-MS/MS):

Para determinar la repetibilidad se realizaron inyecciones consecutivas de un mismo extracto de concentración conocida bajo las mismas condiciones metodológicas detalladas para el modo CI-MS/MS. Se utilizó un extracto proveniente de 0,5 µg/L de microcistina-LR y otro de concentración original de 5 µg/L de microcistinas. Los valores obtenidos se muestran en la Figuras 4d y 4e.

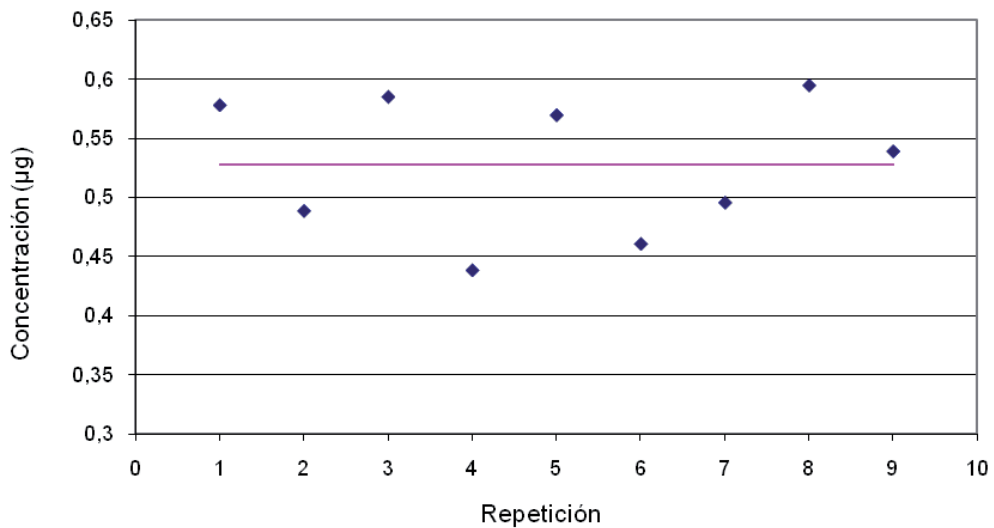


Fig. 4d: Distribución de valores de concentración obtenidos a partir de inyecciones consecutivas de un mismo extracto de MMPB provenientes de 0,5 µg/L de microcistina-LR corridos bajo el modo CI-MS/MS

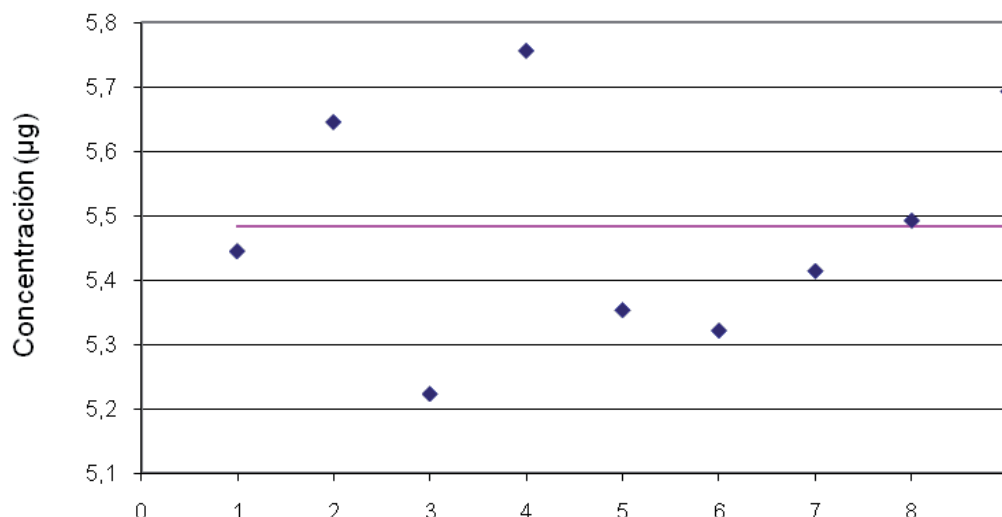


Fig. 4e: Distribución de valores de concentración obtenidos a partir de inyecciones consecutivas de un mismo extracto de MMPB provenientes de 5,0 µg/L de microcistina-LR corridos bajo el modo CI-MS/MS

