

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Cecília Freitas Martins

**Avaliação da presença de microcistina-LR por
HPLC-PDA em amostras de mananciais da
Região da Grande Vitória**

Vitória, 2010

Cecília Freitas Martins

**Avaliação da presença de microcistina-LR por
HPLC-PDA em amostras de mananciais da
Região da Grande Vitória**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Sérgio Túlio A. Cassini.

Vitória, 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M386a Martins, Cecília Freitas, 1986-
Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA
em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória /
Cecília Freitas Martins. – 2010.
75 f. : il.

Orientador: Sérgio Túlio Alves Cassini.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Eutroficação. 2. Cromatografia a líquido de alta eficiência.
3. Microcistina. I. Cassini, Sérgio Túlio Alves. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

16 de agosto de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. PhD. Sérgio Túlio Alves Cassini
Orientador - UFES

Prof^a. Dr^a. Edumar Ramos Cabral Coelho
Examinador Interno - UFES

Prof^a. PhD. Valéria Freitas de Magalhães
Examinador Externo – UFRJ

“Dedico este trabalho aos meus pais,
Vanderley e Lindalva, pelo amor e educação
que me ofereceram.”

Agradecimentos

À Deus pela oportunidade e pelas bênçãos em minha vida.

À minha família, Lindalva, Vanderley e Aline, e meu namorado Wagner, por todo o carinho e apoio recebido.

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Saneamento Ambiental – LabSan/UFES.

Às alunas de iniciação científica Daisy Cristina e Letícia Meneguel pela contribuição ao trabalho.

Às professoras Junko Tsukamoto e Sueli Gomes Figueiredo e ao aluno de doutorado Paulo Wagner Antunes pelos ensinamentos sobre cromatografia líquida.

À prof^a. Valéria de Oliveira Fernandes e aluna de mestrado Larissa Bassani por permitir acompanhá-las em coletas na Lagoa Juara.

Às professoras da banca avaliadora, Prof^a. Edumar Ramos Cabral Coelho e Valéria Freitas de Magalhães pelas críticas e sugestões.

Ao meu orientador Prof. Sérgio Túlio Alves Cassini.

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo e do LabSan/UFES.

À bolsa de pesquisa da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Ao apoio financeiro aos projetos pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pelo Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC/Vitória).

À CESAN por permitir as coletas na Estação de Tratamento de Água de Duas Bocas, Cariacica-ES, e na Estação de Tratamento de Esgoto de Jardim Camburi, Vitória, ES.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

“O saber se aprende com os mestres. A
sabedoria, só com o corriqueiro da vida.”

Cora Coralina

Resumo

MARTINS, C. F., 2010. **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de MC-LR dissolvida em quatro mananciais superficiais da Região da Grande Vitória e efluente do tratamento de esgotos. O método HPLC-PDA utilizado apresentou satisfatória linearidade ($r = 0,99$), recuperação (62,7%) e precisão ($CV = 2,1\%$). O LD ($0,17 \mu\text{g.L}^{-1}$) e LQ ($0,37 \mu\text{g.L}^{-1}$) apresentaram-se menores que o valor estabelecido pela OMS ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) para água de consumo humano, portanto aceitável para a determinação de MC-LR. O método foi aplicado para as amostras ambientais e mostrou-se incapaz de detectar com confiabilidade a presença da toxina em amostras de efluente de tratamento de esgotos. Para as amostras de água bruta de mananciais o método apresentou fator de recuperação médio (51,9%) e foi eficiente na avaliação de MC-LR. Foram observados elevados valores de MC-LR na Lagoa Jacuném ($4,78 \mu\text{g.L}^{-1}$), baixa concentração da toxina na Lagoa do Parque Pedra da Cebola ($0,42 \mu\text{g.L}^{-1}$) e foi detectado MC-LR nas amostras do reservatório de Duas Boas ($<0,37 \mu\text{g.L}^{-1}$). Todos os corpos d'água avaliados apresentaram condições de pH e temperatura favoráveis ao crescimento de cianobactérias. Os ambientes artificiais, lagoa de polimento de ETE e a Lagoa do parque Pedra da Cebola, foram classificados como hipereutróficos. A Lagoa Jacuném foi classificada como supereutrófica, o reservatório de Duas Bocas como mesotrófico e a lagoa Juara como oligotrófico. Sugere-se, devido aos usos da lagoa Jacuném para pesca e recreação e do reservatório de Duas Bocas para abastecimento público, que seja realizado o contínuo monitoramento de cianotoxinas nesses mananciais.

Palavras Chaves: microcistina-LR; validação; HPLC; eutrofização.

Abstract

Evaluation of the presence of microcystin-LR by HPLC-PDA in samples from water bodies in the Grande Vitória Region.

This study aimed to evaluate the presence of MC-LR dissolved in four surface waters in the Region of Grande Vitória and effluent of sewage treatment. The HPLC-PDA method used showed satisfactory linearity ($r = 0.99$), recovery (62.7%) and precision (CV = 2.1%). The DL ($0.17 \mu\text{g.L}^{-1}$) and QL ($0.37 \mu\text{g.L}^{-1}$) were lower than the value established by WHO ($1.0 \mu\text{g.L}^{-1}$) for drinking water, thus acceptable for the determination of MC-LR. The method was applied to environmental samples and was unable to reliably detect the presence of the toxin in samples of effluent from sewage treatment. For samples of raw water the method had average recovery factor (51.9%) and was efficient in the evaluation of MC-LR. We observed high levels of MC-LR in Jacuném Lake ($4.78 \mu\text{g.L}^{-1}$), low concentration of toxin in Parque Pedra da Cebola Lake ($0.42 \mu\text{g.L}^{-1}$) and MC-LR was detected in two samples of the Duas Bocas reservoir ($<0.37 \mu\text{g.L}^{-1}$). All water bodies showed high temperature and pH conditions favorable to growth of cyanobacteria. The artificial environments, facultative pond WWTP and Parque Pedra da Cebola Lake, were classified as hypereutrophic. The Jacuném Lake was classified as supereutrophic, the Duas Bocas reservoir as mesotrophic and Juara Lake as oligotrophic. It is suggested carried out continuous monitoring of cyanotoxins in Jacuném Lake and Duas Bocas reservoir, because of their uses for fishing and recreational activities and for public supply.

Keywords: microcystin-LR; validation; HPLC; eutrophication.

Lista de figuras

Figura 1- Estrutura da microcistina.	21
Figura 2- Vista da Lagoa do Parque Pedra da Cebola, Vitória, ES.	40
Figura 3- Localização das lagoas Juara e Jacuném, Serra, ES.	40
Figura 4- À esquerda, (A) imagem do Reservatório de Duas Bocas; à direita, (B) captação de água para a ETA Duas Bocas, Cariacica, ES.	41
Figura 5- Vista Aérea da Estação de Tratamento de Esgoto de Jardim Camburi, Vitória, ES. A seta indica a estação de amostragem	42
Figura 6- Tanques redes de cultivo de tilápia localizados na Lagoa Juara, Serra, ES.	42
Figura 7- Fluxograma do procedimento de avaliação de microcistina-LR dissolvida.	43
Figura 8- À esquerda, (A) extração em fase sólida dos tratamentos Amostra Bruta e Controle Positivo. À direita, (B) amostra percolando o cartucho de extração.	44
Figura 9- Cromatograma da solução padrão de microcistina-LR ($1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obtido por eluição em gradiente acetonitrila (solvente B) e água, ambos acidificados com TFA.	48
Figura 10- Curva resposta relacionando a área do pico de microcistina-LR (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).	49
Figura 11- Fator de recuperação e respectivos desvios padrões para as concentrações de $0,5$ a $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR na matriz do Reservatório de Duas Bocas.	51
Figura 12- Perfil cromatográfico da amostra bruta e controle positivo da Lagoa Jacuném obtidos na amostragem de 13 de outubro de 2009.	53
Figura 13- Perfil cromatográfico do controle positivo do efluente de ETE, amostragem de 01 de dezembro de 2009, após acréscimo de $1,0 \mu\text{g}$ de MC-LR diretamente no <i>vial</i>	55
Figura 14- Dados climáticos de Vitória, precipitação mensal ocorrida e temperatura média mensal de junho a dezembro de 2009.	58
Figura 15- Precipitação diária ocorrida durante o mês de outubro e início de novembro de 2009, na cidade de Vitória, ES.	58

Lista de tabelas

Tabela 1- Algumas condições e padrões das classes de água doce estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005.....	24
Tabela 2- Condições de gradiente linear a 0,8 mL.min ⁻¹ utilizado para a análise de microcistina-LR por HPLC-PDA.	37
Tabela 3- Corpos d'água avaliados quanto à presença de microcistina-LR e às variáveis físicas, químicas e hidrobiológicas.....	38
Tabela 4 - Classificação do Estado Trófico para reservatórios segundo Índice de Carlson Modificado (CETESB, 2010).	47
Tabela 5- Concentrações de microcistina-LR (µg.mL ⁻¹) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r).	49
Tabela 6- Resultados obtidos para os parâmetros de validação do método de avaliação de MC-LR.....	50
Tabela 7- Resultados da avaliação da recuperação em diferentes concentrações do analito (MC-LR) na matriz do Reservatório de Duas Bocas.....	51
Tabela 8- Resultados da avaliação de microcistina-LR por HPLC nas amostras brutas e nos controles positivos.	53
Tabela 10- Classificação do estado trófico para as estações amostrais dos mananciais avaliados.	63

Lista de abreviaturas e siglas

ALCAL - Alcalinidade

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CESAN - Companhia Espírito Santense de Saneamento

Cl-a – Clorofila-a

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV – Coeficiente de Variação

DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DP – Desvio Padrão

DP α – Desvio Padrão do intercepto com o eixo y.

DQO – Demanda Química de Oxigênio

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio do imunoadsorvente ligado à enzima

ETA - Estação de Tratamento de Água

ETE - Estação de Tratamento de Efluentes

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC – Inclinação da Curva

IDT – Ingestão Diária Tolerável

IET - Índice do Estado Trófico

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD - Limite de Detecção

ln – Logaritmo Natural

LPS - Lipopolisacarídeo

LQ - Limite de Quantificação

MC-LR – Microcistina-LR

MS – *Mass Spectrometry* – detector de espectrometria de massa

NH₃ – Nitrogênio Amoniacal Total

NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação de Polimerização em Cadeia

PD – Fósforo dissolvido ou ortofosfato

PDA – *Photodiode Array* – detector de arranjo de diodos

pH – Potencial Hidrogeniônico

p-NPP – *p-Nitrophenyl Phosphate* – substrato cromogênico para enzimas fosfatases

PP1 – *Protein phosphatase 1* – enzima fosfatase tipo 1

PP2A – *Protein phosphatase 2A* – enzima fosfatase tipo 2A

PT - Fósforo Total

PTFE – Politetrafluoretileno

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SPE – *Solid Phase Extraction* – Extração em Fase Sólida

TFA – Ácido Trifluoroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	CIANOACTÉRIAS	17
3.2	CIANOTOXINAS	19
3.2.1	<i>Microcistinas</i>	20
3.3	LEGISLAÇÃO	22
3.4	MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS	24
3.4.1	<i>Bioensaios</i>	25
3.4.2	<i>Biologia molecular</i>	25
3.4.3	<i>Imuno-ensaios (ELISA)</i>	25
3.4.4	<i>Inibição da Fosfatase</i>	26
3.4.5	<i>HPLC</i>	28
3.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	30
3.5.1	<i>Especificidade e Seletividade</i>	30
3.5.2	<i>Linearidade</i>	31
3.5.3	<i>Precisão</i>	31
3.5.4	<i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</i>	32
3.5.5	<i>Fator de Recuperação</i>	32
3.5.6	<i>Intervalo</i>	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	REAGENTES E PADRÕES	34
4.2	DESEMPENHO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	34
4.2.1	<i>Linearidade e Curva de calibração analítica</i>	34
4.2.2	<i>Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Intervalo</i>	35
4.2.3	<i>Recuperação</i>	35
4.2.4	<i>Precisão: Repetitividade</i>	36
4.3	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA (HPLC) DE MICROCISTINA-LR	36
4.4	AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS AMBIENTAIS	38
4.4.1	<i>Mananciais Superficiais</i>	39
4.4.2	<i>Análise de microcistina-LR dissolvida</i>	42
4.4.3	<i>Análises físicas, químicas e hidrobiológicas</i>	44
4.4.4	<i>Índice de Estado Trófico</i>	46
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO	48
5.2	AVALIAÇÃO DE MICROCISTINA-LR EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	52
5.3	FATORES AMBIENTAIS, USOS DOS MANANCIAIS E PRESENÇA DE MICROCISTINA-LR	55
6	CONCLUSÕES	64
7	RECOMENDAÇÕES	65
8	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A falta de planejamento para o tratamento e destinação de esgotos sanitários associada à expansão urbana tem tornado diversos mananciais impróprios para múltiplos usos. O aumento de nutrientes, principalmente fósforo, nitrogênio e carbono, têm favorecido o crescimento do fitoplâncton e de macrófitas aquáticas em mananciais superficiais (CALIJURI et al., 2006).

Ambientes eutróficos, ou seja, rico em nutrientes, favorecem a proliferação e predominância de espécies de cianobactérias, que, por sua vez, podem produzir diversas toxinas e liberá-las no meio aquático, principalmente durante os fenômenos de florações (crescimento exuberante) (CHORUS e BARTRAM, 1999; WATANABE e OISHI, 1985). Geralmente, estas florações têm grande impacto negativo nos corpos d'água alterando as características de qualidade, tais como odor e sabor, e de presença de toxinas específicas (BRASIL, 2006).

As cianobactérias podem produzir várias toxinas, incluindo neurotoxinas (anatoxinas e saxitoxinas), hepatotoxinas (microcistina, nodularina, cilindrospermopsina) e irritantes ao contato (endotoxinas lipopolissacarídeas - LPS) (CARMICHAEL e FALCONER, 1993). Essas cianotoxinas são metabólitos secundários de cianobactérias, com estrutura química e propriedades toxicológicas diversas (SIVONEN e JONES, 1999).

Em todo o mundo, estima-se que proliferações de cianobactérias produtoras de hepatotoxinas são mais encontradas que proliferações neurotóxicas. As hepatotoxinas são peptídeos cíclicos cuja ocorrência já foi notificada em todos os continentes, dentre esse grupo de cianotoxinas as microcistinas são as mais encontradas, sendo a ocorrência da microcistina-LR mais frequente (SIVONEN e JONES, 1999).

A microcistina-LR já foi detectada em águas de rios ou reservatórios em várias regiões do mundo, como na Espanha (ABOAL e PUIG, 2005), Estados Unidos (GRAHAM et al., 2004), Marrocos (OUDRA et al., 2001; OUDRA et al., 2002), China (DAI et al., 2008), França (MAATOUK et al., 2002), Turquia (GURBUZ et al., 2009), Itália (MESSINEO et al. 2009) e Brasil (CARVALHO et al., 2007).

Segundo Huszar et al. (2000), o grupo das cianobactérias destaca-se expressivamente por sua dominância (biomassa e/ou densidade) em sistemas

aquáticos naturais ou artificiais no Brasil. Este fato assume crescente relevância, uma vez que os estudos sobre toxinas produzidas por cianobactérias têm demonstrado, cada vez mais, o potencial tóxico de muitas de suas espécies no Brasil (AZEVEDO et al., 1994; YUNES et al., 1996; JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998; LAGOS et al., 1999; AZEVEDO et al., 2002; VIEIRA et al., 2003). No Brasil, as microcistinas foram detectadas na água de diversos mananciais superficiais, como no estado de Minas Gerais (ALMEIDA, et al., 2006) e São Paulo (AGUJARO, 2007); na Represa Billings, São Paulo (CARVALHO et al., 2007); também foi verificada a presença da toxina no músculo de peixes de reservatórios do Rio de Janeiro e Minas Gerais (MAGALHÃES et al., 2001, 2003; DEBLÓIS et al., 2008) e em tanques de piscicultura, São Paulo (ANDRADE, 2009).

Foram registradas efeitos tóxicos de microcistinas, como mortes e desenvolvimento de doenças graves, tanto em seres humanos quanto em animais domésticos e silvestres (mamíferos, aves e peixes) em diversas regiões do mundo (SANTOS e BRACARENSE, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) (CHORUS e BARTRAM, 1999) recomenda o valor limite máximo para equivalentes de microcistina-LR total de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, considerando a exposição através da água de consumo humano. Os valores foram estabelecidos devido à preocupação com os efeitos toxicológicos crônicos das microcistinas, que podem atuar como promotoras de tumores de fígado através da inibição da atividade da proteína fosfatase tipo 1 e 2A (KAYA, 1996).

