

# Determinación de cianotoxinas en aguas naturales

---

Por inyección directa y por liofilizado  
(SOP 7008UY y SOP7009UY)



Ministerio  
**de Ambiente**



# Generalidades de las cianotoxinas

- Metabolitos secundarios producidos por diversos géneros de cianobacterias
- Estructuralmente muy diversas (péptidos, alcaloides, LPS)
- Muy tóxicas
- Una misma toxina puede ser producida por múltiples géneros bacterianos
- No es suficiente con identificar los géneros o especies presentes para saber si una floración es tóxica
- La producción de toxinas es especie (y cepa) específica. En cada cepa la producción de toxinas varía con el tiempo y las condiciones ambientales



# Valores de referencia de cianotoxinas

## En Uruguay

- No hay reglamentación para el monitoreo de cianotoxinas en aguas superficiales o para uso recreacional (Decreto 253/79).
- Para agua potable OSE considera un valor máximo permitido de 1 µg/L de Microcistina-LR (Decreto 375/11)

Para aguas recreacionales la EPA (2019) establece valores únicamente para

**Microcistinas: < 8 µg/L**

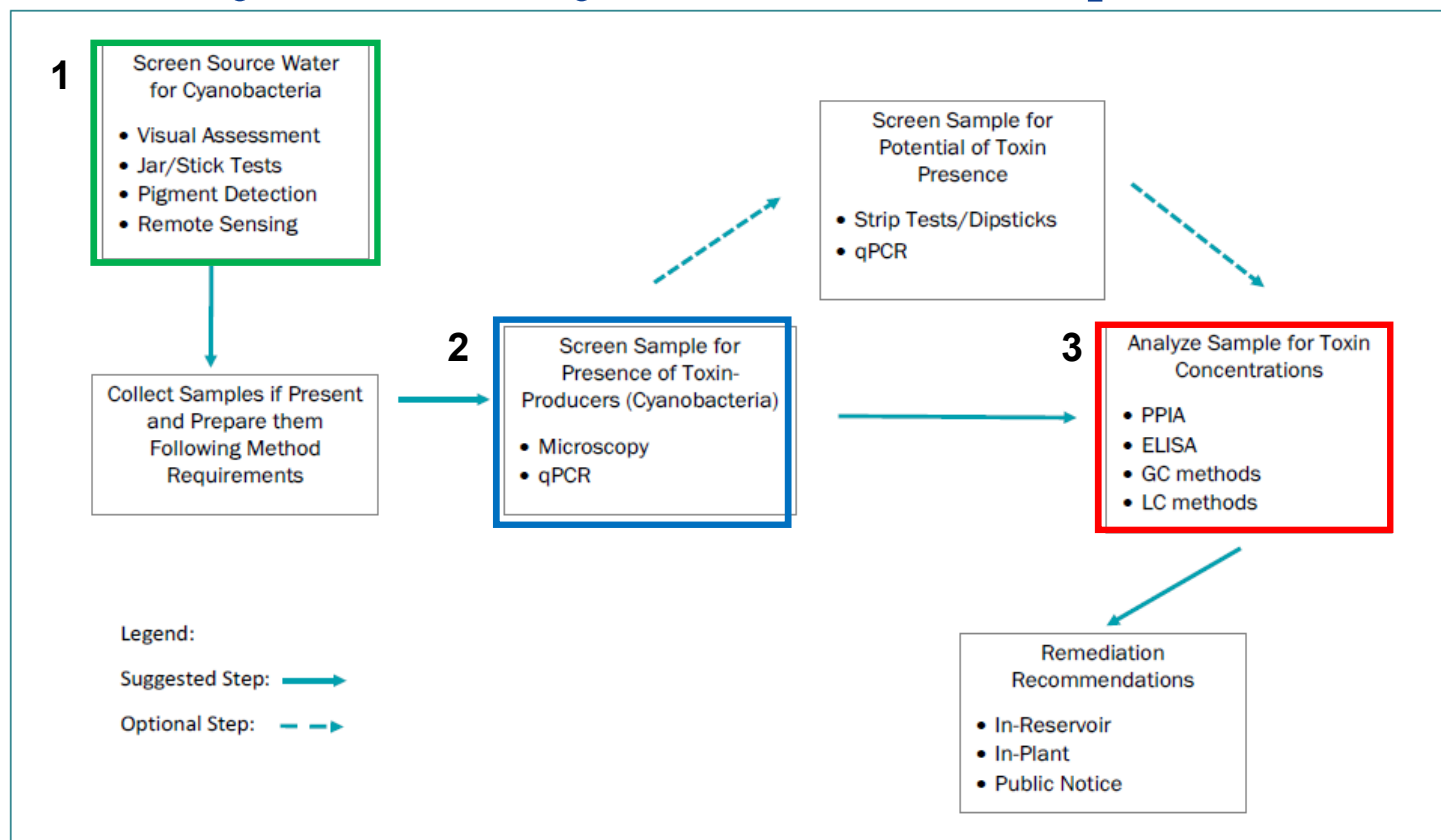
**Cilindrospermopsinas: < 15 µg/L**

Table 5.1 Guideline values and health-based reference values for selected cyanotoxins and exposure scenarios (WHO, 2020)