A partir de los resultados obtenidos para el extracto de 0,5 µg/L de MC-LR mostrados en la figura 4d se realizó el cálculo de repetibilidad expresado como desvío estándar (S). Luego se determinó el límite de detección (LD) como 3,14 veces el desvío estándar y el límite de cuantificación (LQ) como 10 veces el desvío estándar. Los resultados se presentan a continuación en la Figura 4f.

	Área	Valor determinado
Valor Teórico 0,5 µg/L	461	0,578 µg/L
	397	0,488 µg/L
	466	0,585 µg/L
	361	0,438 µg/L
	455	0,570 µg/L
	377	0,460 µg/L
	402	0,495 µg/L
	473	0,595 µg/L
	433	0,539 µg/L
Promedio	425,0	0,528 µg/L
Desv. Est.	41,8	S = 0,058 µg/L
LD		0,2 µg/L
LQ		0,6 µg/L

Fig. 4f: Datos utilizados para el cálculo de la desviación estándar, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Conclusiones

Con respecto a la etapa de extracción y concentración del ácido MMPB, se determinó que la técnica de la SPE es la que permite la mayor concentración del analito, con resultados más reproducibles que la extracción líquido-líquido.

En cuanto a la modalidad de detección en el espectrómetro de masas, la ionización química resulta más selectiva y sensible con respecto al modo de impacto electrónico. Utilizando entonces la ionización química, se determinó que el modo SIS produce mayor señal que el modo MS-MS, sin embargo este último resulta un proceso de monitoreo más selectivo. Debido a esto, el modo SIS resultará indicado para muestras provenientes de matrices libres de interferencias mayores como aguas potabilizadas, mientras que el MS-MS es más adecuado para matrices complejas (aguas de origen natural como ríos y lagos). Ambos modos permiten alcanzar los valores guía establecidos por la OMS para la concentración admisible de microcistina-LR en agua potable.

Sobre la base del análisis estadístico, se han presentado los resultados para el ámbito de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión para el modo de ionización química y escaneo por masas en tándem (CI-MS/MS), que resulta el de mayor interés para trabajar en matrices complejas. Los valores obtenidos muestran que el método desarrollado es adecuado en lo que respecta tanto a la sensibilidad como a la precisión del mismo.

La metodología ensayada y puesta a punto puede consumir un tiempo considerable y no permite distinguir entre diferentes variantes de microcistinas; sin embargo, debido a que todas las microcistinas poseen el poco frecuente péptido Adda, es un método que detecta la totalidad de las microcistinas presentes, incluso aquellas que se encuentren ligadas a otras estructuras celulares. Resulta así, una eficiente herramienta como criterio negativo de presencia de microcistinas.