Portanto, a análise quantitativa de microcistinas é importante no contexto de saúde humana e toxicologia ambiental. O presente trabalho visa avaliar a presença de microcistina-LR em mananciais com diversos usos na Região da Grande Vitória, ES.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a presença de microcistina-LR por cromatografia líquida (HPLC-PDA) em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar parâmetros de desempenho do método de avaliação de microcistina-LR;
- Avaliar a presença de microcistina-LR dissolvida em amostras de mananciais superficiais e de efluente de Estação de Tratamento de Esgotos (ETE);
- Analisar parâmetros físicos, químicos e hidrobiológicos das amostras de mananciais superficiais e de efluente de Estação de Tratamento de Esgotos (ETE);

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procarióticos, fototróficos, podendo ser unicelulares, filamentosas ou coloniais, apresentando características de algas e bactérias. A semelhança com as algas é registrada pela presença de pigmentos tipo clorofila-a e fotossíntese aeróbica e as características de bactérias por meio da sua estrutura procariótica e parede celular. Assim, é comum a referencia destes microrganismos como cianobactérias ou microalgas cianofíceas (YOO et al., 1995).

As cianobactérias apresentam uma elevada diversidade metabólica que contribui para o seu sucesso competitivo e ocupação de diferentes habitat aquático, podendo ser encontradas em oceanos, estuários, mangues e, principalmente, em ambientes aquáticos continentais representados pelos rios, lagos e reservatórios, inclusive fontes termais com temperaturas acima de 50° C ou até mesmo em regiões polares (HYENSTRAND et al., 1998; DOKULIL e TEUBNER, 2000).

Este fato é reforçado pelas características comuns desse grupo tais como a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e assimilação de formas alternativas de nitrogênio disponível do meio, mixotrofia em condições de baixa luminosidade, reserva e acúmulo de fósforo, presença de pigmentos acessórios tais como as ficobiliproteínas e a produção de toxinas alelopáticas são fatores que, no seu conjunto, podem explicar a grande adaptabilidade das cianobactérias aos diversos biótopos aquáticos representados pelas colunas d'água, sedimentos e entre as partes submersas de macrófitas (ESTEVES, 1998).

Assim, este aparato metabólico aliado às suas características fisiológicas permite, sob determinadas circunstâncias, o crescimento exuberante em determinados ambientes aquáticos promovendo o que se denominam de florações de cianobactérias (BOUVY, 1999; TOWNSEND et al., 1996; ESTEVES 1998). Geralmente, estas florações têm grande impacto negativo nos corpos d'água podendo alterar as características de qualidade tais como odor, sabor e de presença de toxinas específicas produzidas por certos gêneros de cianobactérias, denominadas genericamente de cianotoxinas. A geração de sabor e odor é causada por metabólitos, tais como geosmina e isoborneol (BRASIL, 2006).

As florações de cianobactérias nem sempre são compostas de espécies tóxicas (YOO et al., 1995), contudo, estudos têm demonstrado que de 50 a 70% das florações de cianobactérias são constituídos por espécies tóxicas (SIVONEN et al., 1990; VASCONCELOS, 1994; YOO et al., 1995).

A ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas não é um fenômeno local, regional ou específico de um só país, mas de proporções globais. A maioria dos corpos hídricos eutróficos ou hipertróficos, normalmente, favorece o desenvolvimento destes organismos (CHORUS e BARTRAM, 1999).

As cianobactérias geralmente estão associadas às condições eutróficas, porém proliferações tóxicas destas microalgas têm sido registradas em ambientes oligotróficos e mesotróficos. Aboal e Puig (2005) observaram que, em coletas sazonais em oito reservatórios da Espanha, a ocorrência de microcistinas foi mais frequente nos ambientes oligotróficos e a toxina não foi detectada nos reservatórios mais eutrofizados.

No Brasil, há ocorrência de florações de algas tóxicas e de cianotoxinas em águas de abastecimento, descrevendo representantes do gênero *Microcystis* como sendo um dos principais causadores de efeitos tóxicos em águas continentais. Florações desse gênero, em especial de *Microcystis aeruginosa*, têm sido descritas em diferentes reservatórios lacustres (AZEVEDO et al., 1994; JARDIM et al., 2000; SANT'ANNA & AZEVEDO, 2000; VIEIRA, 2002; CARVALHO et al., 2007) e em lagoas costeiras no país (YUNES et al., 1996; 1998; MATTHIENSEN et al., 1999; MINILLO et al., 2000; HUSZAR et al., 2000).

Os fatores ambientais que influenciam a formação de florações tóxicas em corpos d'água são a temperatura, pH, intensidade luminosa e concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (CALIJURI et al., 2006). Estudos realizados em reservatórios brasileiros têm demonstrado que ambientes em condições de eutrofia e hipertrofia, com concentrações de fósforo total entre 50-660 mg.L⁻¹; pH levemente elevado (7,0 a 9,0); baixa profundidade (entre 2,8 e 14 metros); temperatura da água relativamente alta (acima de 20 °C); são ambientes adequados para a proliferação e manutenção dos florescimentos de cianobactérias (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000).

Inúmeros registros de florescimentos de cianobactérias têm sido realizados no país, sendo que uma expressiva parcela (>50%) tem reconhecido potencial tóxico (YUNES et al., 1996; 1998; MINILLO et al. 2000). Conforme Sant'anna e Azevedo (2000) existem, no Brasil, cerca de 20 espécies de 14 gêneros de cianobactérias que são tóxicas, porém, em vários Estados brasileiros, principalmente aqueles situados nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste, os dados continuam subestimados.

3.2 Cianotoxinas

As cianotoxinas são metabólitos secundários de cianobactérias, com estrutura química e propriedades toxicológicas diversas (SIVONEN e JONES, 1999). Quando liberadas para o meio aquoso podem persistir por dias a várias semanas, dependendo de condições específicas do meio como pH e, principalmente, da temperatura da água (KOTAK et al., 1995; CHORUS e BARTRAM, 1999, ZURAWELL et al., 2005).

A exposição humana a cianotoxinas é capaz de produzir diversos efeitos toxicológicos e ocorre principalmente no uso recreacional de lagoas e rios (via dérmica) e pelo consumo de água, alimentos e suplementos à base de algas (via oral) (CARMICHAEL, 1996). Além disso, outras possíveis rotas de exposição são o uso de chuveiros (inalação), por via intravenosa (em caso de tratamento de hemodiálise) e por meio de bioacumulação na cadeia alimentar (CALIJURI et al., 2006).

As cianotoxinas são basicamente formadas por três grandes grupos de substâncias químicas, os peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos. Também são classificadas quanto ao local de ataque nos organismos de mamíferos, podem ser hepatotóxicas, neurotóxicas e dermatotóxicas de efeitos crônicos ou agudos, sendo liberadas por vários gêneros de cianobactérias. Dentre as hepatoxinas podemos citar as microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina. As Neurotoxinas são representadas pela Anatoxina-a, homoanatoxina-a e Saxitoxinas (CARMICHAEL, 1992; CHORUS e BARTRAM, 1999). As dermatotoxinas são capazes de produzir irritações na pele e alergias (KUIPER-GOODMAN et al., 1999), são componentes da

membrana celular das cianobactérias formados por carboidratos e lipídios, portanto, lipopolissacarídeos (LPS).

A ocorrência de hepatoxinas já foi notificada em todos os continentes, dentre esse grupo de cianotoxinas a mais encontrada é a microcistina (SIVONEN e JONES, 1999).

As microcistinas já foram detectadas em diversos ambientes, como na água de reservatórios (ABOAL e PUIG, 2005), no sedimento de reservatórios (BABICA et al., 2006), em água termais (MOHAMED, 2008), em lagoas de Estação de Tratamento de Esgotos (VASCONCELOS e PEREIRA, 2000) e em tanques de piscicultura (PROMMANA et al., 2006).

3.2.1 Microcistinas

As microcistinas são um grupo de toxinas constituídas por heptapeptídeos cíclicos que tem efeito na inibição de fosfatases, atuando como produtores de tumores, com ação hepatotóxica (FUJIKI et al., 1996)

Quanto a sua estrutura química, as microcistinas são compostas de peptídios curtos de 7 aminoácidos, identificadas, principalmente, por letras que correspondem à abreviatura dos dois L-aminoácidos variáveis (posições 2 e 4 da estrutura cíclica), juntamente com as metilações e desmetilações dos dois aminoácidos incomuns (Adda e Mdha); podendo ainda existir outras alterações menores na estrutura química das moléculas destes compostos. Essa nomenclatura, principalmente para as microcistinas, foi proposta por Carmichael et al. (1988), que inicialmente verificaram apenas as variações qualitativas observadas em seus dois L-aminoácidos, que foram usadas para designar as diferentes microcistinas, por exemplo: microcistina-LR (leucina-arginina); microcistina-RR (arginina-arginina); microcistina-LA (leucina-alanina), conforme apresentadas na figura 1.

Estudos demonstram a existência de mais de 60 análogos estruturais de microcistinas (CHORUS e BARTRAM, 1999). Como exemplo, em trabalhos realizados em florações naturais e em uma cepa de *Microcystis aeruginosa*, isolada no Rio Grande do Sul, foi identificada a ocorrência de uma microcistina-LR com D-Leu na sua estrutura (MATTHIENSEN et al., 2000). Em extratos de uma floração natural num reservatório no Marrocos foram detectados oito variantes de microcistinas, sendo que a variante dominante foi a microcistina-LR, com a

proporção relativa de 30-60% do total de microcistinas (OUDRA et al., 2002). Geralmente, diversas variantes de microcistinas são encontradas numa mesma amostra, mas microcistina-LR é a dominante (ABOAL e PUIG, 2005).

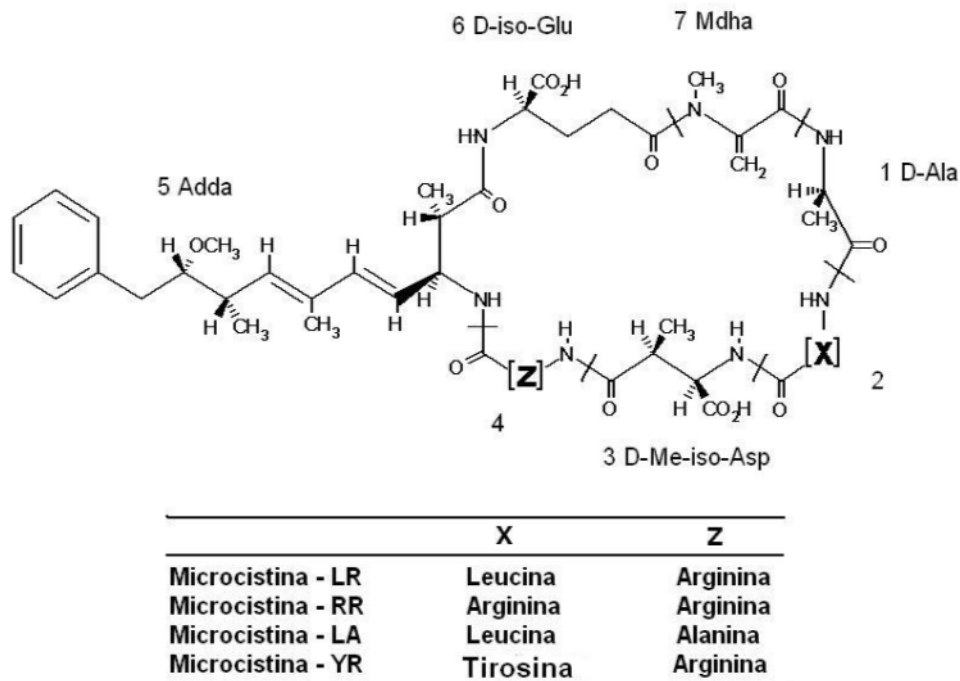


Figura 1- Estrutura da microcistina. Fonte: Adaptada de Chorus e Bartram (1999).

As microcistinas são altamente estáveis em condições laboratoriais, mas tem demonstrado degradação na presença de microorganismo ou por fotólise indireta (BABICA et al., 2006). Entretanto, também há relatos que descrevem continuamente elevadas concentrações de microcistinas em reservatórios naturais, inclusive em sedimentos, ou seja, a persistência por períodos relativamente longos após a ocorrência anterior de cianobactérias na água (BABICA et al., 2006).

Exposições agudas a cianotoxinas podem causar efeitos adversos à saúde e a exposição crônica a níveis baixos pode resultar em lesões em longo prazo. Experimentos em animais demonstraram lesão hepática crônica quando continuamente submetidos à ingestão oral de microcistinas. A ação carcinogênica e de promoção do crescimento de tumores por microcistinas têm sido demonstrado em experiências com animais (KUIPER-GOODMAN et al., 1999). Em humanos, elevadas doses de microcistinas produzem necrose hepática, podendo levar à morte, enquanto a exposição crônica está relacionada à indução de câncer colorretal (intestino grosso e reto) e de fígado (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Essa cianotoxina pode se acumular em tecidos animais através da ingestão de microcistina dissolvida na água (GÉRARD et al., 2005) ou contida na células. A acumulação da toxina por diversos organismos planctívoros foi registrada no zooplâncton (MOHAMED, 2001), em moluscos (GÉRARD et al., 2009), crustáceos (MAGALHÃES et al., 2003) e peixes (MAGALHÃES et al., 2001; (ZHANG et al., 2009).

Com o objetivo de minimizar o risco de intoxicações humanas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o valor de referência para Ingestão Diária Tolerável (IDT) de microcistina igual a $0,04 \mu\text{g MC.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Em estudo realizado no reservatório do Funil (RJ) e de Furnas (MG) todas as 27 amostras de peixes (tilápias) continham microcistina, variando de 0,8 a 32,1 mg MC.g fígado⁻¹ e 0,9-12,0 ng MC.g músculo⁻¹. A maioria das variantes de microcistina encontrada no fitoplâncton também foi encontrada no fígado dos peixes. Em ambos os reservatórios, um em cada quatro peixes amostrados tinha um nível de microcistinas ($8 \text{ ng.g tecido}^{-1}$) além do limite de ingestão diária tolerável recomendado pela OMS e representava um risco para os consumidores (DEBLOIS et al., 2008).

3.3 Legislação

Baseado em estudos de toxicidade oral em níveis subcrônicos, realizados com camundongos (FAWELL et al, 1994) e com porcos (FALCONER et al, 1994), foi estabelecida como ingestão diária aceitável para microcistina-LR, o valor de $0,04\mu\text{g}$ de microcistina-LR por quilograma (Kg) de peso corpóreo por dia (CHORUS e BARTRAM, 1999). A partir desse valor foi adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um limite máximo aceitável de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina-LR, considerando a exposição através da água de consumo humano.

Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO, 1998), não há dados suficientes que possibilitassem a definição de valores de referência para qualquer outra cianotoxina, além da microcistina-LR, o guia Australian Drinking Water Guidelines (ADWG, 1996) apresentou valor de referênciade microcistina-LR de $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$, diferindo do recomendado pela OMS para a água de consumo humano.

A legislação brasileira de qualidade de águas de consumo humano - Portaria do Ministério da Saúde nº 518, 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004), estabelece a obrigatoriedade do monitoramento de microcistinas na água potável, com o valor máximo permitido de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo aceitável a concentração de até $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas em até 3 (três) amostras, consecutivas ou não, nas análises realizadas nos últimos 12 (doze) meses. A portaria recomenda que as análises para cianotoxinas incluam, também, a determinação de cilindrospermopsina e saxitoxinas (STX), observando, respectivamente, os valores limites de $15,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de equivalentes de STX.L⁻¹. O não-estabelecimento de obrigatoriedade no monitoramento dos valores para outras cianotoxinas deve-se à escassez de informações e não-disponibilidade de técnicas analíticas padronizadas. (BRASIL, 2006)

De acordo com a legislação, o monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer a uma frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder $10.000 \text{ células.mL}^{-1}$ (ou $1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ de biovolume), e semanal, quando exceder este valor. Exige-se também, quando o número de cianobactérias no ponto de captação do manancial exceder $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$ (ou $2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ de biovolume), será exigida a análise semanal de cianotoxinas, na água de saída do tratamento, nas entradas das clínicas de hemodiálise e nas indústrias de injetáveis. Também é vedado o uso de algicidas para o controle do crescimento de cianobactérias ou qualquer intervenção no monitoramento que provoque a lise das células destes microorganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$ (ou $2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ de biovolume), sob pena do comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados às cianotoxinas.

A Resolução CONAMA nº 274, 29 de novembro 2000 (BRASIL, 2000), referente às condições de balneabilidade, estabelece restrições à recreação de contato primário quando verificada a ocorrência de florações de algas e considera passível de interdição pelos órgãos de controle ambiental trechos dos corpos d'água em que ocorram toxicidade ou formação de espuma decorrente de florações de algas. A Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), estabelece valores máximos permitidos (VMP) de clorofila-a e células de cianobactérias nas diferentes classes de uso dos corpos d'água, também determina condições e

padrões para parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (Tabela 1).