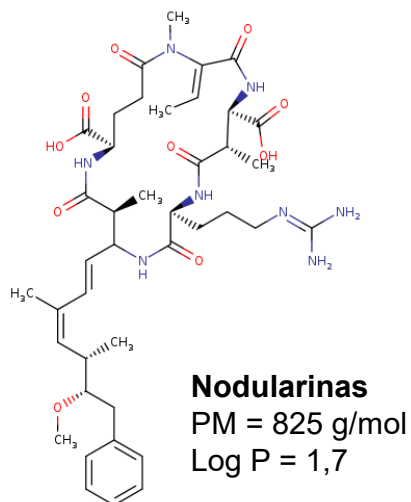
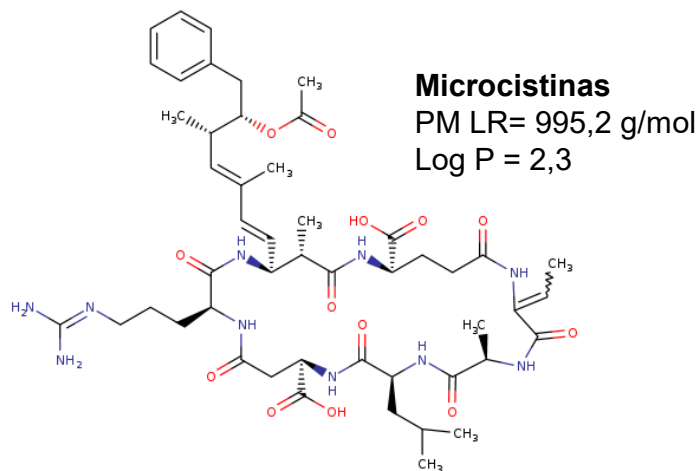
Toxin	Exposure <sup>a</sup>	Value (µg/L)	Value type <sup>b</sup>
Microcystin-LR	Drinking-water, lifetime	1	Provisional guideline value
Microcystin-LR	Drinking-water, short term	12	Provisional guideline value
Microcystin-LR	Recreational	24	Provisional guideline value
Cylindrospermopsin	Drinking-water, lifetime	0.7	Provisional guideline value
Cylindrospermopsin	Drinking-water, short term	3	Provisional guideline value
Cylindrospermopsin	Recreational	6	Provisional guideline value
Anatoxin-a	Drinking-water, acute	30	Health-based reference value
Anatoxin-a	Recreational	60	Health-based reference value
Saxitoxin	Drinking-water, acute	3	Guideline value
Saxitoxin	Recreational	30	Guideline value

For details on derivation of individual values see sections 2.1–2.4.

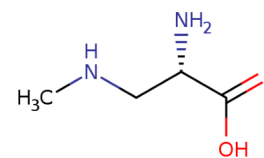
# Monitoreo de floraciones de cianobacterias: flujo de trabajo recomendado por EPA



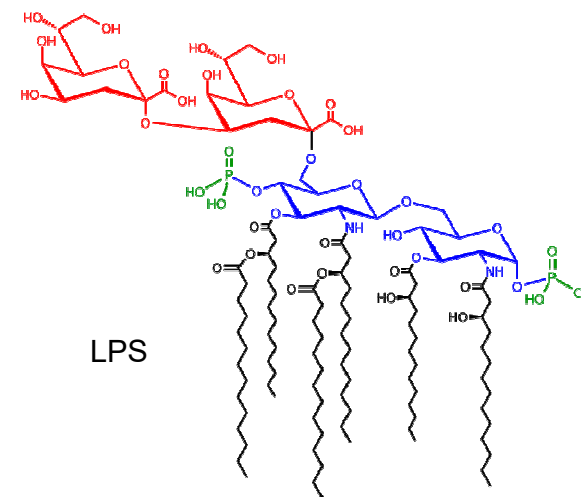
## Péptidos cíclicos (>200)



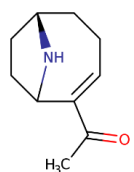
## otros



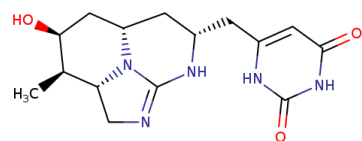
$\beta$ -N-methylamino-L-alanine  
(BMAA)



LPS

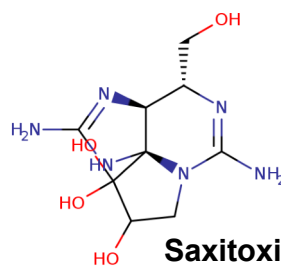


Anatoxina



**Cilindrospermopsinas**  
PM = 415 g/mol  
Log P = -2,6

## Alcaloides (>50)



**Saxitoxina**  
PM = 299 g/mol  
Log P = -4,6

# **Métodos de detección de cianobacterias y cianotoxinas en Laboratorio DINACEA**

- Detección de pigmentos: clorofila-a (SOP 7004UY) y ficocianina (SOP 7003UY)
- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (SOP 7005UY)
- HPLC-UV (Cromatografía líquida acoplada a detector UV) (SOP 7006)
- LC-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tándem) (SOP 7008UY y SOP 7009UY)

# Metodologías de referencia utilizadas por LC-MS/MS:

EPA/600/R-17/130 Single Laboratory Validated Method for Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Ambient Freshwaters by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS).

METHOD 544. Determination of Microcystin and Nodularin in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography /Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS).