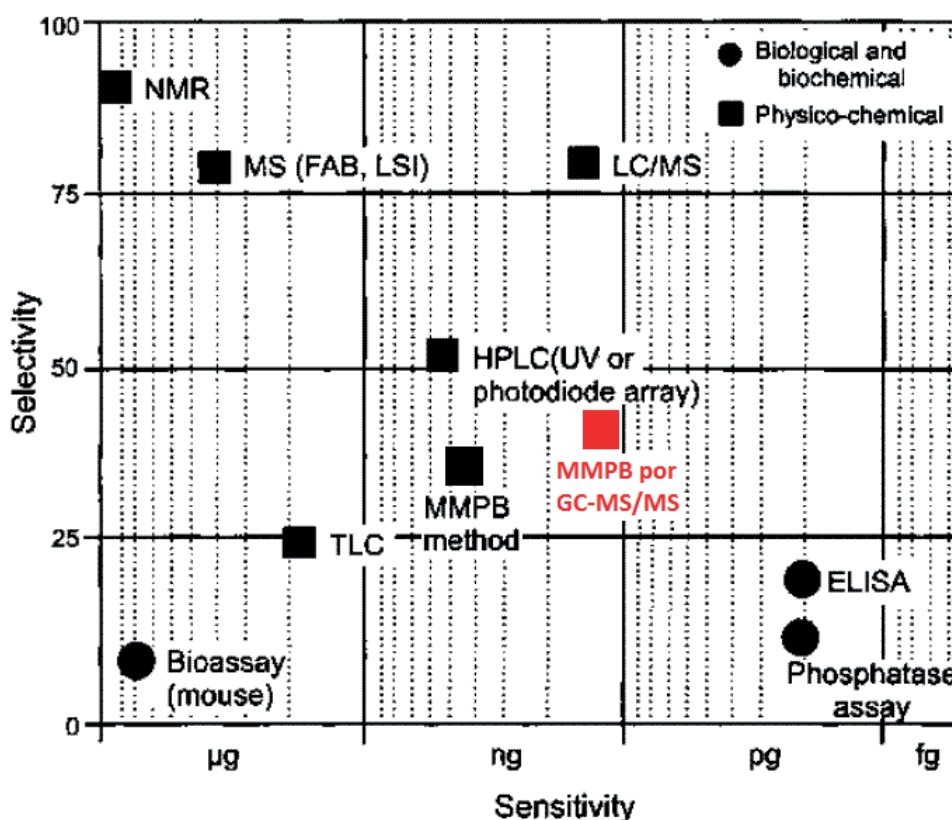


Fig. 5: Sensibilidad y selectividad del método desarrollado (en rojo) respecto de las metodologías existentes

Como conclusión final, cabe mencionar que el presente trabajo ha permitido el desarrollo completo de una técnica analítica adecuada para la determinación de microcistinas en agua de cursos naturales

así como agua potabilizada. Como se puede observar en la figura 5, el método desarrollado ofrece un avance en relación a los parámetros de sensibilidad y selectividad que los métodos existentes basados en la detección del derivado MMPB.

Referencias

- Azevedo, S. M. F. O., W. W. Carmichael, E. M. Jochimsen, K. L. Rinehart, S. Lau, G. R. Shaw & G. K. Eaglesham. 2002. *Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil*. *Toxicology* **181/182** (441-446).
- Briand, J., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J. 2003. *Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems*. *Vertebrate Research* **34** (361-377).
- Chorus, I. and Bartram, J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO.
- Falconer, I. R., Yeung, D. S. K. 1992. *Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins*. *Chemico-Biological Interactions*. **81** (81-196).
- Giannuzzi, L., A. Colombi, T. Pruyas, A. Aun, M. Rujana, M. Falcione & J. Zubieta. 2009. *Cianobacterias y cianotoxinas: identificación, toxicología monitoreo y evaluación de riesgo*. Corrientes, Moglia Impresiones (238pp).
- Harada, K.-I., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M. and Beasley, V.R. 1988. *Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *J. Chromatog.* **448** (275-283).
- Harada, K.-I., Suzuki, M., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W. and Rinehart, K.L. 1988. *Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria*. *Toxicon* **26** (433-439).
- Harada K. I., Murata H., Qiang Z., Suzuki, M., Kondo F. 1996. *Mass spectrometric method for microcystins in cyanobacteria*. *Toxicon* **34**. (701-710).
- Ito, E., Kondo, F., Terao, K. and Harada, K. I. 1997. *Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR*. *Toxicon* **35** (1453-1457).
- Kfir, R., Johannsen, E. and Botes, D.P. 1986. *Monoclonal antibody specific for cyanoginosin-LA: Preparation and characterization*. *Toxicon* **24** (543-552).
- Kiyomi Tsujia*, Hiroaki Masuib, Hitoshi Uemuraa, Yasuaki Moria, Ken-ichi Haradab. 2001. *Analysis of microcystins in sediments using MMPB method*, *Toxicon* **39** (687-692).
- Kunimitsu Kaya*, Tomoharu Sano. 1999. *Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard*. *Analytica Chimica Acta* **386** (107-112).
- Lawton, L.A., Edwards, C. and Codd, G.A. 1994. *Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters*. *Analyst* **119** (1525-1530).
- Lawton, L.A., Edwards, C., Beattie, K.A., Pleasance, S., Dear, G.J. and Codd, G.A. 1995. *Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of Microcystis aeruginosa and from an associated animal toxicosis*. *Natural Toxins* **3** (50-57).
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G.A. 1990. *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*. *FEBS Lett.* **264** (187-192).