Tabela 1- Algumas condições e padrões das classes de água doce estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

Parâmetro	VMP			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
pH	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0
Clorofila ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	≤ 10	≤ 30	≤ 60	-
Densidade de cianobactérias (cél.mL^{-1})	≤ 20.000	≤ 50.000	≤ 100.000	-
Cor real (mg Pt.L^{-1})	Cor natural do corpo de água	≤ 75	≤ 75	-
Turbidez (UNT)	≤ 40	≤ 100	≤ 100	-
NH_3 (mg.L^{-1})	3,7 em $\text{pH} \leq 7,5$	3,7 em $\text{pH} \leq 7,5$	13,3 em $\text{pH} \leq 7,5$	-
	2,0 em $7,5 < \text{pH} \leq 8,0$	2,0 em $7,5 < \text{pH} \leq 8,0$	5,6 em $7,5 < \text{pH} \leq 8,0$	
	1,0 em $8,0 < \text{pH} \leq 8,5$	1,0 em $8,0 < \text{pH} \leq 8,5$	2,2 em $8,0 < \text{pH} \leq 8,5$	
	0,5 em $\text{pH} > 8,5$	0,5 em $\text{pH} > 8,5$	1,0 em $\text{pH} > 8,5$	
DBO_5 (mg.L^{-1})	≤ 3	≤ 5	≤ 10	-
PT (mg.L^{-1})	$\leq 0,02$	$\leq 0,03$	$\leq 0,05$	-

As ações de controle e vigilância da qualidade da água ainda são extremamente tímidas. Muitos municípios e localidades não dispõem de pessoal e de laboratórios capazes de realizar o monitoramento da qualidade da água, do manancial ao sistema de distribuição (BRASIL, 2006). Assim, é muito importante que se desenvolvam metodologias precisas de detecção de cianotoxinas como uma importante ferramenta para aumentar significativamente os aspectos de segurança e da qualidade de águas.

3.4 Métodos de detecção de microcistinas

As principais metodologias de detecção e quantificação de cianotoxinas, principalmente microcistinas, em amostras de águas incluem a) Bioensaios; b) Biologia Molecular; c) Imuno-ensaios (ELISA); d) Inibição da Fosfatase; e) Cromatografia Líquida (HPLC).

3.4.1 Bioensaios

O uso de bioensaios possibilita a aquisição de importantes informações sobre a toxicidade de uma amostra, visto que diferenças minoritárias na estrutura das cianotoxinas podem levar a diferenças pronunciadas na toxicidade (SIVONEN e JONES, 1999). Portanto, o uso desta técnica permite um maior entendimento do impacto das microcistinas no ambiente natural destinado ou não ao abastecimento de água, além dos mecanismos de ação nos organismos (KURODA et al., 2006).

Porém, os bioensaios devem estar associados a sofisticadas técnicas qualitativas e quantitativas, sendo utilizado, portanto, como um método de triagem (*screening*) na análise de microcistinas.

3.4.2 Biologia molecular

As técnicas de biologia molecular permitem esclarecer a genética das vias biossintéticas de algumas cianotoxinas e investigar a regulação da síntese de toxinas em nível molecular. Atualmente, há trabalhos (BAKER et al., 2002; DITTMANN e BÖRNER, 2005; NISHIZAWA et al., 1999; OUAHID et al., 2005) que têm utilizado a abordagem molecular para detectar e caracterizar molecularmente cianobactérias potencialmente tóxicas de amostras ambientais pelo uso de marcadores moleculares taxonômicos e genes envolvidos com a biossíntese de toxinas como microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas. A possibilidade de detecção destes genes torna-se relevante visto que determinada cianobactéria pode ter o potencial genético para a produção de microcistinas, contudo, devido a fatores ambientais, as toxinas podem não estar sendo produzidas e liberadas no momento da avaliação.

No Brasil, ainda são escassos os trabalhos com abordagem molecular das cianobactérias (ANJOS et al., 2006; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; FIORE et al., 2005; LORENZI, 2004; SILVA, 2006).

3.4.3 Imuno-ensaios (ELISA)

O método de ELISA baseia-se na competição direta entre dois tipos de antígenos (a possível microcistina presente na amostra, e em seguida, o antígeno marcador ligado a uma enzima), sobre um número limitado de anticorpos com reatividade cruzada também contra vários congêneres de microcistina, adsorvidos na parede da placa de reação. Após os processos de incubação - lavagem da placa - adição de

substrato da enzima - incubação, procede-se a análise por absorção espectrofotométrica a 450 nm. A coloração resultante ao final dessa reação enzimática é inversamente proporcional à concentração da toxina presente na amostra analisada. (KURODA et al, 2006). Este resultado é obtido colorimetricamente em um leitor de placas a partir de padrões que alcançam o máximo de 2,0 ppb (AGUJARO, 2007). O método ELISA, principalmente, para detecção em baixas concentrações de microcistinas pode ser usado com sucesso para investigar a ocorrência dessa toxina (BABICA et al., 2006).

Este método apresenta como vantagens a sensibilidade às microcistinas, além do fácil manuseio e possibilidade de realizar análise de várias amostras ao mesmo tempo. Há no mercado alguns Kits disponíveis com boa sensibilidade analítica, mas algumas reações cruzadas entre diferentes variedades de microcistinas têm colocado algumas restrições no uso destes Kits. Rapala et al. (2002) obteve menores concentrações de microcistinas hidrofóbicas com o método ELISA comparando-se à análise por HPLC e por ensaio da fosfatase.

3.4.4 Inibição da Fosfatase

O ensaio de inibição da enzima fosfatase foi desenvolvido com base na capacidade de microcistinas inibirem a enzima fosfatase serina-treonina (RAPALA et al., 2002). Este ensaio consiste na avaliação do efeito inibitório das microcistinas na reação de liberação de grupos fosfato catalisada pela fosfatases PP1 ou PP2A. A reação pode ser monitorada ou quantificada utilizando ³²P ou substratos cromogênicos como o p-nitrofenol fosfato (p-NPP) (RIVASSEAU e HENNION et al., 1999) ou 8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate – DiFMUP (DEBOLIS et al., 2008).

O ensaio é simples, rápido e relativamente barato, o método é muito sensível e pode indicar a presença de quantidades extremamente pequenas de microcistinas (nanograma, ng) nas amostras, abaixo do nível de detecção exigido pela legislação Brasileira e mundial (AKIN-ORIOLO e LAWTON, 2005).

No entanto, esta reação inibitória não é um método quantitativo e não possibilita identificar as variantes de microcistinas presentes na amostra e pode ter interferência de outros inibidores naturais da fosfatase, tais como calhicolina e ácido okaidáico (RAPALA et al. 2002). Contudo, pode ser utilizada como indicador primário ou de presença/ausência de microcistinas nas análises de qualidade de águas

(ROBILLOT e HENNION, 2004). Assim, esta reação apresenta-se como uma opção de pré-análise, que, caso tenha resultado positivo, deve ser seguida de procedimentos analíticos quantitativos, como HPLC. Esta abordagem pode diminuir sensivelmente os custos de análises de cianotoxinas para as amostras de águas.

Existem vários estudos que visam tornar o ensaio de inibição de proteína fosfatase um método quantitativo, modificando-o, por exemplo, para medir as toxinas de amostra em um espectrofotômetro de bancada (AKIN-ORIOLA e LAWTON, 2005). Há vários estudos que citam o uso de leitores de microplacas para realizar o teste de inibição da fosfatase sobre o substrato p-NPP e obtiveram resultados coerentes com os produzidos por outras metodologias de avaliação de microcistina, como ELISA e HPLC-PDA.

Ho e colaboradores (2007) obtiveram resultado de ensaio de inibição da fosfatase 2A (PP2A) em concordância com os resultados por HPLC-PDA para a avaliação de microcistina (-LR e -LA) em água tratada.

Deblóis e colaboradores (2008) utilizaram HPLC-PDA e ensaio de inibição da fosfatase 1 (PP1) para avaliar microcistinas no sêstom e em fígado de tilápia, as quantificações por ambos os métodos não apresentaram diferença. Nesse mesmo estudo, ainda utilizaram o ensaio de inibição da fosfatase 1 (PP1) e o método ELISA para avaliar microcistinas em músculos de peixes (tilápias), o ensaio com a enzima mostrou maiores concentrações de microcistina que o imuno-ensaio (30% a mais), sugeriu-se que essa diferença possa ser devido ao efeito inibitório de um ou mais compostos desconhecidos co-extraídos do músculo junto com a toxina, o qual o teve forte efeito no ensaio com PP1 devido a etapa de concentração necessária para esse tecido. Portanto, os autores desconsideraram os resultados do método de inibição enzimática para análise de toxina em músculos de peixe.

Almeida e colaboradores (2006) utilizaram o teste de inibição da enzima fosfatase 1 (PP1) para detectar a presença de microcistina em cultivo de cianobactérias e amostras ambientais. O teste com a enzima PP1 mostrou-se efetivo para confirmar a presença e quantificar microcistina. A sensibilidade do ensaio para a detecção da hepatotoxina foi de 0,2- 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ALMEIDA et al., 2006).

3.4.5 HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – *High performance liquid chromatography*) é um tipo de cromatografia que utiliza uma fase estacionária, colunas recheadas com resinas específicas, e uma fase móvel, eluída sob pressão. Essa técnica possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, 2006).

HPLC em fase reversa é normalmente utilizado para a separação de componentes apolares ou hidrofóbicos, portanto, microcistinas, um amplo grupo de peptídeos tóxicos com diferentes hidrofobicidade, são facilmente separados por este método (AKIN-ORIOLA e LAWTON, 2005).

Em baixas concentrações a determinação das microcistinas pode não ser possível devido à baixa sensibilidade do método analítico e, portanto, é necessária uma etapa de concentração. O processamento prévio de amostras para a análise por HPLC é essencial para a produção de cromatogramas confiáveis. A extração em fase sólida (cartucho C18), por exemplo, é amplamente utilizada para a concentração de amostras de água, ou para eliminar contaminantes da matriz (LANÇAS, 2004a). Após passar a amostra através de cartuchos de SPE, as microcistinas ficam retidas e, posteriormente, podem ser eluídas por solventes, como o metanol (NICHOLSOM e BURCH, 2001).

Estudos demonstram (RAPALA et al., 2002; LAWTON et al., 1994) que diferentes processos de pré-tratamento da amostra, tais como a técnica de extração, concentração e purificação de toxinas, assim como os solventes envolvidos, apresentam significativa diferença na quantificação de algumas variáveis de microcistina.

Após a extração, concentração e purificação da amostra, em geral, é realizada a análise de microcistinas por HPLC utilizando coluna de sílica C18, fase reversa, com a separação realizada pelo gradiente de água e acetonitrila, ambos acidificados com ácido trifluoroacético (TFA) (AKIN-ORIOLA e LAWTON, 2005; LAWTON et al., 1994). Esse gradiente abrange várias polaridades, o que permite a análise de todas as microcistinas (HARADA, et al., 1999).

Após a separação das microcistinas, a próxima etapa necessária é a detecção dos analitos. O detector, componente do sistema cromatográfico, é o responsável pela geração um sinal diretamente proporcional à concentração do analito. Existem diversos tipos de detectores disponíveis, como ultravioleta (UV), arranjo de diodos (PDA – *Photodiode Array*), e espectroscopia de massa (MS) (NICHOLSON e BURCH, 2001).

A MS é o melhor método de detecção para evitar a identificação equivocada das microcistinas, pois cada microcistina produz íons característicos em seu espectro de massa (SANGOLKAR et al, 2006), porém o custo do equipamento é alto.

A absorbância UV máxima da maioria das microcistinas e nodularinas é a 238 nm, as microcistinas em que existem aminoácidos aromáticos, como, por exemplo, a microcistina-LW que possui triptofano tem a absorbância máxima a 222 nm (LAWTON et al., 1994). A técnica de detecção UV permite determinar as microcistinas individualmente através da comparação com padrões; assim, a identificação das microcistinas é baseada nos picos de seus espectros (CALIJURI et al., 2006).

O PDA registra a resposta de todo o espectro, podendo ser ajustado o intervalo desejado, por exemplo, para microcistinas pode-se utilizar entre 200 e 300 nm. A técnica de HPLC associada ao detector PDA é um dos melhores métodos quantitativos para a determinação de microcistinas com limite de detecção em conformidade com os valores limites proposto pela guias internacionais (NICHOLSON e BURCH, 2001). A técnica HPLC-PDA combina a identificação do espectro de absorção e tempo de retenção característico da microcistina utilizada como padrão, sendo muito utilizada com sucesso na identificação e quantificação de microcistinas (AKIN-ORIOLA e LAWTON, 2005; DAI et al., 2008; EDWARDS et al., 1996; LAWTON et al., 1994; SANCHES et al., 2007).

Embora a análise de toxinas por HPLC requeira equipamentos e pessoal especializado e tenha um custo unitário elevado por amostra, o método é capaz de fornecer informações precisas e específicas sobre a identidade e a quantidade de cada variante microcistina (AKIN-ORIOLA e LAWTON, 2005).

3.5 Validação do método cromatográfico

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Assim é possível demonstrar os métodos de ensaio executados conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (BRASIL, 2003b).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2003a), e o Instituto Nacional de Metrologia, INMETRO (BRASIL, 2003b), disponibilizam guias para o procedimento de validação de método analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA nº 899, de 2003 e o documento INMETRO DOQCGCRE-008, de 2003.

Ao validar uma determinada metodologia deve-se considerar, quando aplicável, as seguintes características de desempenho do método (ou parâmetros de validação): (1) especificidade e seletividade; (2) linearidade; (3) precisão; (4) limite de detecção; (5) limite de quantificação; (6) exatidão; (7) recuperação; (8) intervalo; (9) robustez; e (10) incerteza de medição (BRASIL, 2003a,b).

Toda validação começa com uma condição analítica proveniente de um desenvolvimento ou da literatura, portanto, é necessário que a melhor condição analítica esteja definida para, então, iniciar os testes de validação (LEITE, 2008).

3.5.1 Especificidade e Seletividade

Os parâmetros de especificidade e seletividade estão relacionados ao evento de detecção do analito, fato que pode ser influenciado por outros componentes.

Um método específico é aquele que produz resposta para apenas um analito, por sua vez, um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

A técnica de HPLC-PDA combina a identificação do espectro de absorção UV, 238 nm para as microcistinas (LAWTON, 1994), e o tempo de retenção característico da microcistina-LR, portanto, o método de detecção é considerado seletivo. Visto que é um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta da microcistina-LR da de outros.

3.5.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos (sinais) são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003a). É utilizada com a finalidade de se obter comparação analítica para a quantificação.

Para o estudo desse parâmetro, faz-se necessária a elaboração de uma curva resposta que demonstre a relação “sinal detectado” *versus* concentração. A linearidade é formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta (Equação 1) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = \alpha x + \beta \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

α = inclinação da curva de calibração;

β = interseção com o eixo y .

Se ao confeccionar a curva observar-se uma relação linear, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos para determinação do coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo y (β), coeficiente angular (α), soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (BRASIL, 2003a). O coeficiente de correlação linear (r) é muito utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, sendo necessário, em geral, um valor de $r > 0,90$ (BRASIL, 2003b).

A elaboração da curva de quantificação, também denominada curva de calibração analítica, são necessários vários pontos de calibração, ou seja, concentrações diferentes, sugere-se no mínimo cinco concentrações diferentes (LEITE, 2008).

3.5.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é expressa, em geral, em dois níveis (LEITE, 2008; BRASIL, 2003b):

1º - Repetitividade: concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo local e mesmo procedimento. Também pode ser denominado como repetibilidade ou precisão intra-corrída, podendo ser verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003a);

2º - Reprodutibilidade: É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição. Por tratar-se de um componente de validação de método executado por laboratórios diferentes em um estudo colaborativo, a reprodutibilidade também é denominada de precisão inter-laboratorial. Geralmente é aplicada à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias (BRASIL, 2003a).

A precisão (repetitividade e/ou reprodutibilidade) de um método analítico pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas.

3.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003a).

O limite de quantificação inferior ou limite de determinação (LQ) de um analito em uma amostra é o menor valor de concentração obtido com precisão (BRASIL, 2003a) e exatidão (LEITE, 2008) aceitáveis na condição definida para a análise

3.5.5 Fator de Recuperação

Toda amostra que recebe tratamento de análise (extração, concentração, etc) deve ter calculado experimentalmente o erro ou perda do analito. À porcentagem de erro ou perda da espécie em análise denomina-se recuperação, e ao número atribuído à quantidade de massa passível de ser extraída de uma amostra contendo outros componentes designa-se fator de recuperação (LEITE, 2008).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (BRASIL, 2003b) e, então, serem submetidas ao processo analítico (SPE e HPLC-PDA) com o objetivo de determinar o poder extrativo do método.