Meriluoto, J., (editor); Spoof, L., (editor); Codd, G. A., (editor). (2017). Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Primer edición. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd.

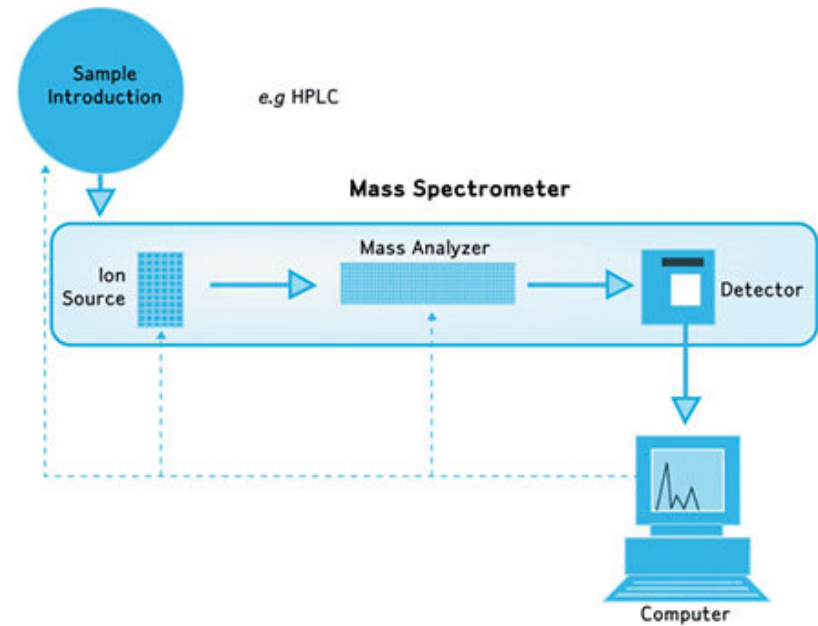
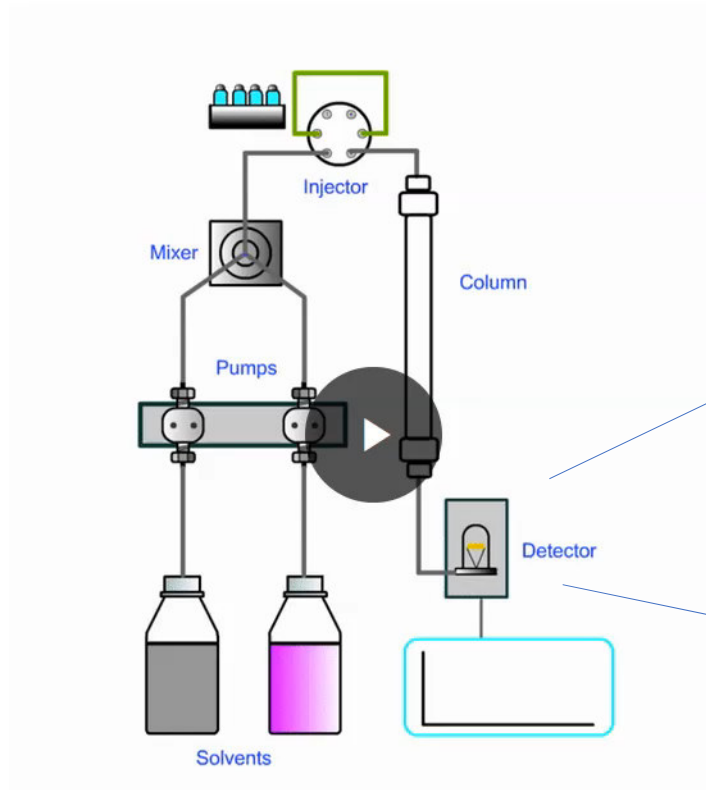
Pekar, H. et al. (2015). Fast, rugged and sensitive ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for analysis of cyanotoxins in rawwater and drinking water—First findings of anatoxins, cylindrospermopsins and microcystin variants in Swedish sourcewaters and infiltration ponds. J. Chromatogr. A 1429 (2016) 265–276.

Brena, B. et al. (2021). Microcystin ELISA in water and animal serum for an integrated environmental monitoring strategy. International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

Yang, X. et al.(2017). Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method Coupled with Dispersive Solid-Phase Extraction for Simultaneous Quantification of Eight Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. Toxins 2017, 9, 206.