Milla-Riina Neffling, Emilie Lance, Jussi Meriluoto. 2010. *Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography–tándem mass spectrometry*. *Environmental Pollution* **158** (948–952).

Moucun Yuana, Wayne W. Carmichaela, Elizabeth D. Hilborn. 2006. *Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996*. *Toxicon* **48** (627–640).

Vela L., Sevilla E., Martín B., Pellicer S., Bes Ma. T., Fillat M. F. y Ma. L. Peleato. 2007. *Las microcistinas*. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. **62** (135-146).

Bibliografía consultada

Chorus, I. and Bartram, J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO.

Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment. 2002. *Blue-green algae: their significance and management within water supplies*. CRC for Water Quality and Treatment.

Giannuzzi, L., A. Colombi, T. Pruyas, A. Aun, M. Rujana, M. Falcione & J. Zubieta. 2009. *Cianobacterias y cianotoxinas: identificación, toxicología monitoreo y evaluación de riesgo*. Corrientes, Moglia Impresiones (238pp).

Laura Vela, Emma Sevilla, Beatriz Martín, Silvia Pellicer, M. Teresa Bes, María F. Fillat, M. Luisa Peleato. 2007. *Las microcistinas*. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. **62** (135–146).

El desarrollo de esta Tesis de Licenciatura dio origen a 2 presentaciones. La primera fue en el XXVII Congreso Argentino de Química, organizado por la Asociación Química Argentina y llevado a cabo en la Universidad Nacional de Lanús del 13 al 16 de setiembre de 2010. La presentación se realizó en forma de póster en la Sección Química Analítica, el día 14 de setiembre de 2010.

La segunda presentación se realizó en el Taller de Cianobacterias Toxígenas organizado por la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas y llevado a cabo en el Centro de Estudios de Biodiversidad y Biotecnología de Mar del Plata del 22 al 25 de setiembre de 2010. Esta presentación se realizó en forma de exposición oral el día 23 de setiembre de 2010.

En ambos eventos el trabajo presentado fue el siguiente:

DETERMINACION DE MICROCISTINAS EN AGUAS DE CAPTACION Y TRATADAS

Autores: Ardanaz, Sebastián M.²; Vuolo, Juan C.¹; Di Risio, Cecilia²; González, María Carolina¹; Silva, María L.¹; Morón, Adriana I. ¹

¹ Laboratorio Central, AySA S.A., Av. Figueroa Alcorta 6081 (CP:1428), CABA, Argentina
juan_c_vuolo@aysa.com.ar

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano.
sebastian.ardanaz@gmail.com

Glosario

Adda: (ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(E), 6(E)-dienoico)

C18: cadena carbonada de 18 átomos de C. Forma el sorbente basado en sílica más hidrofóbico disponible comercialmente.

CI: Chemical Ionization o ionización química

EI: electronic impact o impacto electrónico

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GC: Gas Chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LC: Liquid Chromatography o cromatografía líquida

MC: Microcistina (Ej.: MC-LR = microcistina-LR)

MMPB: 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutiric acid ó ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutanoico

MS: Mass Spectrometry o espectrometría de masas

MS/MS: espectrometría de masas en tándem

NMR: resonancia magnética nuclear

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDA: Photo-Diode Array o arreglo de foto-diodos

S/N: Relación señal / ruido

SPE: Solid Phase Extraction o extracción en fase sólida

TLC: Thin Layer Chromatography

UV: radiación ultravioleta