No entanto, é comum que uma parte substancial do analito permaneça na matriz após a extração, de modo que a extração é incompleta, e a subsequente medição fornece um valor inferior à verdadeira concentração da substância. Há a possibilidade de utilizar a recuperação para corrigir a quantificação, assim obter-se-ia a estimativa verdadeira da concentração de uma determinada substância. Segundo a IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (THOMPSON et al., 1999), o uso de fatores de correção baseados na recuperação possuem aplicabilidade duvidosa, pois o fator de recuperação pode variar entre diferentes matrizes e concentrações do analito.

3.5.6 Intervalo

O intervalo, também denominado faixa linear de trabalho, é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas (LANÇAS, 2004b).

A faixa linear de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra, ou concentração alvo, deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (BRASIL, 2003b).

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes e padrões

Todos os reagentes para análise cromatográfica eram grau analítico para HPLC. O metanol e a acetonitrila foram comprados das marcas Tedia e Carlos Erba, o ácido trifluoroacético (TFA) da Merck. A água ultrapura foi produzida com o sistema Milli-Q (Millipore).

Os padrões de microcistina-LR (pureza >90%), dissolvidos em metanol, foram adquiridos com a Unidade de Pesquisa em Cianobactérias (UPC, Universidade Federal do Rio Grande - FURG/RS) e armazenados em freezer -20°.

4.2 Desempenho do método cromatográfico

As características de desempenho do método, ou parâmetros de validação, investigadas foram:

- Linearidade;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Intervalo;
- Fator de recuperação;
- Precisão (repetitividade).

4.2.1 Linearidade e Curva de calibração analítica

Realizou-se um ensaio de linearidade com a construção da curva de calibração analítica com dez concentrações, 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g MC-LR.mL}^{-1}$, a partir de diluições do padrão (500 $\mu\text{g MC-LR.mL}^{-1}$). Todas as diluições do padrão foram realizadas com o solvente metanol, previamente filtrado em membrana PTFE (47 mm, 0,45 μm , Millipore).

A linearidade foi determinada pela análise de regressão linear da área do pico versus a concentração de microcistina-LR, sendo calculado o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo y (β), coeficiente angular (α), soma residual

dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98, segundo INMETRO (BRASIL, 2003b).

4.2.2 Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Intervalo

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados, respectivamente, pelas equações 2 e 3 (BRASIL, 2003a) a partir dos resultados do ensaio de linearidade.

$$LD = \frac{DP\alpha \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP\alpha \times 10}{IC} \quad (3)$$

Em que:

DP α = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = inclinação da curva de calibração.

O intervalo ou faixa linear do método refere-se ao limite de quantificação até a concentração máxima da linearidade (5,0 $\mu\text{g MC-LR.mL}^{-1}$).

4.2.3 Recuperação

A recuperação, expressa em porcentagem (%), é a medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente (LANÇAS, 2004b). Este parâmetro foi avaliado realizando-se a adição de 6 concentrações diferentes de microcistina-LR à matriz (filtrado da água bruta do Reservatório de Duas Bocas), também foi realizada a avaliação do branco (matriz sem adição de toxina). Considerou-se a concentração alvo igual a 1,0 $\mu\text{g MC-LR.L}^{-1}$, logo neste ensaio utilizou-se as concentrações 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. O ensaio foi realizado em triplicata e submetido à SPE, seguido de análise em sistema HPLC-PDA. A recuperação foi determinada pela equação:

$$\text{Fator de Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada.

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada.

C_3 = concentração adicionada.

4.2.4 Precisão: Repetitividade

Para a determinação da repetitividade do método foram analisadas 8 repetições da concentração alvo de microcistina-LR ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) e foi calculado o coeficiente de variação (CV) (Equação 5). O coeficiente de variação máximo admitido foi de 5% (BRASIL, 2003a).

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100 \quad (5)$$

4.3 Análise cromatográfica (HPLC) de microcistina-LR

Pré-tratamento da amostra

A avaliação de microcistina-LR dissolvida foi efetuada em um sistema HPLC-PDA, precedida de preparação da amostra (extração, purificação e concentração) pelo processo de Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE), conforme salienta Lanças (2004a). O procedimento de SPE das amostras foi realizado segundo metodologia proposta por Lawton e colaboradores (1994) e Albuquerque Júnior e colaboradores (2007), com modificações.

Todas as amostras foram acidificadas ao pH 3,1 ($\pm 0,05$) por adição de ácido Trifluoroacético (TFA) e filtradas em membrana GF-1 (Macherey-Nagel, 47mm), sendo o filtrado submetido ao processo de SPE (cartuchos PP Chromabond® C18ec, 6ml, 500mg) sob ação da gravidade. Antes da aplicação das amostras os cartucho de extração foram condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultra pura conforme orientação do fabricante. Após as amostras passarem pelos cartuchos, estes foram lavados com 20 mL de água ultra pura e com 20 mL de cada solução do gradiente de metanol (10%, 20% e 30%). As soluções que percolaram os

cartuchos durante o procedimento de lavagem foram descartados e estes foram secos por sucção à vácuo. Eluiu-se o analito com 20 mL da solução metanol:água:TFA (89,9:10:0,1 %v/v), o percolado foi evaporado em banho-maria à 45°C. Após completa evaporação, o resíduo foi ressuspensão em 1000 µL de metanol, sendo filtrado em membrana Millex PTFE (13 mm, 0,22 µm, Millipore) antes do armazenamento em *vials*, devidamente identificados, para injeção automática em HPLC.

Cromatografia líquida (HPLC)

Após vários testes de gradientes de eluição determinou-se as seguintes condições analíticas para a análise por HPLC, que são descritas a seguir.

O sistema de cromatografia líquida empregado foi o modelo SHIMADZU CBM-20A, com degaseificador DGU-20AS, bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, forno CTO-20A e detector de arranjo de diodos (PDA) SPD-M20A.

Todas as soluções utilizadas na fase móvel foram filtradas em membranas PTFE (47 mm, 0,45 µm, Millipore) e degaseificadas em um banho ultrassom (LimpSonic®) antes de usar.

A análise de microcistina-LR foi realizada por cromatografia de fase reversa utilizando coluna de escala analítica (C18 Symmetry 300, 250 x 4,6 mm, 5µm) com a separação realizada pelo gradiente de água e acetonitrila, ambos acidificados com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) (Tabela 2). A detecção de microcistina-LR foi realizada por análise em fotodiodo (PDA) com o espectro de absorção em uma faixa de 190 a 300 nm, sendo a absorção máxima da microcistina-LR a 238 nm (LAWTON et al., 1994). O volume injetado no cromatógrafo foi igual a 30 µL e a temperatura do forno e do detector foi controlada a 30°C.

Tabela 2- Condições de gradiente linear a 0,8 mL.min⁻¹ utilizado para a análise de microcistina-LR por HPLC-PDA.

	Tempo (minutos)			
	0	12	13	28
Solvente A (%)	65	48	65	65
Solvente B (%)	35	52	35	35

Solvente A = água + TFA 0,1% e Solvente B = Acetonitrila + TFA 0,1%

Nas avaliações cromatográficas cada réplica dos tratamentos foi analisada em duplicata. Os cromatogramas foram integrados e analisados em 238 nm com o software LC Solution (LabSolution, Shimadzu).

4.4 Avaliação de amostras ambientais

Uma vez que a metodologia de quantificação de microcistina-LR por HPLC-PDA foi validada, esta foi empregada para a avaliação de mananciais superficiais da Região da Grande Vitória (RGV). Além de corpos d'água também foi avaliada uma lagoa facultativa de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) (Tabela 3).

Tabela 3- Corpos d'água avaliados quanto à presença de microcistina-LR e às variáveis físicas, químicas e hidrobiológicas.

Fonte de amostras	Localização	Principais usos
Lagoa do Parque Pedra da Cebola	Vitória, ES	Paisagismo
Lagoa Jacuném	Serra, ES	Pesca e Recreação
Reservatório de Duas Bocas*	Cariacica, ES	Abastecimento público
Lagoa Facultativa de ETE	Vitória, ES	Tratamento de efluente doméstico
Lagoa Juara	Serra, ES	Piscicultura e recreação

* As amostras não foram coletadas diretamente no reservatório, mas na entrada da estação de tratamento de água que, por sua vez, capta água no manancial.

Visando compreender melhor os resultados de avaliação de microcistina-LR no ambiente também foram avaliadas variáveis físicas, químicas e hidrobiológicas nas diversas tipologias de águas. Os valores obtidos foram utilizados para inferir sobre a qualidade da água relativa aos seus respectivos usos baseando-se nas Resoluções do CONAMA nº 357/2005 e nº 274/2000.

Em cada manancial selecionou-se uma estação amostral onde foram realizadas duas coletas no período de setembro a dezembro de 2009. A avaliação de microcistina-LR dissolvida foi realizada por cromatografia líquida (HPLC) e as análises de variáveis físicas, químicas e hidrobiológicas seguiram as metodologias propostas por APHA (1995).

4.4.1 Mananciais Superficiais

Lagoa do Parque Pedra da Cebola

O Parque Pedra da Cebola está localizado no Município de Vitória, Espírito Santo. O parque também conta com jardim oriental, duas lagoas artificiais e mirante sobre o paredão rochoso (PMV, 2009).

A lagoa selecionada para estudo localiza-se próxima à Fazendinha (curral), figura 2. Trata-se de um manancial artificial utilizado para fins paisagísticos, sendo proibida pesca ou recreação. A lagoa apresenta-se frequentemente com coloração esverdeada, o que indica ocorrência de floração algal, este fenômeno pode ser favorecido pela baixa profundidade do ambiente, além da presença de animais, como patos, gansos e tartarugas, que ao defecarem contribuem com o aporte de nutrientes para este ecossistema.

Lagoa Jacuném

A lagoa Jacuném, com área aproximada de 1,4 Km², abrange uma grande área urbana do município da Serra - ES, estando inserida quase que totalmente entre o centro industrial – CIVIT I e II – e os bairros Barcelona e proximidades de Feu Rosa (Figura 3). Também é conhecida como Lagoa Jaconé. Os principais contribuintes são os córregos Jacuném, Veneer e Barro Branco (PMS, 2009).

A lagoa já foi utilizada para abastecimento público, porém em 1983 foram desativados os sistemas de captação e tratamento. Atualmente o manancial é muito utilizado para pesca e recreação. Este corpo d'água vem sofrendo agressões ambientais no decorrer dos anos pelo mau uso e ocupação do solo de sua bacia de contribuição (SILVA, 1998). As coletas foram realizadas no segundo braço da lagoa, em local próximo a uma área residencial.

Reservatório de Duas Bocas

O reservatório Duas Bocas localiza-se na Reserva Biológica de Duas Bocas em Cariacica, ES. A Reserva Biológica tem sua história fortemente vinculada à produção de água para abastecimento dos núcleos urbanos (Cariacica e Vitória), atualmente destina-se ao abastecimento doméstico de 25% do município de Cariacica (IDAF, 2009) (Figura 4). As coletas foram realizadas na adutora da Estação de Tratamento de Água de Duas Bocas, CESAN.



Figura 2- Vista da Lagoa do Parque Pedra da Cebola, Vitória, ES.

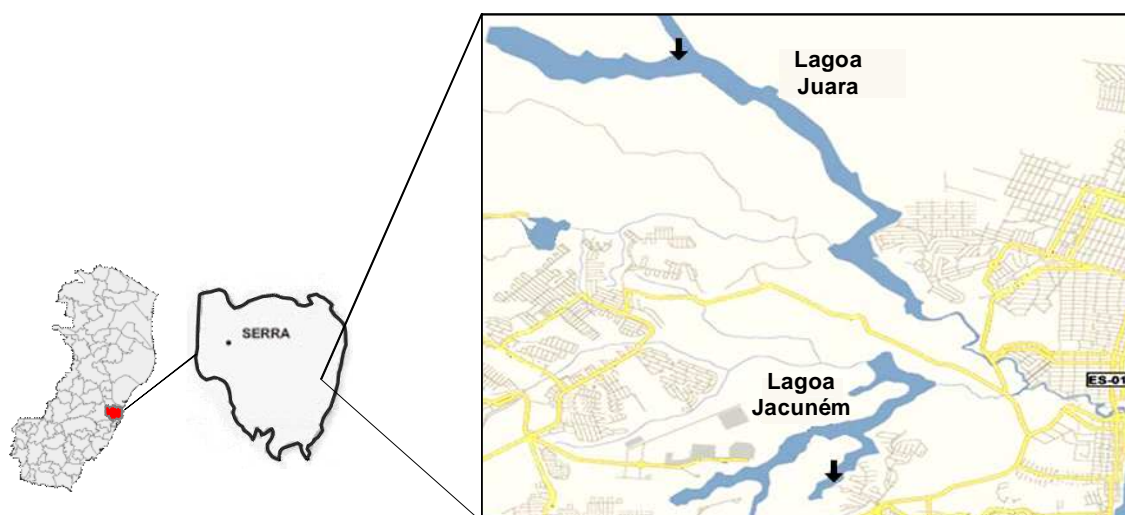


Figura 3- Localização das lagoas Juara e Jacuném, Serra, ES. As setas indicam as estações amostrais.

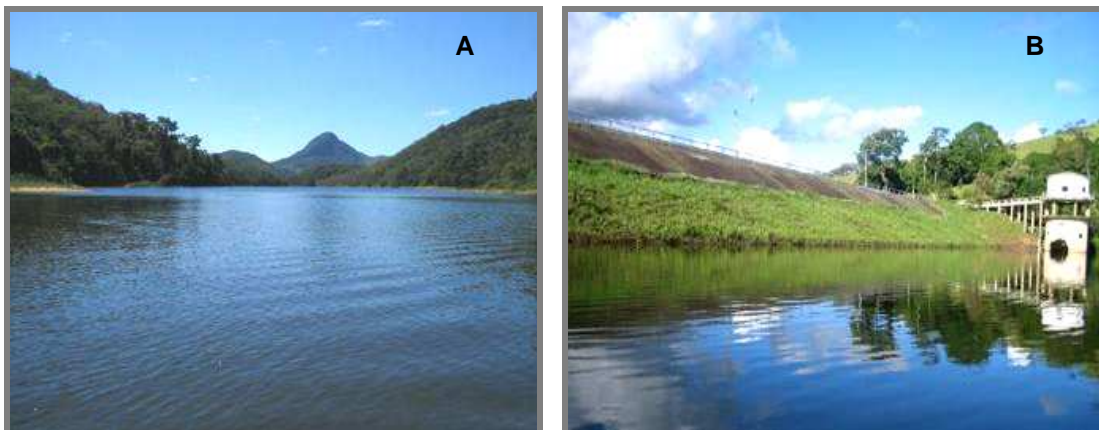


Figura 4- À esquerda, (A) imagem do Reservatório de Duas Bocas; à direita, (B) captação de água para a ETA Duas Bocas, Cariacica, ES. (Fonte: <<http://www.idaf.es.gov.br/>>).

Lagoa Facultativa de ETE

A Estação de Tratamento de Esgoto de Jardim Camburi (Figura 5), localizada Vitória - ES, trata de esgoto sanitário com característica predominantemente residencial (PASSAMANI, 2001). A ETE é composta com uma lagoa tipo aerada seguida de duas lagoas facultativas, a vazão média atual é de 234 L.s^{-1} . As coletas foram realizadas na segunda lagoa facultativa, próximo à saída do efluente, a área da lagoa é de 61.054 m^2 , com profundidade de 2 m e nível d'água 1,9 m (CESAN, 2009).

Lagoa Juara

A lagoa Juara é a maior lagoa do município da Serra/ES com $2,8 \text{ km}^2$ de área, faz parte da bacia hidrográfica do Rio Jacaraípe, tendo suas extremidades nos distritos de Jacaraípe e Serra Sede (Figura 3). Localiza-se predominantemente em área rural, sendo sua área de drenagem basicamente ocupada por pastagens, plantios de eucalipto e seringueiras, existindo poucas áreas com vegetação ciliar nativa conservada/preservada (PMS, 2009).

O manancial abriga um projeto de piscicultura - criação de tilápias, com capacidade para uso de até 150 tanques-rede na lagoa (Figura 6), o projeto é realizado através da Associação de Pescadores da Lagoa do Juara, com o patrocínio da Prefeitura Municipal da Serra, Banco do Brasil, SEBRAE e Arcelor Mittal. Conta com restaurante onde são servidos pratos à base da tilápia e com a venda de peixes frescos abatidos na hora. O projeto contempla 30 famílias que sobrevivem com o resultado da criação e pesca da tilápia (PMS, 2009). As coletas foram realizadas ao

lado dos tanques-redes.