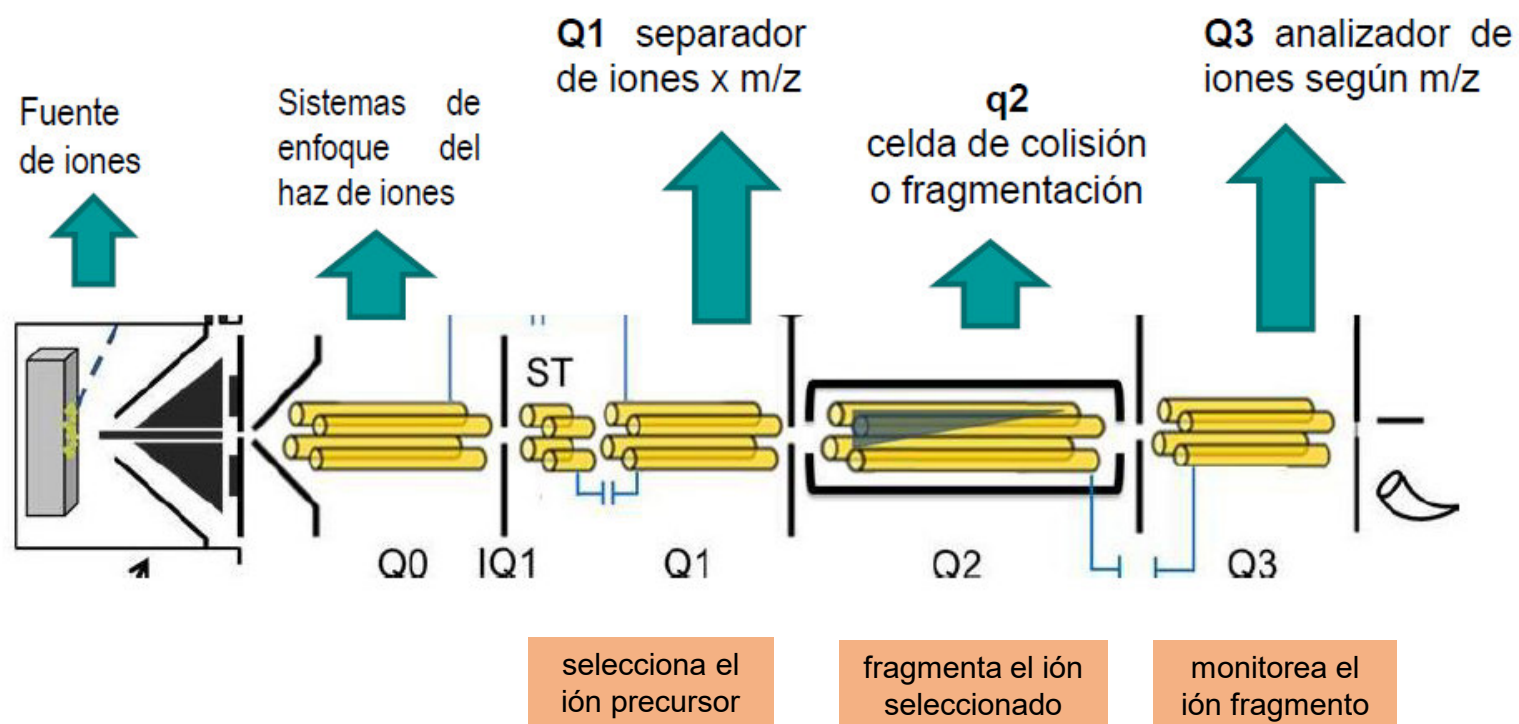
Haddad, S. et al. (2019). Determination of microcystins, nodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsin, and saxitoxin in water and fish tissue using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1599 (2019) 66–74.

# Cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tándem

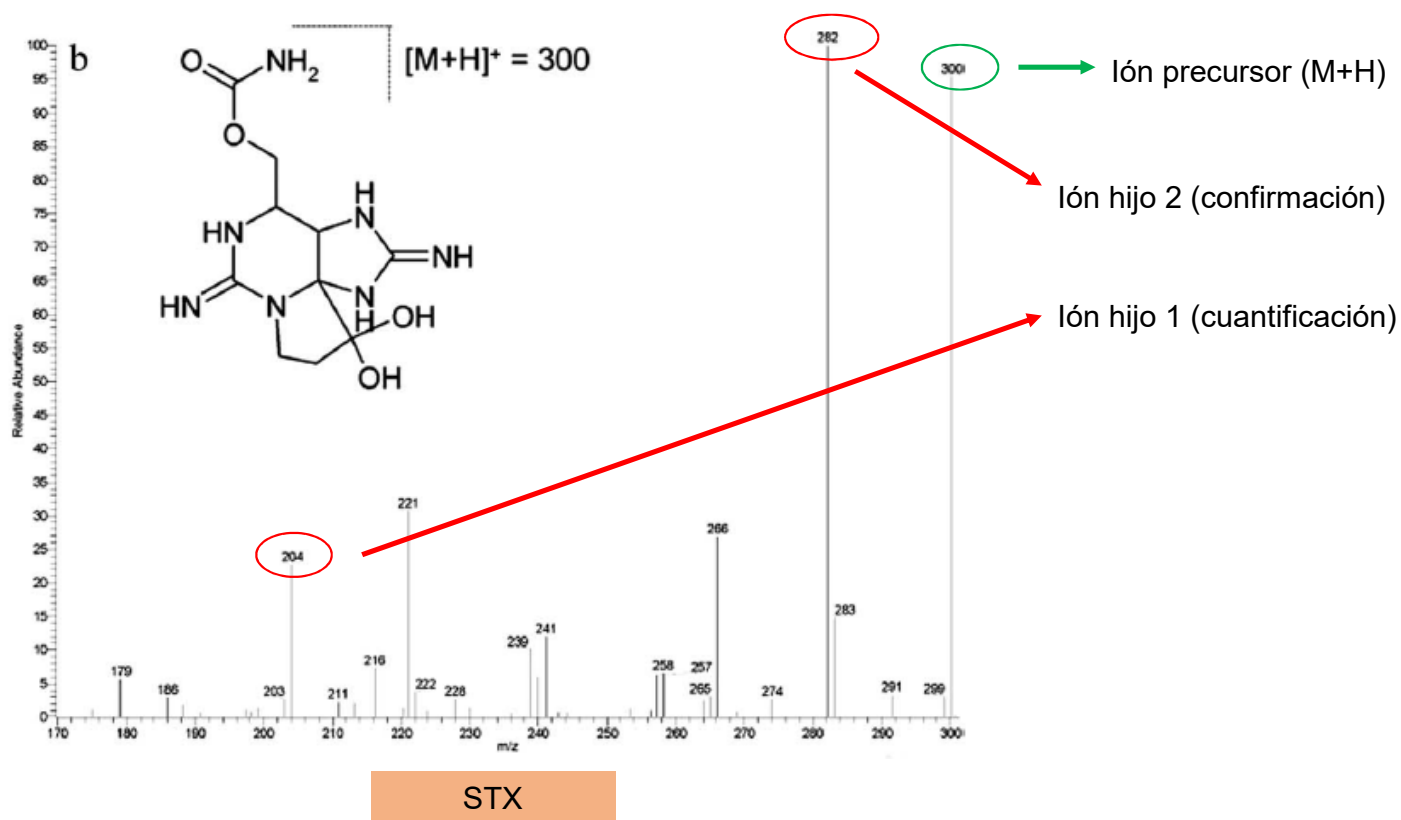




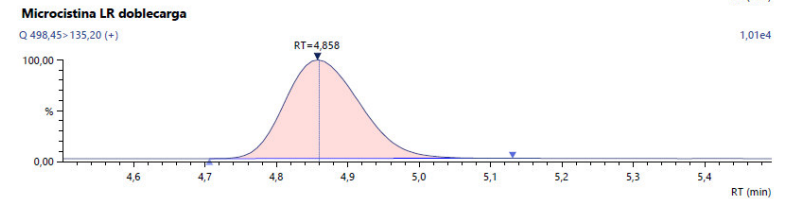
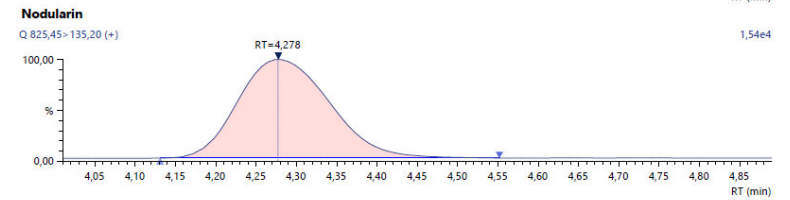
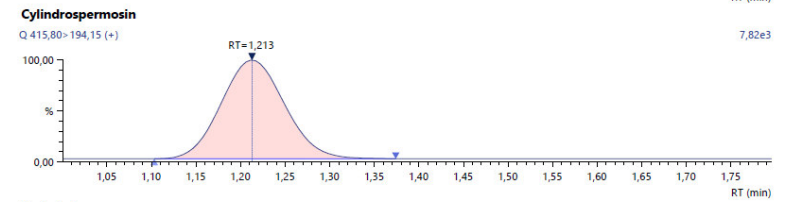
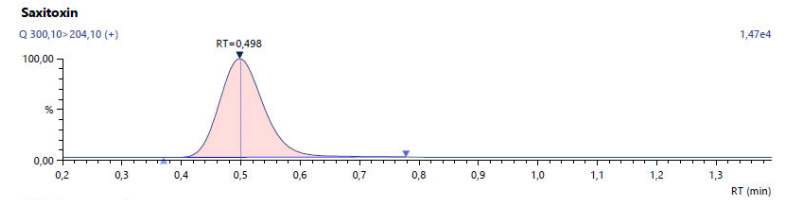
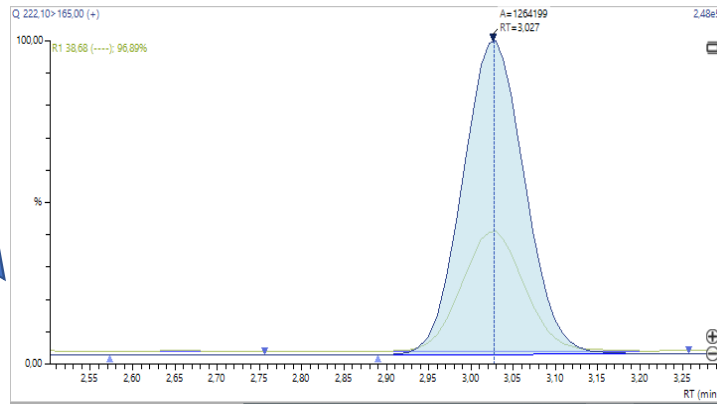
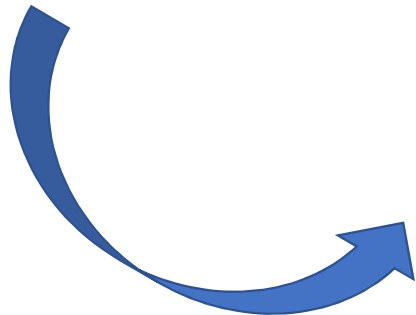
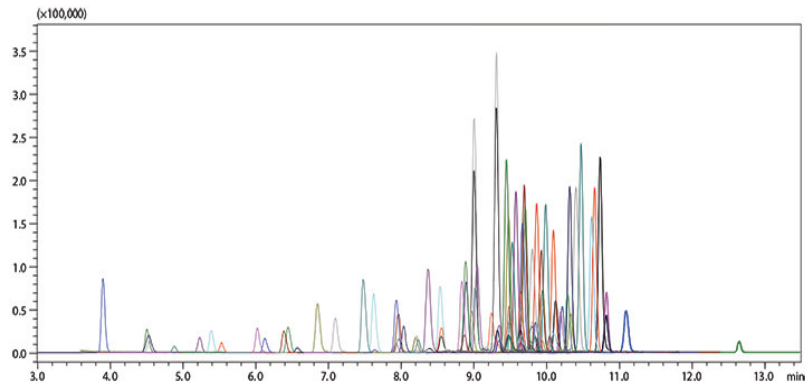
# Detector de masas/masas: Triple cuadrupolo