Figura 5- Vista Aérea da Estação de Tratamento de Esgoto de Jardim Camburi, Vitória, ES. A seta indica a estação de amostragem (Fonte: <<http://maps.google.com.br/>>).



Figura 6- Tanques redes de cultivo de tilápia localizados na Lagoa Juara, Serra, ES.

4.4.2 Análise de microcistina-LR dissolvida

As amostras ambientais para a avaliação de microcistina-LR foram coletadas na subsuperfície do manancial ou na entrada da Estação de Tratamento de Água (ETA). As amostras foram coletadas em frascos de polietileno, mantidas ao abrigo da luz e refrigeradas até serem analisadas.

A água coletada em cada estação amostral foi dividida em dois tratamentos, ambos em triplicatas de volume 1L, o primeiro foi denominado **Amostra Bruta**, trata-se da água bruta. O outro tratamento, em que se adicionou solução padrão de microcistina-LR à água, é o **Controle Positivo**. Após a divisão dos tratamentos as amostras foram submetidas ao processo de SPE e HPLC-PDA (Figura 7 e 8) como descrito no item 4.3.

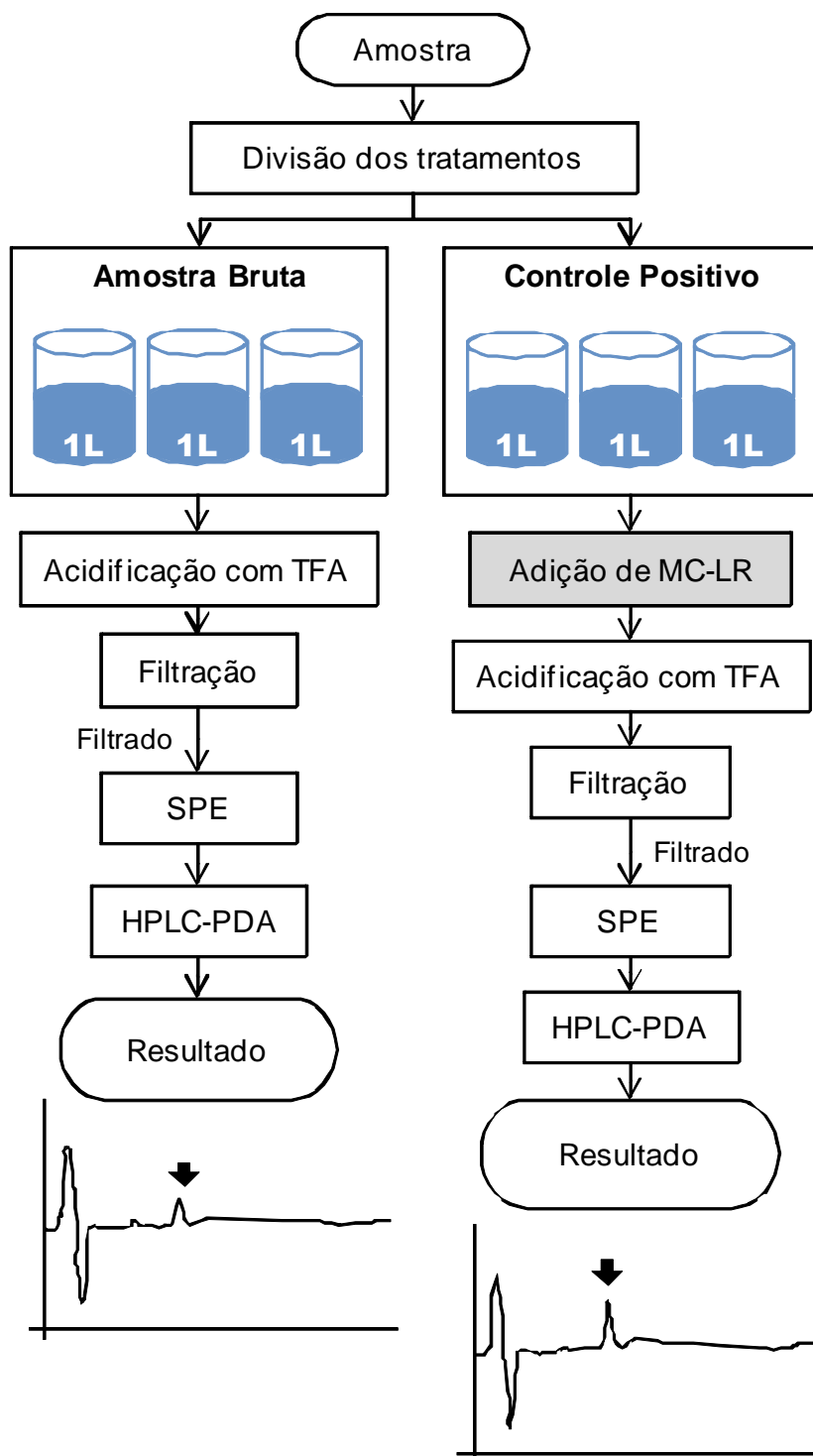


Figura 7- Fluxograma do procedimento de avaliação de microcistina-LR dissolvida adotado.

O controle positivo para cada tipologia de água foi realizado para verificar o fator de recuperação do analito (equação 4), visto que as amostras podem ter grandes diferenças em sua composição química, o que pode interferir no processo de extração ou na detecção do sinal do analito.



Figura 8- À esquerda, (A) extração em fase sólida dos tratamentos Amostra Bruta e Controle Positivo, (n=3). À direita, (B) amostra percolando o cartucho de extração.

4.4.3 Análises físicas, químicas e hidrobiológicas

Foram avaliadas variáveis físicas, como cor verdadeira (real), turbidez e temperatura; químicas, como demanda bioquímica de oxigênio – DBO₅, demanda química de oxigênio – DQO, pH, alcalinidade, fósforo total, ortofosfato, nitrogênio total Kjeldahl e nitrogênio amoniacal total; e hidrobiológicas, como clorofila-a.

Foram observados dados climáticos de temperatura (°C) e precipitação (mm) obtidos na estação meteorológica automática A612, em Vitória, ES (CEUNES, 2010; INCAPER, 2010).

Cor Real

A determinação da cor das amostras foi realizada pelo método Colorimétrico, APHA (1995), sendo expressa na unidade de medida UC ou mg Pt.L⁻¹.

Turbidez

A determinação da turbidez foi realizada pelo método Nefelométrico (2130 B), APHA (1995), sendo expressa na unidade de medida UNT.

Temperatura e pH

A temperatura da água foi determinada pelo sensor de temperatura e o pH com o eletrodo específico, as medidas foram obtidas em campo.

DBO₅

A DBO₅ é a quantidade de oxigênio consumido durante um período de 5 dias na temperatura de incubação de 20°C, expressa em mg O₂.L⁻¹. Esta variável foi determinada pelo método OxiTop, APHA (1995).

DQO

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) representa a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação da matéria orgânica através de um agente químico, sendo expressa em mg O₂.L⁻¹. Realizou-se a determinação de acordo com APHA (1995).

Alcalinidade

A alcalinidade (mg CaCO₃.L⁻¹) foi determinada por método titrimétrico (2320) segundo APHA (1995).

Fósforo Total (PT)

A quantificação de fósforo total (mg P.L⁻¹) foi realizada através do método do ácido ascórbico (4500-P E) segundo com APHA (1995).

Ortofósforo ou Fósforo Dissolvido (PD)

Utilizou-se o método do ácido ascórbico (4500-P E), proposto por APHA (1995), para a quantificação de fósforo dissolvido (mg.L⁻¹).

Nitrogênio Total Kjeldahl

O teor nitrogênio total foi expresso em mg N.L⁻¹ e foi determinado pelo método semi-micro-Kjeldahl (4500-N_{ORG} C), segundo com APHA (1995).

Nitrogênio Amoniacal

A concentração de nitrogênio amoniacal foi expresso em mg.L^{-1} e foi determinado pelo método titrimétrico (4500-NH₃ C), segundo com APHA (1995).

Clorofila-a

Para a análise de clorofila-a filtrou-se a amostra em membrana GF-1 (Macherey-Nagel, 25mm) até a saturação do filtro. A partir da membrana contendo as células foi realizada a extração com 10 mL do solvente acetona 90%, no escuro e sob refrigeração por 24h. Em seguida centrifugou-se o material por 30 minutos a 3.000 rpm e, utilizou-se o sobrenadante para determinar por espectrofotometria a leitura a 665 nm e 750 nm, antes e após acidificação com HCl (STRICKLAND e PARSONS, 1972). Para a determinação de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) foi utilizada a fórmula proposta por Lorenzen (1967).

4.4.4 Índice de Estado Trófico

O Índice de Estado Trófico (IET) tem por finalidade classificar corpos d'água em diferentes graus de trofia (CETESB, 2010). O IET apresentado é composto pelo Índice do Estado Trófico para o fósforo total – IET(PT) e o Índice do Estado Trófico para a clorofila-a – IET(Cl-a), modificados por Lamparelli (2004, *Apud*: CETESB, 2010), segundo as equações:

$$\text{IET (Cl-a)} = 10 \times \left(6 - \left(\frac{0,92 - (0,34 \times \ln \text{Cl-a})}{\ln (2)} \right) \right) \quad (6)$$

$$\text{IET (PT)} = 10 \times \left(6 - \left(\frac{1,77 - (0,42 \times \ln \text{PT})}{\ln (2)} \right) \right) \quad (7)$$

$$\text{IET} = \frac{\text{IET (PT)} + \text{IET (Cl-a)}}{2} \quad (8)$$

Onde:

PT: concentração de fósforo total medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

Cl-a: concentração de clorofila a medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

In: logaritmo natural.

O IET das lagoas avaliadas foi calculado com o uso das médias dos valores de clorofila-a e fósforo total obtido nas duas coletas. Os limites estabelecidos para as diferentes classes de trofia para reservatórios estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação do Estado Trófico para reservatórios segundo Índice de Carlson Modificado (CETESB, 2010).

Categoria de estado trófico	Ponderação
Ultraoligotrófico	$IET \leq 47$
Oligotrófico	$47 < IET \leq 52$
Mesotrófico	$52 < IET \leq 59$
Eutrófico	$59 < IET \leq 63$
Supereutrófico	$63 < IET \leq 67$
Hipereutrófico	$IET > 67$

4.5 Análise Estatística

A estatística descritiva utilizada para a análise dos resultados foi a média aritmética como medida de tendência central para os dados em triplicata, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) como medidas do grau de dispersão dos dados das médias. O teste de médias foi realizado através da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p=0,05$). Para análise de linearidade foi calculado o coeficiente de correlação linear (r) e verificado sua significância pelo teste t-Student e para a curva de regressão foi utilizado o teste F. todas a análises estatísticas foram processados no software BioEstat 4.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos parâmetros de desempenho do método

O gradiente crescente de 35 a 52% de acetonitrila (Tabela 2) demonstrou ser eficiente para amostras testadas, pois permitiu a determinação da microcistina em cromatógrafo líquido em um curto intervalo de tempo, 28 minutos. A eluição da microcistina-LR ocorreu no tempo de retenção médio igual a 14,5 minutos (Figura 9).

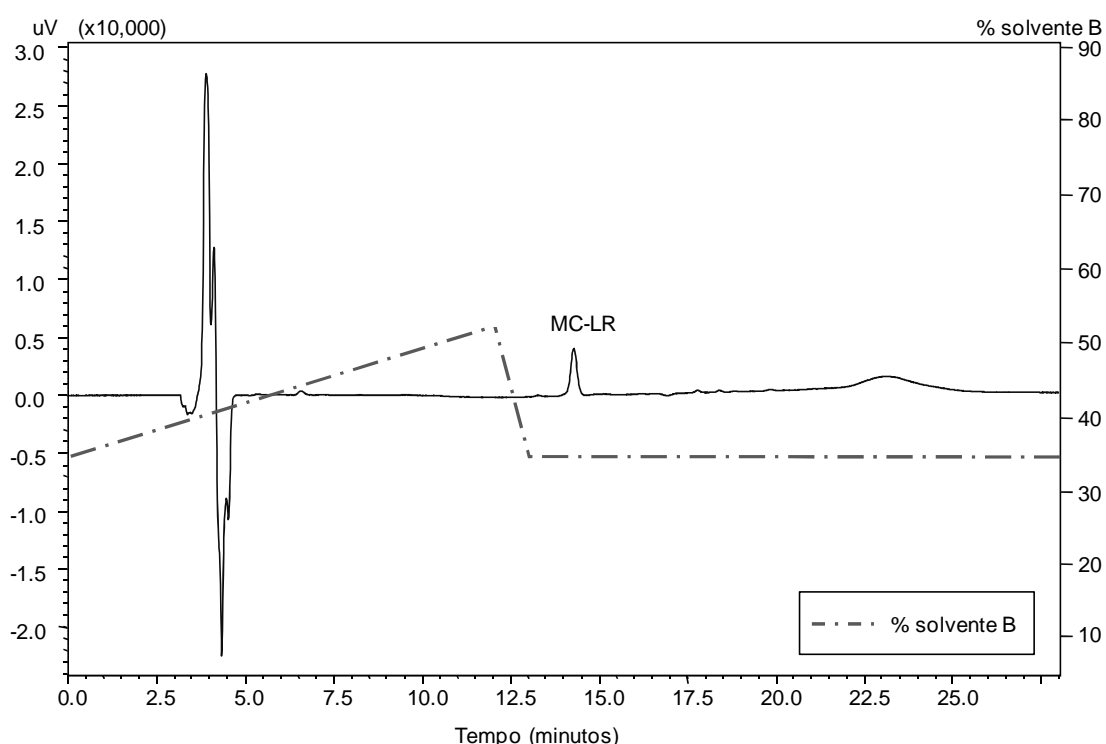


Figura 9- Cromatograma da solução padrão de microcistina-LR ($1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtido por eluição em gradiente acetonitrila (solvente B) e água, ambos acidificados com TFA.

Definido esse gradiente, foram realizados os ensaios de validação do método proposto, verificou-se a linearidade, o limite de detecção e de quantificação, o intervalo, o fator de recuperação e a precisão (repetitividade) como características de desempenho do método.

No estudo de linearidade confeccionou-se o gráfico de correlação entre a área do pico cromatográfico e as concentrações de microcistina (Figura 10), obteve-se a equação da reta de $y = 20966x - 3433$ com coeficiente de determinação (r^2) igual a 99,7%, sendo o coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9989 (Tabela 5),

portando atendendo aos requisitos de linearidade exigidos pela ANVISA e INMETRO (BRASIL, 2003a, b).

Diversos estudos de determinação de microcistinas obtiveram coeficiente de correlação linear (r) superior a 0,99 utilizando as técnicas HPLC/MALDI-TOF (ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2007), HPLC-UV (SANCHES et al., 2007) e HPLC-PDA (ANDRADE, 2009; GURBUZ et al., 2009; LAWTON et al., 1994).

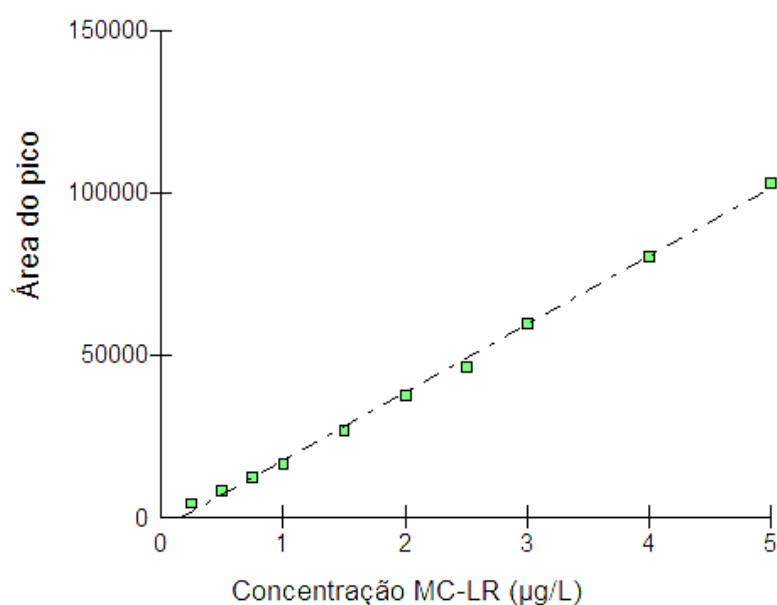


Figura 10- Curva resposta relacionando a área do pico de microcistina-LR (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).

Tabela 5- Concentrações de microcistina-LR ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r). (n=8)

Concentração de MC-LR ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Área média	Equação de regressão	Coeficiente de determinação (r^2)	Coeficiente de correlação (r)
0,25	4430,5			
0,50	8169,5			
0,75	12253,7			
1,00	16432,8			
1,50	26694,5	$y = 20966x - 3433$	$r^2 = 0,9978$	$r = 0,9989$
2,00	37725,7			
2,50	46475,6			
3,00	59571,2			
4,00	80485,5			
5,00	103227,3			

Foi realizado o cálculo do limite de detecção e quantificação de microcistina-LR de modo a estabelecer o intervalo de trabalho ou quantificação do método. Desse modo observou-se que o método tem capacidade de indicar a presença da toxina a partir da concentração de $0,17 \mu\text{g MC-LR.mL}^{-1}$ e o valor mínimo de quantificação é igual a $0,37 \mu\text{g MC-LR.mL}^{-1}$ (Tabela 6). Portanto o método é capaz de quantificar o analito na concentração de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, valor limite de microcistina-LR em água para consumo humano segundo Portaria do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) e Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998). Os valores do limite de detecção e quantificação obtidos foram próximos aos encontrados por Andrade (2009), $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, em sistema HPLC-PDA.

A repetitividade (precisão) foi calculada para a concentração de $1,0 \mu\text{g MC-LR.mL}^{-1}$ e obteve-se o coeficiente de variação (CV) igual a 2,1 % (Tabela 6). Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos coeficiente de variação de até 20% (RIBANI et al., 2004), a ANVISA (BRASIL, 2003a) não admite valores superiores a 5%.

É importante para a proteção da saúde obter-se estimativas precisas das concentrações de microcistina nas amostra de água, o método validado apresentou satisfatória linearidade, recuperação e precisão, portanto foi considerado aceitável para a determinação de microcistina-LR.

Tabela 6- Resultados obtidos para os parâmetros de validação do método de avaliação de MC-LR.

Parâmetros de Validação	Valores
Linearidade	$0,25 - 5,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de detecção	$0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de quantificação	$0,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Intervalo de quantificação	$0,37 - 5,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Fator de recuperação médio	62,7 %
Precisão ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$)	2,1% (CV)

A extração em fase sólida (SPE) foi utilizada para a concentração de amostras e para eliminar contaminantes da matriz, como esta etapa é um processo de extração química, calculou-se o fator de recuperação para diferentes concentrações do analito e obteve-se o valor médio de 62,7% (Tabela 7).

A recuperação pode ser dependente da concentração do analito, por exemplo, em teores elevados, em que a substância está em excesso, a recuperação pode ser parcial (THOMPSON et al., 1999). Observou-se, por meio de análise estatística (ANOVA), que não houve diferença estatística do fator de recuperação para o intervalo de concentrações entre 0,5 e 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de microcistina-LR (Tabela 7, Figura 11).

Tabela 7- Resultados da avaliação da recuperação em diferentes concentrações do analito (MC-LR) na matriz do Reservatório de Duas Bocas. (n = 3)

MC-LR adicionada ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MC-LR obtido ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fator de recuperação (%)
0,0	0,0	–
0,5	0,38	75,5
0,8	0,51	63,4
1,0	0,63	63,0
1,5	0,91	60,8
2,0	1,14	57,2
2,5	1,40	56,2
Média		62,7
CV		11,1

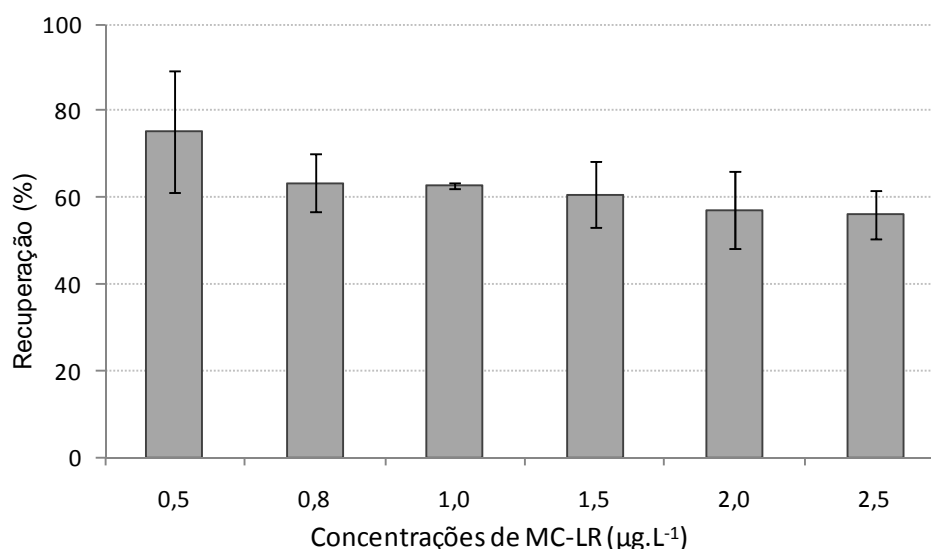


Figura 11- Fator de recuperação e respectivos desvios padrões para as concentrações de 0,5 a 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC-LR na matriz do Reservatório de Duas Bocas. (n = 3)

O fator de recuperação da toxina foi inferior a 100%, ressalta-se que os ensaios de recuperação foram realizados utilizando-se água bruta do reservatório de Duas Bocas. Compostos como ficocianinas, ficoeritrinas, clorofilas e carotenóides, mesmo uma pequena quantidade, podem atrapalhar a recuperação da microcistina (STREIT et al. 2005 *Apud*: ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2007), portanto é provável que tais moléculas existam na matriz ambiental, e haja competição pelos sítios ativos do cartucho (C18), diminuindo a capacidade de adsorção da toxina pelo cartucho.

Embora seja desejável a realização de recuperações de quase 100%, a fim de maximizar a sensibilidade do método, não é provável que as recuperações acima de 50% irão comprometer a integridade do método (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2007).

5.2 Avaliação de microcistina-LR em amostras ambientais

Foram realizadas avaliações da presença de microcistina-LR em amostras ambientais de mananciais superficiais (lagoas e reservatórios) e de efluente de Estação de tratamento de esgotos. As amostras foram divididas em dois tratamentos, amostra bruta e controle positivo. O último tratamento teve como objetivo avaliar o fator de recuperação nas diferentes matrizes estudadas, além de indicar o tempo de retenção da toxina.

As diversas tipologias de água analisadas apresentaram valor médio de recuperação igual a 51,9%, observou-se valores extremos de recuperação, de 0 a 107%, o coeficiente de variação deste parâmetro foi igual a 57,4% (Tabela 8). Portanto, para evitar a obtenção de valores super e subestimados, optou-se por não utilizar um fator de correção baseado na recuperação para a quantificação das amostras padrão. As amostras foram quantificadas utilizando-se a equação de linearidade obtida no processo de validação, $y = 20966x - 3433$, onde y é a área do pico cromatográfico referente à microcistina-LR e x é a concentração da microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

Os cromatogramas obtidos através da análise por HPLC-PDA apresentaram o pico cromatográfico referente à microcistina-LR, com o tempo de retenção médio igual a 14 minutos. Os picos encontrados nas amostras brutas foram comparados aos dos cromatogramas dos respectivos controles positivos (Figura 12), assim através do

tempo de retenção da toxina, além do espectro de absorção UV (238 nm), pode ser confirmada a presença do analito nas amostras.

Tabela 8- Resultados da avaliação de microcistina-LR por HPLC nas amostras brutas e nos controles positivos. (n=3)

Amostras	Coletas	Amostra bruta ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Controle Positivo*		
			Valor de MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Recuperação (%)
			Adicionado	Obtido	
Lagoa do Parque	28/09/2009	<0,17	2,50	1,60	64,2
Pedra da Cebola	11/11/2009	0,42	2,50	1,84	56,9
Lagoa Jacuném	13/10/2009	4,78	2,50	6,93	85,9
	17/11/2009	0,41	1,00	0,82	41,1
Reservatório de Duas Bocas	20/10/2009	< 0,37	2,50	1,46	48,8
	24/11/2009	< 0,37	1,00	0,60	28,6
Lagoa Facultativa de ETE	05/11/2009	<0,17	2,50	2,67	107,0
	01/12/2009	<0,17	1,00	<0,17	0,0
Lagoa Juara	24/11/2009	<0,17	2,50	0,89	35,7
	21/12/2009	<0,17	1,00	0,51	51,0
			Média		51,9
			CV		57,4

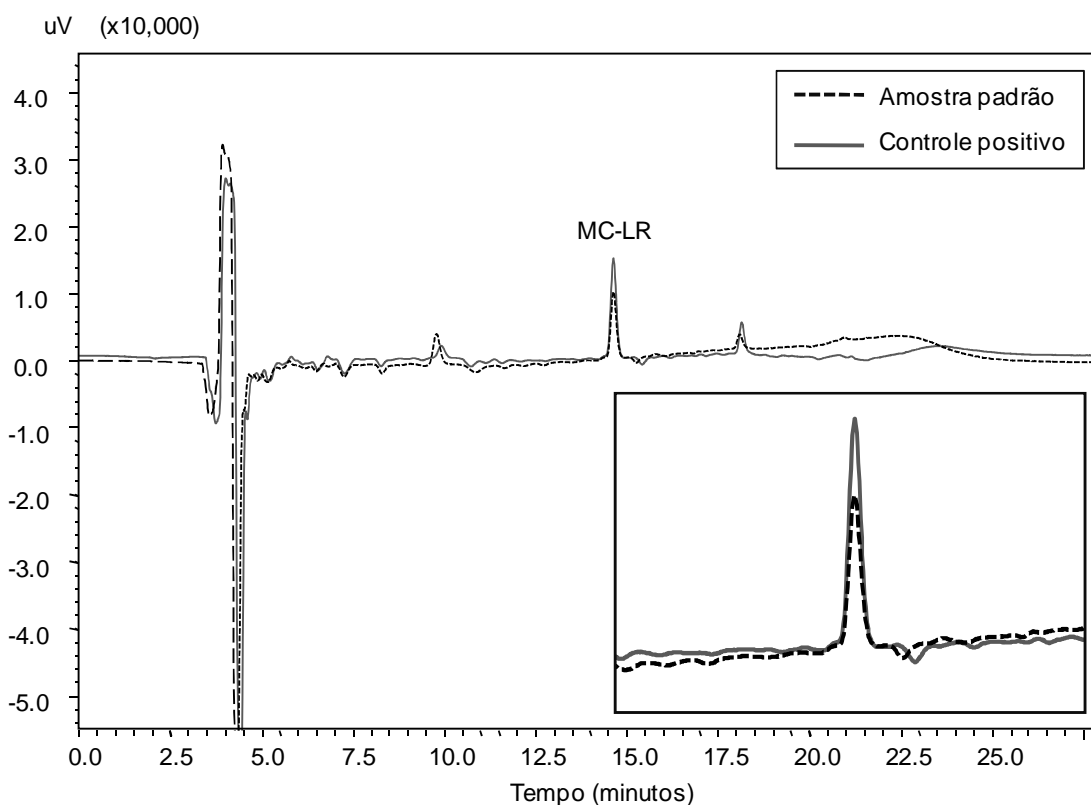


Figura 12- Perfil cromatográfico da amostra bruta e controle positivo da Lagoa Jacuném obtidos na amostragem de 13 de outubro de 2009.

Não foi observada a ocorrência de microcistina-LR na primeira amostragem do efluente da lagoa facultativa da ETE e nas duas avaliações realizadas na lagoa Juara (Tabela 8). Os valores de microcistina-LR obtidos nas amostras brutas da lagoa do Parque Pedra da Cebola e da lagoa Jacuném encontraram-se dentro da faixa de quantificação ($0,37 - 5,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$), entretanto, para as amostras do Reservatório de Duas Bocas, foi detectada a presença da toxina (Tabela 8), mas não foi possível quantificá-la, os valores estimados eram menores que o limite de quantificação do método, $0,37\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O método avaliado mostrou-se eficiente para a determinação de microcistina-LR para várias tipologias de água, exceto para o efluente de ETE. A primeira avaliação realizada na lagoa facultativa de ETE, em 05/11/09, apresentou o melhor resultado do fator de recuperação, 107%. Porém, na segunda amostragem, em 01/12/09, os cromatogramas dos controles positivos não apresentaram o pico referente a toxina, portanto admitiu-se que a recuperação da toxina foi igual a 0% (Tabela 8).

Com a finalidade de averiguar se houve a co-eluição de interferentes no processo de extração e purificação (SPE) da amostra contaminada, foi adicionado $1,0 \mu\text{g}$ de microcistina-LR diretamente no *vial* contendo o extrato dos controles positivos, o material foi homogeneizado e foi novamente submetido à análise em cromatógrafo líquido. Não foi observado o pico referente à toxina (Figura 13), logo se sugere que a amostra tratada contenha compostos interferentes que estejam mascarando a toxina e que o processo de preparação da amostra (extração e purificação) não foi capaz de eliminá-los.

Íons metálicos presentes na água, como Fe e Al, podem interferir reduzindo a detecção de microcistinas em análise por cromatografia líquida - HPLC (Oliveira et al., 2005). Andrade (2009) observou, em estudo de avaliação de microcistina-LR por HPLC-UV em extratos de florações de cianobactérias coletadas em piscicultura, que as amostras que não passaram por etapa de extração em fase sólida (SPE) apresentaram picos interferentes que eluíram próximos ao tempo de retenção característico da microcistina-LR e, mesmo na amostras submetidas a SPE, esses picos ainda foram observados. Portanto, o autor (ANDRADE, 2009) sugere que em amostras de florações de cianobactérias a etapa de SPE seja estudada a cada caso, conforme a dificuldade de detecção e quantificação devido à presença de picos interferentes.

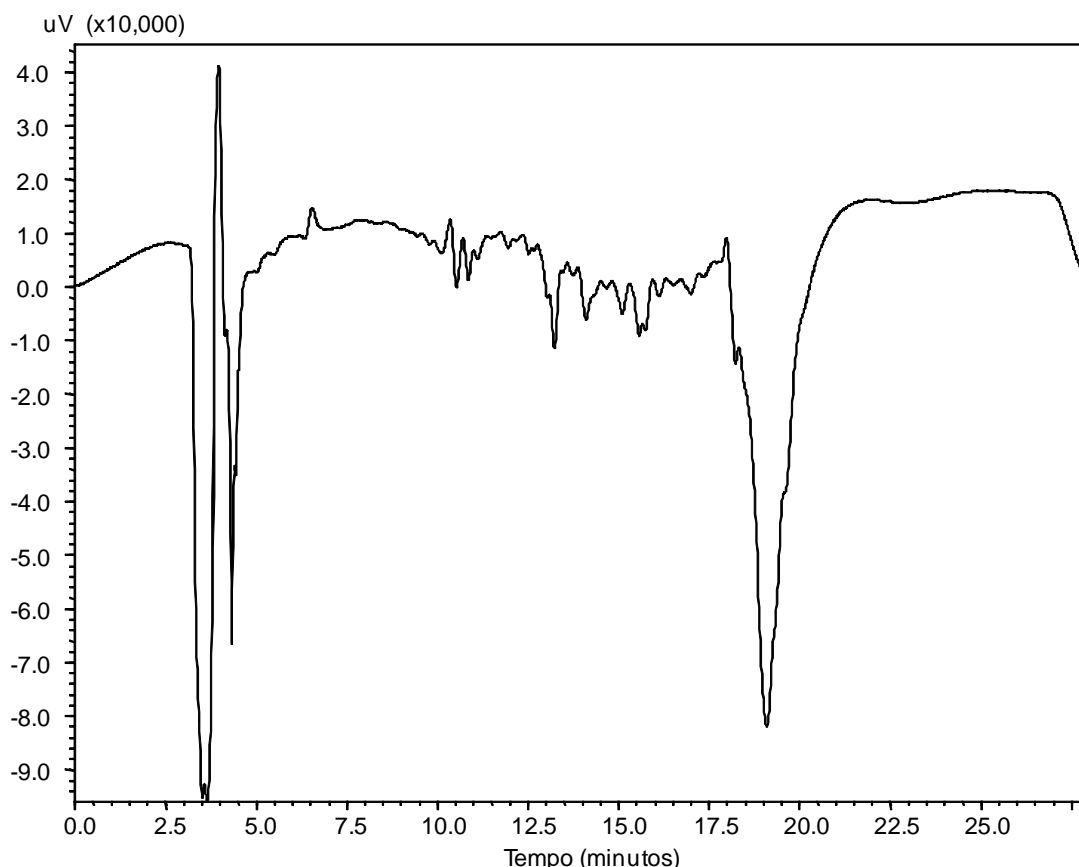


Figura 13- Perfil cromatográfico do controle positivo do efluente de ETE, amostragem de 01 de dezembro de 2009, após acréscimo de 1,0 µg de MC-LR diretamente no *vial*.