# Espectros de fragmentación (MS/MS)



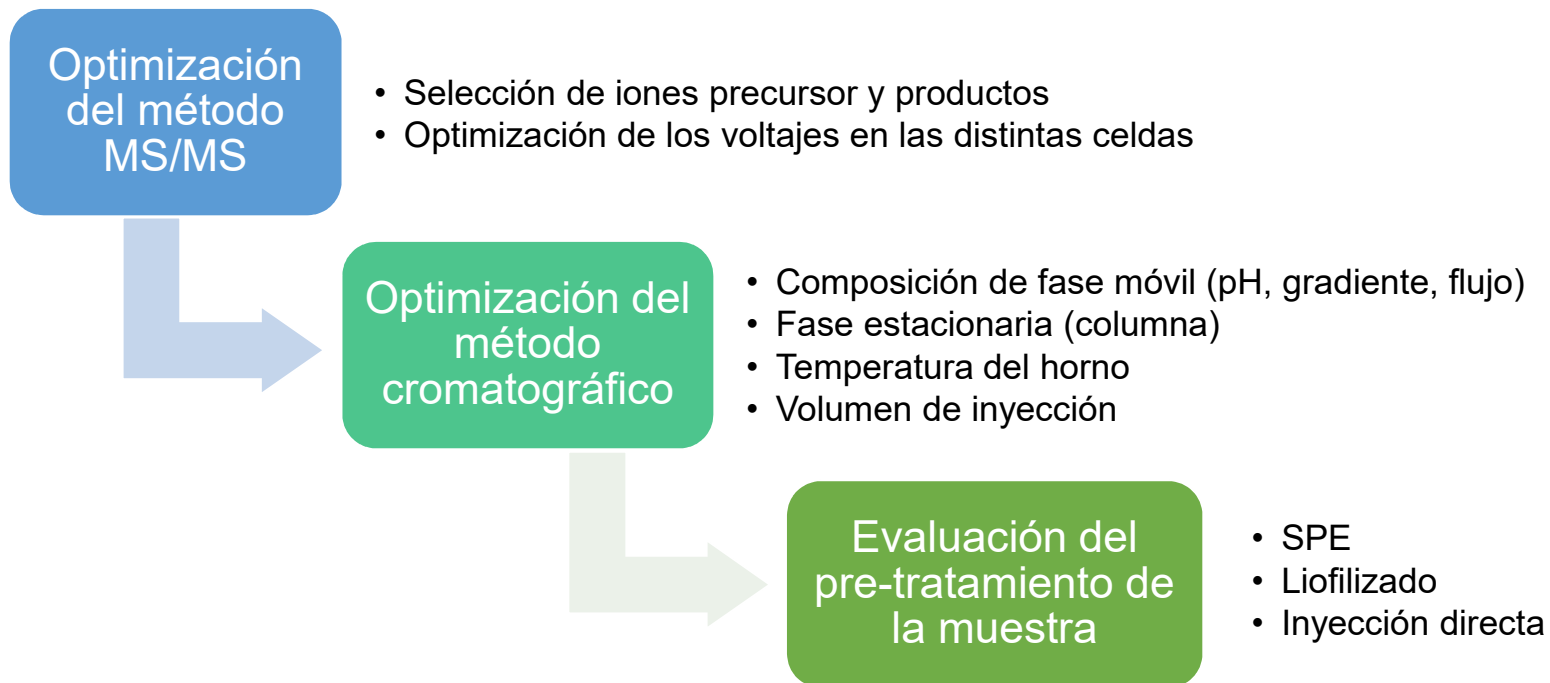
# ¿cómo visualizamos? Ejemplo de cromatograma



## Equipamiento: LC-MS/MS



# Desarrollo y validación de un método de detección de cianotoxinas en aguas naturales



## Parámetros óptimos para cada cianotoxina

Cianotoxina	Tiempo de retención (min)	Ión precursor (m/z)	Ión cuantificación (m/z)	Iones referencia (m/z)	Q1 (V)	CE (eV)	q3 (V)
Microcistina LR (Mic-LR)	5,0	498,5	135,2		-28	-15,9	-25
				103,0	-26	-47,5	-33
Cilindrospermopsina (CYL)	1,2	415,8	194,2		-20	-35,8	-38
				336,2	-12	-24,2	-22
				176,2	-20	-35,8	-36
Nodularina (NOD)	4,5	825,5	135,2		-20	-55	-12
				781,4	-20	-35,8	-20
				389,3	-20	-41,2	-12
Saxitoxina (STX)	0,5	300,1	204,1		-20	-18,3	-28
				282,1	-20	-24,9	-20

# Condiciones cromatográficas óptimas

Fase móvil:

Flujo: 0,4 mL /min

Canal A: Buffer Formiato-Fórmico (pH 3,7)

Canal B: Metanol

Condiciones de gradiente

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	97	3
0.5	50	50
2.5	45	55
5.5	25	75
7.5	15	85
9.0	15	85
9.01	97	3
13	97	3

Inyección:

Volumen inyección del método: 5 µL

Columna:

Raptor ARC-18, 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm. Temperatura: 35 °C.