O resultado obtido na avaliação dos tratamentos “controle positivo” foi essencial para evidenciar a incapacidade de detecção da toxina em efluente de tratamento de esgoto, isto demonstra a importância de realizar este tipo de tratamento como meio de controle da qualidade do método quando há uma etapa de extração envolvida (THOMPSON et al., 1999). Sugere-se que, para este tipo de matriz (efluente de tratamento de esgoto), seja utilizada outra metodologia de extração e purificação da amostra.

5.3 Fatores ambientais, usos dos mananciais e presença de microcistina-LR

Em todas as amostras ambientais (lagoas naturais, artificial e de tratamento de esgoto) o pH apresentou-se na faixa de 6,2 até 9,3 (Tabela 9), condições favoráveis ao crescimento de cianobactérias. OUDRA e colaboradores (2002) observaram pH neutro-alcalino (7,2 a 8,9) durante episódios de florações tóxicas do gênero *Microcystis* em um lagoa eutrófico no Marrocos.

Tabela 9 – Resultados das análises físico-químicas e hidrobiológicas das amostras dos mananciais da Região da Grande Vitória.

Variáveis	Pedra da Cebola		Jacuném		Duas Bocas		Juara		Efluente de ETE	
	28/09	11/11	13/10	17/11	20/10	24/11	24/11	21/12	05/11	01/12
Temperatura (°C)	26,8	28,2	25,3	27,2	25,2	25,0	29,7	29,7	28,4	32,2
pH	9,3	7,5	6,9	6,9	6,9	6,2	6,8	6,7	7,7	7,6
Clorofila-a (µg.L ⁻¹)	633,2	127,0	84,2	65,4	22,6	18,8	7,9	7,8	100,4	585,8
Cor real (mg Pt.L ⁻¹)	41,3	20,9	27,7	54,9	26,0	26,0	173,8	206,1	41,3	126,2
Turbidez (UNT)	264	27	42	13	5	3	11	7	59	140
ALCAL (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	66	10	10	30	12	12	23	24	12	12
NTK (mg.L ⁻¹)	1,4	7,0	2,5	1,4	0,0	0,0	0,5	0,8	14,0	27,7
NH ₃ (mg.L ⁻¹)	1,4	3,5	1,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,7	1,4	1,4
DBO ₅ (mg.L ⁻¹)	60,0	10,0	20,0	5,0	2,0	1,5	2,0	2,5	50,0	65,0
DQO (mg.L ⁻¹)	243	16	31	23	11	0,0	0,0	32	157	313
PT (mg.L ⁻¹)	1,92	0,47	0,31	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	2,65	1,38
PD (mg.L ⁻¹)	0,20	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
MC-LR (µg.L ⁻¹)	<0,17	0,42	4,78	0,41	<0,37	<0,37	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17

Os ambientes aquáticos brasileiros apresentam em geral temperaturas na faixa de 20 °C a 30 °C (BRASIL, 2006), as temperaturas médias variaram de 25 a 29,7 °C nos mananciais naturais e de 26,8 a 32,2 °C nos ambientes artificiais (Tabela 9). Essa faixa de temperatura é ótima para o crescimento de cianobactérias em sistemas aquáticos (HOWARD e EASTHOPE, 2002).

As coletas para avaliação da toxina e dos fatores físicos-químicos e hidrobiológicos foram realizadas no período de setembro a dezembro de 2010, destaca-se que no mês de outubro houve elevada precipitação (600 mm) na região de Vitória (Figura 14), sendo que a chuva ocorreu principalmente na última semana de outubro (dias 28 a 31) (Figura 15).

As chuvas intensas ocorridas no mês de outubro situaram-se entre a primeira e a segunda coleta na lagoa do parque Pedra da cebola, lagoa Jacuném e reservatório de Duas Bocas. Já a lagoa Juara e a lagoa facultativa de ETE foram avaliadas após o período de chuvas.

A lagoa do Parque Pedra da Cebola apresentou redução dos valores de pH, clorofila-a, cor real, turbidez, alcalinidade, DBO, DQO, fósforo total e dissolvido (Tabela 9) da primeira para a segunda amostragem, acredita-se que tais alterações sejam resultado das chuvas no período anterior à segunda coleta (11/11/09) (Figura 14 e 15) que exerceram um efeito diluidor no manancial artificial. O manancial artificial do Parque Pedra da Cebola foi classificado como hipereutrófico (IET = 77, Tabela 10), pois apresenta elevados teores de fósforo total (1,93 e 0,47 mg.L⁻¹) e clorofila-a (633,2 e 127,0 µg.L⁻¹).

Apesar da elevada biomassa algal, indicada pelo teor de clorofila-a (633,2 µg.L⁻¹), e elevado teor de nutrientes na amostragem de 28/09/10 (Tabela 9), observou-se a presença de microcistina-LR (0,42 µg.L⁻¹) apenas na segunda avaliação da lagoa do Parque Pedra da Cebola (Tabela 8). De acordo com Sivonen (1996) o momento em que há a maior concentração de microcistina não necessariamente coincide com a maior biomassa de cianobactérias. Entre as coletas observou-se a redução do teor de clorofila-a em quase cinco vezes, indicando que houve redução da biomassa algal e, portanto, a morte de organismos do fitoplâncton, o que pode ter ocasionado a liberação da toxina na água.

A presença de microcistina-LR neste manancial artificial não oferece riscos à saúde humana visto que a pesca e a recreação no mesmo são proibidas. Devido à sua finalidade paisagística a lagoa do Parque Pedra da Cebola pode ser enquadrado como Classe 4 pela Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005). Observando as condições de pH para este tipo de ambiente (faixa de 6,0 - 9,0), na primeira coleta o valor foi acima do padrão, sendo igual a 9,3 (Tabela 9).

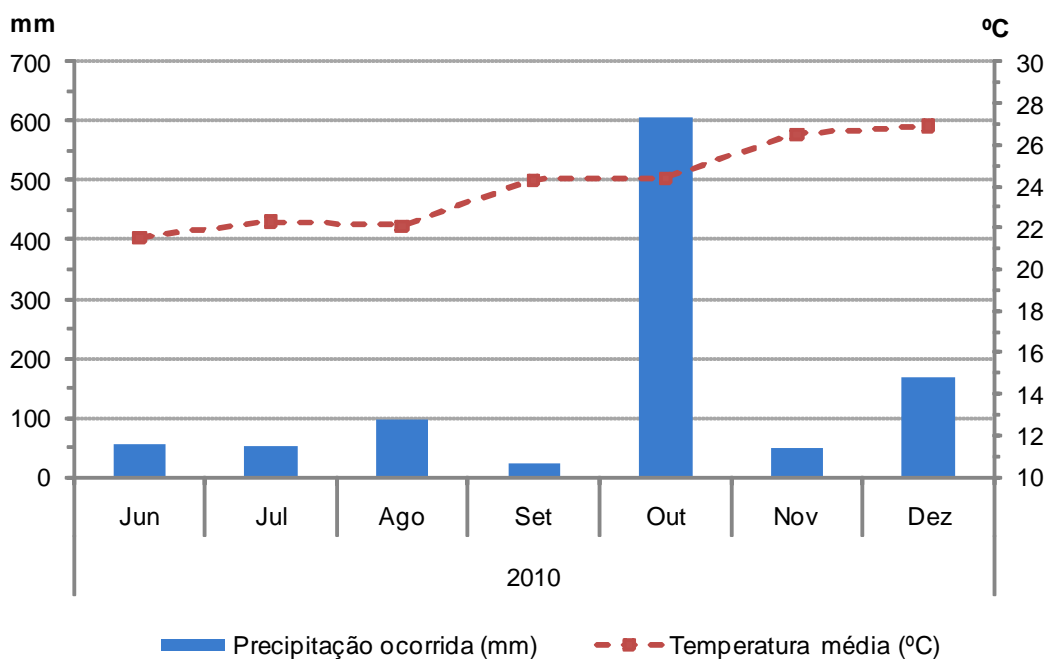


Figura 14- Dados climáticos de Vitória, precipitação mensal ocorrida e temperatura média mensal de junho a dezembro de 2009.

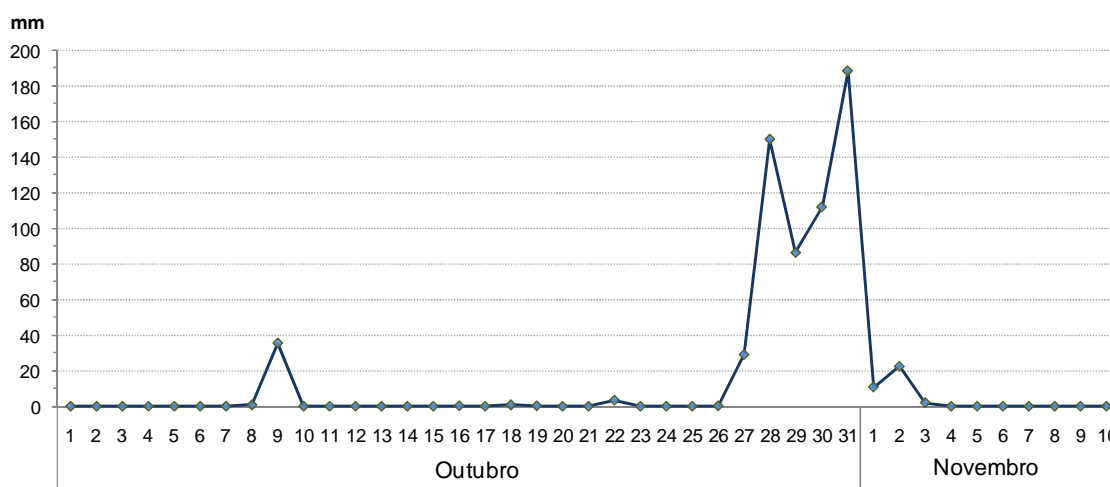


Figura 15- Precipitação diária ocorrida durante o mês de outubro e início de novembro de 2009, na cidade de Vitória, ES.

A área estudada da lagoa Jacuném apresentou na primeira amostragem (13/10/09) valores de DBO_5 (20 mg.L^{-1}) e fósforo total ($0,31 \text{ mg.L}^{-1}$) acima dos padrões para água doce classe II, segundo a resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005), e teores elevados de clorofila-a ($84,2$ e $65,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) em ambas as coletas (Tabela 9). Foram observados menores teores de clorofila-a, turbidez, nitrogênio total e amoniacal, DBO_5 , DQO e fósforo total e dissolvido na segunda amostragem, isso pode ser justificado pela chuva que ocorreu no intervalo entre as coletas (Figura 14 e 15).

Os valores médios de clorofila-a e fósforo total foram utilizados para calcular o índice de estado trófico, a lagoa Jacuném foi classificada como supereutrófica, com IET = 66 (Tabela 10). Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Silva e Mendonça (1997), que observaram o processo de eutrofização indicado pelas altas concentrações de fósforo total e de clorofila-a no corpo d'água em questão

Os valores médios das coletas encontrados para fósforo total, nitrogênio total e de clorofila-a na estação amostral da Lagoa Jacuném foram, respectivamente, $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$, $1,75 \text{ mg.L}^{-1}$, e $74,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 9), sendo valores próximos aos citados por Silva (1998), que observou teores médios de fósforo total, nitrogênio total e clorofila-a iguais a $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$, $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ em estudo de vários pontos do mesmo manancial.

As amostras da lagoa Jacuném (Serra/ES) apresentaram microcistina-LR com concentração igual a $4,78$ e $0,41 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, na primeira e segunda coleta (Tabela 8). Logo, foi observada a redução nos valores de microcistina-LR. Ainda não é claro qual o papel de fatores ambientais no controle da produção das cianotoxinas, sendo que florações em um mesmo corpo d'água podem variar na toxicidade em um curto espaço de tempo, ou até mesmo deixar de ser tóxica. Isso pode ser consequência de uma alternância na composição de cepas tóxicas e não tóxicas (MOLICA e AZEVEDO, 2009).

Considerando os usos da Lagoa Jacuném, que são, principalmente, a pesca e recreação de contato primário, a presença de microcistina-LR ($4,78$ e $0,41 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) (Tabela 8) pode representar um risco à saúde da população. Portanto a estação amostral pode ser considerada imprópria para balneabilidade, segundo critérios da Resolução CONAMA nº 274/2000 (BRASIL, 2000). Têm sido descrito consequências adversas a saúde para nadadores expostos à proliferação de cianobactérias, mesmo

com pouco contato com cianobactérias durante a recreação aquática pode haver a irritação da pele e aumenta a probabilidade de sintomas gastrointestinais (PILOTTO et al., 1997).

Ainda, há o risco de exposição à toxina através da acumulação de microcistinas nos peixes; a bioacumulação é uma rota potencialmente importantes para os seres humanos (MAGALHÃES et al., 2001).

Os teores de microcistinas nos músculo de peixes podem atingir concentrações que, se comido em uma base regular, ultrapassem o limite da ingestão diária tolerável ($0,04 \mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, CHORUS e BARTRAM, 1999), o que representa um risco para os consumidores de peixe por pesca artesanal. Portanto, sugere-se que seja realizado o monitoramento de cianotoxinas na Lagoa Jacuném visando subsidiar ações de manejo e minimizar riscos a saúde humana.

As amostras de água captada no Reservatório de Duas Bocas apresentaram valores de pH, clorofila-a, cor real, turbidez, nitrogênio amoniacal, DBO_5 e fósforo total em concordância com o limite estabelecido na resolução CONAMA nº 357/2005 para água doce classe II (Tabela 9).

O Reservatório de Duas Bocas é utilizado como manancial de abastecimento público, detectou-se microcistina-LR em teores abaixo do limite de quantificação ($0,37\mu\text{g.mL}^{-1}$) nas amostragens de 20/10/09 e 24/11/10 (Tabela 8). O reservatório Duas Bocas apresenta características oligotróficas a mesotróficas, com predominância da Classe *Cyanophyceae* (BRASIL, 2007). Os registros de ocorrências de predominância de cianobactérias no manancial de Duas Bocas estão relacionados a presença de microcistina-LR neste reservatório.

Foi calculado o índice de estado trófico para as amostras da captação do reservatório de Duas Bocas e apresentou IET igual a 55, denotando classe mesotrófica (Tabela 10), resultado similar ao observado por Delazari-Barroso (2000) que utilizou, além dos teores de fósforo e clorofila-a, a transparência (disco de Secchi) para o cálculo do índice.

Delazari-Barroso (2000) estudando o Reservatório Duas Bocas, encontrou no ponto de captação, valores de nitrogênio total que variaram de 0,4 a 0,9 mg.L^{-1} no período seco e de 0,4 a 3,7 mg.L^{-1} no período chuvoso. Pesquisa realizada pela FUNASA (BRASIL, 2007) obteve, no mesmo ponto, valores menores, uma vez que variaram

de 0,12 a 1,17mg.L⁻¹ durante o estudo, sendo também considerados baixos, denotando características oligotróficas.

O Reservatório de Duas Bocas precisa ser constantemente monitorado para evitar os potenciais riscos adversos à saúde humana, visto que é utilizado para abastecimento da população e apresenta registros de ocorrência de predomínio de cianobactérias e presença de microcistina-LR.

A estação amostral da lagoa Juara, apresentou valores de pH, clorofila-a, turbidez, DBO₅, nitrogênio amoniacal e fósforo total abaixo do valor máximo permitido para água doce classe II (BRASIL, 2005) (Tabela 9). Porém apresentou valores elevados de cor real ou verdadeira (173,8 e 206,1 mg Pt.L⁻¹) (Tabela 9) ultrapassando o padrão estabelecido pela resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005). A cor de uma amostra de água pode está associada à presença de sólidos dissolvidos, como colóides orgânicos provenientes de decomposição de vegetais, esgotos sanitários, além de diversos efluentes industriais contendo taninos, anilinas, lignina e celulose (CETESB, 2010).

A Lagoa Juara apresenta cultivo de tilápias para comercialização, o cultivo de peixes em mananciais é uma alternativa de baixo custo para aumentar a renda e a disponibilidade de peixe para a população local, porém tem como consequência a tendência de eutrofização e formação de florações de cianobactérias. Nesse ambiente não foi detectada a presença de microcistina-LR (Tabela 8) e observou-se baixos valores de clorofila-a (7,9 e 7,8 µg.L⁻¹), que indicam baixa densidade do fitoplâncton, condições que são favoráveis à atividade de piscicultura no local, pois as espécies de tilápia, em geral, são largamente planctívoras, e não podem evitar o consumo de cianobactérias, quando presentes (BENNETT e THORPE, 2003), sendo potenciais acumuladores de cianotoxinas.

Chellappa e colaboradores (2008) avaliaram um reservatório no nordeste brasileiro com diversos usos, captação de água para consumo humano e irrigação, pesca e cultivo de peixes em tanques-redes, e observaram níveis de microcistina de 0,07 a 8,73 µg.L⁻¹ no seston do reservatório e de 0,01 a 2,59 µg.g⁻¹ em amostras de fígado de peixes durante o período de floração algal, portanto apresentando risco a saúde do consumidor de peixes provenientes do reservatório.