Condiciones de ionización:

Interface: ESI (modo positivo)

Voltaje de la Interface :4000 V\*

Detector MS/MS:

Nebulizing Gas Flow: 2 L/min

Heating Gas Flow: 10 L/min

Interface Temperature: 200 °C.

Desolvation Temperature: 355 °C.

DL Temperature: 250 °C.

Heat Block Temperature: 400 °C.

# Validación: cifras de mérito

Límite de cuantificación

Precisión (%RSD)

Exactitud (% de recuperación)

Linealidad

Efecto matriz

Incertidumbre

Para métodos multiresiduos nos basamos en la Guía SANTE 2021 (Unión Europea)

Y además cumplir con la Identificación de compuestos según la guía SANTE, :

- ✓ Tiempos de retención  $\pm 0,1$  min
- ✓ Mínimo 2 iones producto por cada precursor
- ✓ Relación entre las intensidades de los iones producto  $\pm 30\%$  relativa al ión más intenso



# Criterios para la aceptación de los parámetros de validación

Analytical Quality Control and Method Validation procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANTE 11312/2021.

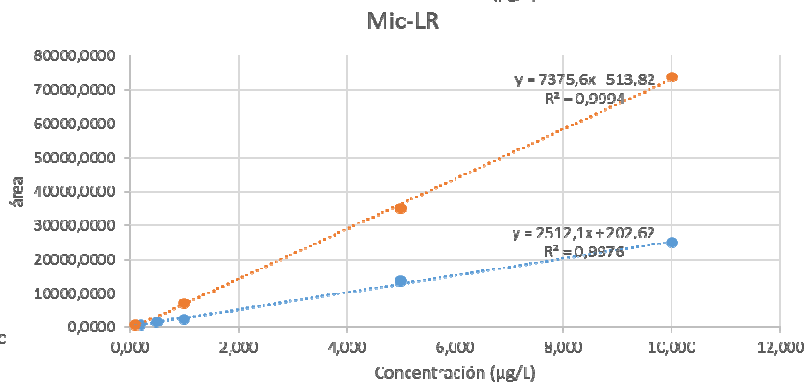
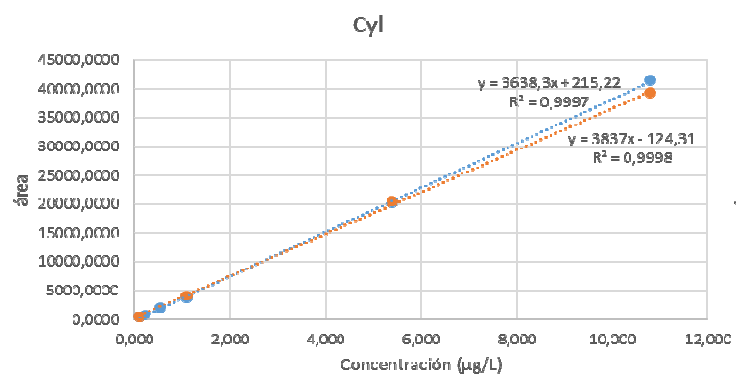
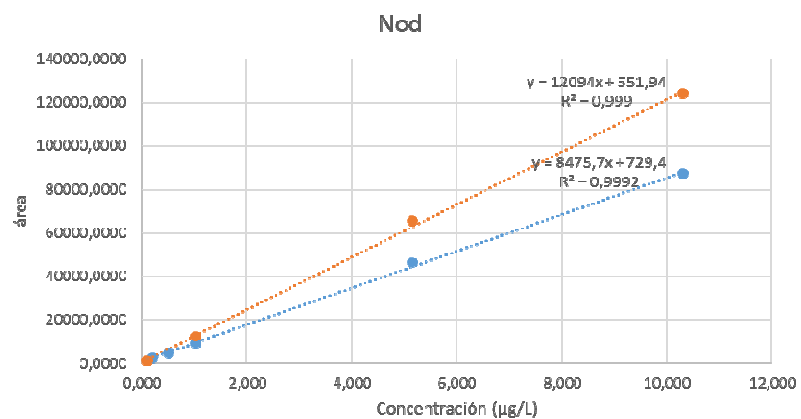
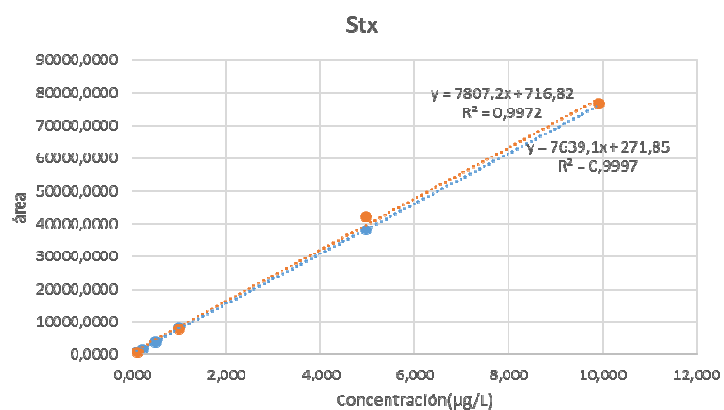
[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE\\_11312\\_2021.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf)

**Table 4.** Validation parameters and criteria.

Parameter	What/how	Criterion	Cross reference to AQC document
Sensitivity/linearity	Linearity check from five levels	Deviation of back-calculated concentration from true concentration $\leq \pm 20 \%$	C14-C19
Matrix effect	Difference of response from standard in matrix extract and standard in solvent	*	C21-C29 Glossary
LOQ	Lowest spike level meeting the identification and method performance criteria for recovery and precision	$\leq$ MRL	G6
Specificity	Response in reagent blank and blank control samples	$\leq 30 \%$ of RL	C41
Recovery	Average recovery for each spike level tested	70-120 %	G3,G6
Precision (RSD <sub>r</sub> )	Repeatability RSD <sub>r</sub> for each spike level tested	$\leq 20 \%$	G3, G6
Precision (RSD <sub>wr</sub> )	Within-laboratory reproducibility, derived from on-going method validation / verification	$\leq 20 \%$	G3, G6
Robustness	Average recovery and RSD <sub>wr</sub> derived from on-going method validation / verification	See above	G6, C39-C44
Ion ratio	Check compliance with identification requirements for MS techniques	Table 3	Section D
Retention time		$\pm 0.1$ min.	D2

\* in case of more than 20% signal suppression or enhancement, matrix effects need to be addressed in calibration (C22-C30)

## Linealidad y efecto matriz



● Matriz ● Solvente

*Porcentaje de recuperación obtenido para cada toxina con las metodologías seleccionadas*

Metodología/toxina	STX	CYL	NOD	MicLR
Inyección directa	99%	116%	110%	95%
Liofilizado	-	91%	81%	88%

*Efecto matriz observado para cada toxina con las metodologías seleccionadas*

Metodología/toxina	STX	CYL	NOD	MicLR
Inyección directa	-47%	-0,03%	-13%	-47%
Liofilizado	-	-20%	-12%	-5%

*Límite de cuantificación para cada toxina con las metodologías seleccionadas:*

Metodología/toxina	STX	CYL	NOD	MicLR
Inyección directa	0,2µg/L	0,2µg/L	0,5µg/L	0,5µg/L
Liofilizado	-	0,01µg/L	0,01µg/L	0,01µg/L

# Protocolo de análisis

## MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolectar la muestra en una botella de 0.5 L de vidrio ámbar, previamente enjuagada con hexano y acetona. La tapa debe incluir una contratapa de teflón o papel aluminio.
2. Las muestras deben ser analizadas tan pronto como sea posible desde su recepción al laboratorio. (Congelar las muestras a -20°C antes de las 24hs luego de la recolección).

## CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

1. Para preparar las curvas de calibración en matriz, se realiza el procedimiento de preparación de muestra utilizando agua bruta libre de los analitos de interés y se agrega la cantidad apropiada de un mix de cianotoxinas o diluciones del mismo en concentraciones crecientes de acuerdo con los rangos de trabajo establecidos y de manera que el punto más bajo de la curva de calibración, corresponda al límite de reporte y/o límite de cuantificación.
2. La curva de Matrix Match debe contener como mínimo 3 niveles de concentración.
3. De igual manera preparar un cero de curva, a partir de la muestra blanco y agua desionizada.

# SOP 7008UY

## Inyección directa

Parámetro	Límite de cuantificación (µg/L)
Microcistina LR	0,5
Nodularina	0,5
Cilindrospermopsina	0,2
Saxitoxina	0,2



3 ciclos de congelado-descongelado para la liberación de toxinas intracelulares



Homogeneizar



400 µL de muestra + 10 µL de ácido acético + 90 µL de solución de buffer FF:MeOH (80:20)



Vórtex + baño de ultrasonido (1 min) + filtro PVDF (0,22 µm)



# SOP 7009UY

## Liofilizado

Parámetro	Límite de cuantificación (µg/L)
Microcistina LR	0,01
Nodularina	0,01
Cilindrospermopsina	0,01



3 ciclos de congelado-descongelado para la liberación de toxinas intracelulares.  
Homogeneizar, tomar 50g de muestra.



Liofilización



Retomar en 5 mL sol. ác. acético 0,1%:metanol (25:75) vortex +ultrasonido 10min  
x2 lavados (2,5 mL c/u)



Centrifugado 5 min, 1200 xg



Sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo  
+ Evaporación (Rapidvap)



Retomar en 1 mL de buffer FF:Metanol 80:20



Vórtex + baño de ultrasonido (1 min)



+ filtro PVDF(0,22 µm)





Muchas gracias por su atención !!

Valentina Croce [valentina.croce@ambiente.gub.uy](mailto:valentina.croce@ambiente.gub.uy)  
Vivian Muñoz [vivian.munoz@ambiente.gub.uy](mailto:vivian.munoz@ambiente.gub.uy)



Ministerio  
**de Ambiente**