A área de localização dos tanques redes na lagoa Juara, estação amostral, apresentou características oligotróficas (IET = 50, Tabela 10), devido aos baixos teores de fósforo total e clorofila-*a* no período estudado.

A lagoa de facultativa de ETE avaliada não apresentou microcistina-LR na primeira amostragem, e na segunda não foi possível avaliar a toxina. A lagoa facultativa foi classificada como hipereutrófica, com IET igual a 77 (Tabela 10).

O efluente da lagoa de polimento da ETE apresentou-se de acordo com as condições de lançamento dispostas nas Resoluções CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), e nº 397, de 3 de abril de 2008 (BRASIL, 2008), com temperatura inferior a 40°C e pH entre 5 e 9 (Tabela 9). O efluente apresentou elevado teor de clorofila-*a* (100,4 e 585,8 µg.L⁻¹), fato que pode estar relacionado aos elevados teores de fósforo total (2,867 e 1,38 mg.L⁻¹) e nitrogênio total (14,0 e 27,7 mg.L⁻¹), além de pH neutro-alcálico (7,6) (Tabela 9).

As lagoas terciárias possuem a comunidade fitoplanctônica frequentemente dominada por cianobactérias devido à alta disponibilidade de nutrientes, alta temperatura e intensidade luminosa (VASCONCELOS e PEREIRA, 2000). Em duas lagoas (facultativa e de maturação) do ETE de Esmoriz (Portugal) foi observada a dominância de cianobactérias no fitoplâncton, porém foi detectada a presença de microcistinas apenas na lagoa de maturação, em concentrações variando de 1,7 a 56 µg.L⁻¹ de equivalente de microcistina-LR (VASCONCELOS e PEREIRA, 2000). Esses valores indicam que a ETE de Esmoriz pode ser fonte de contaminação de cianotoxinas para os corpos d'água receptores.

Cruz e colaboradores (2003) simularam as condições de lagoas de estabilização (anaeróbia e facultativas) de ETE's em reatores e não detectaram microcistinas na água do efluente mas detectaram a presença da toxina no material retido nos fitos, indicando que essas toxinas estão armazenadas no interior das células das microalgas.

As Lagoas de Estabilização Facultativas podem proporcionar, dependendo das condições operacionais a que estão submetidas, condições suscetíveis ao crescimento exagerado das cianobactérias, algas potencialmente produtoras de toxinas (CRUZ et al., 2003), portanto deve ser realizado o monitoramento para

verificar se o efluente atua como fonte de contaminação de cianotoxinas para o corpo receptor.

Ambientes eutróficos, ou seja, rico em nutrientes favorecem a proliferação e predominância de espécies de cianobactérias, que são potencialmente produtoras de toxinas (WATANABE et al., 1985; CALIJURI et al., 2006). Graham e colaboradores (2004) demonstraram que, nos lagos avaliados nos EUA, a concentração de microcistina estava relacionada às características físico-químicas do ambiente, o aumento da concentração de microcistina acompanhava o gradiente crescente do estado trófico dos lagos.

Tabela 9- Classificação do estado trófico para as estações amostrais dos mananciais avaliados.

Manancial	IET (Cl-a)	IET (PT)	IET	Estado Trófico
Lagoa do Parque Pedra da Cebola	76	77	77	Hipereutrófico
Lagoa Jacuném	68	65	66	Supereutrófico
Reservatório de Duas Bocas	62	49	55	Mesotrófico
Lagoa Juara	57	44	50	Oligotrófico
Lagoa Facultativa de ETE	74	81	77	Hipereutrófico

IET (Cl-a) = Índice do Estado Trófico para a clorofila-a.

IET (PT) = Índice do Estado Trófico para o fósforo total

IET = média aritmética simples dos índices relativos ao fósforo total e a clorofila-a.

Ressalta-se a importância de ações preventivas ao processo de eutrofização de mananciais pela ação antrópica, visto que há potencial para a produção de cianotoxinas e o estágio final de eutrofização artificial é praticamente irreversível (ESTEVES, 1998). Assim, pode-se contribuir para a preservação da qualidade das águas e seus múltiplos usos.

6 CONCLUSÕES

O método de cromatografia líquida (HPLC-PDA) apresentou linearidade, recuperação, precisão e limites de detecção e quantificação adequados para a avaliação de microcistina-LR.

Utilizando o método proposto foi observada a ocorrência de microcistina-LR em diversas amostras de água bruta de mananciais superficiais da Região da Grande Vitória.

Alguns mananciais da Região da Grande Vitória apresentam-se eutrofizados ou em processo de eutrofização, condição que pode favorecer o desenvolvimento de cianobactérias e a potencial produção e liberação de cianotoxinas no ambiente.

7 RECOMENDAÇÕES

Sugere-se utilizar métodos adicionais para o processo de extração e purificação de microcistina-LR de amostras de efluentes de estação de tratamento de esgotos.

Considerando os usos da Lagoa Jacuném e Juara e do Reservatório de Duas Bocas, respectivamente, recreação, piscicultura e abastecimento humano, os mananciais devem ser monitorados quanto à presença de cianobactérias (análise do fitoplâncton) e microcistinas visando subsidiar ações de manejo e adequação dos usos destes corpos d'água.

Recomenda-se avaliar a presença de microcistinas em músculos de peixes da lagoa Jacuném com a finalidade de averiguar se o consumo de pescado oferece risco à saúde da população.

8 REFERÊNCIAS

ABOAL, M.; PUIG, M. (2005). Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. **Toxicon**, v. 45, p. 509–518.

ADWG – Australian Drinking Water Guidelines, (1996). **National Health and Medical Research Council and the Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand**, 376 p.

AGUJARO, L. F. (2007). **Subsídios para um plano de monitoramento de cianobactérias em reservatórios com vistas à balneabilidade. Estudo de caso: reservatório Salto Grande, Americana, SP**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

AKIN-ORIOLO, G.A.; LAWTON, L.A. (2005). Detection and quantification of toxins in cultures of *Microcystis aeruginosa* (PCC 7820) by HPLC and protein phosphatase inhibition assay effect of blending various collectors at bulk. **AJST**, v. 6, n. 1, p. 1-10.

ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., (2007). Use of solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [D-Leu1]MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**. V. 52, n. 1.

ALMEIDA, V. P.S.; COGO, K.; TSAI, S. M.; MOON, D. H. (2006). Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 37, p. 192-198.

ANDRADE, F. M. (2009). **Determinação de cianotoxinas em amostras de florações de cianobactérias coletadas em pesque-pagues e pisciculturas situadas na região do Alto Mogi**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

ANJOS, F. M. et al. (2006). Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, v. 48, p. 239–245.

APHA (1995). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.

AZEVEDO, S.M.F.O. et al. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru Brazil. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181-182, p. 441-446.

AZEVEDO, S.M.F.O. et al. 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.6, n.3, p.261-265.

BABICA, P., et al. (2006). Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, p. 1545–1551.

BAKER, J.A.; ENTSCH, B.; NEILAN, B.A.; MCKAY, D.B. (2002). Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6070-6076.

BENNETT, E.; THORPE, A. (2003). Review of River Fisheries Valuation in Central and South America. **Water, Ecosystems and Fisheries Review Workshop**, World Fish Center, Phnom Penh, 50p.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. (2003). Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with *mycB*, molecular marker. **Harmful Algae**, v.2, p.51- 60.

BOUVY, M. et al. (1999). Dynamic of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, v.20, n.3, p.285-297.

BRASIL (2000). Resolução CONAMA nº 274, 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL (2003a). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL (2003b). INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008, orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. 36p.

BRASIL (2004). Portaria No 518, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p.70.

BRASIL (2005). Resolução CONAMA nº 357, 17 de março de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 março de 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRASIL (2006). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília : Ministério da Saúde, 212 p.

BRASIL (2007). FUNASA - Fundação Nacional de Saúde (2007). **Potencial de Florações de Cianobactérias em Um Reservatório de Abastecimento Doméstico no Estado do Espírito Santo (Reservatório Duas Bocas – Cariacica – ES)**. Brasília: Funasa, 82 p.

BRASIL (2008). Resolução CONAMA nº 397, de 3 de abril de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; DOS SANTOS, A. C. A. (2006). **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos, SP: RiMa.

CARMICHAEL, W. W. (1996). Toxic microcystis and the environment. *In*: WATANABE, M. F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. **Toxic microcystis**. Florida: CRC Press, 261p.

CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **Journal of applied Bacteriology**, v.72, n.6, p.445-459.

CARMICHAEL, W.W. (1988). **Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins**. In: OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. (Ed.). *Nature toxins: characterization, pharmacology and therapeutics*. London: Pergamon Press. p.3-16.

CARMICHAEL, W.W.; FALCONER, I.A. (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: FALCONER, I.R. (Ed.). **Algal toxins in seafood and drinking water**. Cambridge: Academic Press. p.187-209.

CARVALHO, L. R.; SANT'ANNA, C. L.; GEMELGO, M. C.P.; AZEVEDO, M. T. P. (2007). Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.1, p.141-148.

CESAN - COMPANHIA ESPÍRITO SANTENSE DE SANEAMENTO (2009). **Sistema de Esgotamento Sanitário de Camburi**. Disponível em: <<http://www.cesan.com.br/page.php?23>>. Acesso em: 09 de dezembro de 2009.

CETESB - COMPANHIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (2010). **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 08 dezembro de 2009.

CEUNES (2010). **Monitoramento agrometeorológico**, Centro Universitário São Mateus – CEUNES. Disponível em: <<http://www.ceunes.ufes.br/estacao/>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2010.

CHELLAPPA, N. T.; CHELLAPPA, S. L.; CHELLAPPA, S. (2008). Harmful Phytoplankton Blooms and Fish Mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. **Braz. arch. biol. technol.**, v.51, n.4, p.833-841.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.) (1999). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon. p.369-405.

COLLINS, C. H. (2006). **Fundamentos da cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp.

CRUZ, L.F. et al. (2003). Cianobactérias e cianotoxinas em lagoas de estabilização facultativas. In: Seminário Estadual sobre Saneamento e Meio Ambiente, n. 5, Vitória. **Anais...** Vitória: SESMA, v.1, p.1-9.

DAI, R. et al. (2008). Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 470–477.

DEBLÓIS, C. P.; ARANDA-RODRIGUEZ, R.; GIANI, A.; BIRD, D. F. (2008). Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. **Toxicon**, n. 51, p. 435–448.

- DELAZARI-BARROSO, A. (2000). **Comunidade fitoplanctônica do reservatório Duas Bocas (Reserva Biológica de Duas Bocas) – ES: variação vertical e temporal em duas épocas distintas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- DITTMANN, E., BÖRNER, T. (2005). Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment - lessons from biosynthesis genes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.203, p. 192-200.
- DOKULIL, M.T.; TEUBNER, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiologia**, v. 438, p.1-12.
- EDWARDS, C. et al. (1996). Laboratory-scale purification of microcystins using flash chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 734, p. 163-173.
- ESTEVES, F. (1998). **Fundamentos de limnologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência; FINEP, 602 p.
- FALCONER, I.R. et al. (1994). Toxicity of the blue-green algae (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environ. Toxicol. Water Qual. Inter.**, v. 9, p. 131-139.
- FAWELL, J.K.; JAMES, C.P.; JAMES, H.A. (1994). Toxins from Blue-Green Algae Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for its Determination in Water. **Water Research Center**, p. 1-46.
- FIORE, M. F. et al. (2005). Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**, v.39, n.20, p.5017-5026.
- FUJIKI, H.; SUEOKA, E.; SUGANUMA, M. (1996). Carcinogenesis of microcystins. In: M.F. Watanabe, K. Harada, W.W. Carmichael&H.Fujiki. **Toxic Microcystis**, p. 203-232.
- GÉRARD, C. et al. (2009) Influence of toxic cyanobacteria on community structure and microcystin accumulation of freshwater mollusks. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 609–617.
- GÉRARD, C., BRIENT, L., LE ROUZIC, B., (2005). Variation in the response of juvenile and adult gastropods (*Lymnaea stagnalis*) to cyanobacterial toxin (microcystin-LR). **Environmental Toxicology**, v. 20, 592–596.
- GRAHAM, J. L. et al. (2004). Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. **Water Research**, v. 38, p. 4395–4404.
- GURBUZ, F. et al. (2009) Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4038–4046.

GURBUZ, F. et al. (2009). Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4038–4046.

HERNÁNDEZ, J. M.; LÓPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. (2009). Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: A risk intensified by global change. **Medical Hypotheses**, v. 72, p. 539–540.

HO, L. et al. (2007). Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. **Toxicon**, v. 50, p. 438–441.

HOWARD, A.; EASTHOPE, M.P. (2002). Application of a model to predict cyanobacterial growth patterns in response to climatic change at Farmoor Reservoir, **Oxfordshire**, v. 282-283, p. 459-469.

HUSZAR, V. L. M. et al.(2000). Cyanoprokaryota assemblages in the eighth productive tropical Brazilian waters. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.424, n.1-3, p.67-77.

HYENSTRAND, P.; BLOMQUIST, P.; PETTERSSON, A. (1998). Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems – a literature review. **Arch. Hydrobiol. Spee. Issues Advanc. Limnol.**, v.51, p.41-62.

IDAF - Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (2009). **Reserva Biológica Duas Bocas**. Disponível em: <<http://www.idaf.es.gov.br/Pages/wfReservaDuasBocas.aspx>>. Acesso em: 08 dezembro de 2009.

INCAPER (2010). **Boletim agroclimático de Vitória**, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER. Disponível em: <<http://hidrometeorologia.incaper.es.gov.br/>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2010.

JARDIM, F. A. et al. (2000). A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água - Minas Gerais - Brasil. **XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 11 p.

JOCHIMSEN, E. M. et al., (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.338, n.13, p.873-878.

KAYA, K. (1996). Toxicology of microcystins. *In*: WATANABE, M. F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. **Toxic microcystis**. Florida: CRC Press, 261p.

KOTAK, B.G. et al. (1995). Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. **Journal of Phycology**, v.31, n.1, p.148-163.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J. (1999) Chapter 4: Human Health Aspects. *In*: Chorus e Bartram,

- KURODA, E. K. et al. (2006) Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Eng. sanit. ambient.** v.12, n.1, p. 24-31.
- LAGOS, N. et al. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Oxford, v.37, n.10, p.1359-1373.
- LAMPARELLI, M. C. (2004). Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. *Apud: Variáveis de qualidade das águas*. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 08 dezembro de 2009.
- LANÇAS, F. M. (2004a). **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos, SP: RiMa.
- LANÇAS, F. M.. (2004b). **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos, SP: RiMa, 2004. 46 p.
- LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. (1994) Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. **Analyst**, v. 119, p. 1525-1530.
- LEITE, F. (2008). **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas, SP: Átomo, 357 p.
- LORENZEN, C. J. (1967). Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.**, v.12, p.343-346.
- LORENZI, A.S. (2004). **Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil**. 2004. f. 92. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- MAATOUK, I. et al. (2002). Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant. **Water Research**, v. 36, p. 2891–2897.
- MAGALHÃES, V. F. et al. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicon**, v.42, n.3, p.289-295.
- MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 1077-85.
- MAGALHÃES, V. F. et al. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 289-295.

MATTHIENSEN, A. et al. (2000). [D-Leu1] microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon Estuary, Brazil. **Phytochemistry**, v.55, n.5, p.383-387.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J.S.; CODD, G.A. (1999). Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 361-376.

MESSINEO, V. et al. (2009). Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. **Limnologica**, v. 39, p. 95–106.

MINILLO, A.; FERREIRA, A.H.F.; YUNES, J.S. (2000). Detecção de microcistinas em florações de *Microcystis aeruginosa* na Lagoa dos Patos, entre 1997 e 1998. **Atlântica**, v.22, p.81-93.

MOHAMED, Z. A. (2001). Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, n. 1, p. 4-8.

MOHAMED, Z. A. (2008). Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia. **Toxicon**, m. 51, p. 17–27.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. (2009). Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis: Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de cianobactérias**. Rio de Janeiro UFRJ : Erli Schneider Costa, v. 13, n. 2.

NICHOLSOM, B. C.; BURCH, M. D. (2001). **Evaluation of analytical methods for detection e quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. Cooperative Research**. Australia: Commonwealth of Australia.

NISHIZAWA, T. et al (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v126, p.520-529.

OLIVEIRA, A. C. P.; MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. (2005). Influence of Drinking Water Composition on Quantitation and Biological Activity of Dissolved Microcystin (Cyanotoxin). **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 2, p. 126-130.

OUAHID, Y.; PEREZ-SILVA, G.; del CAMPO, F.F. (2005). Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. **Environmental Toxicology**, v.20, p. 235-42.

OUADRA, B. et al. (2001). Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake±reservoir (Morocco). **Toxicon**, v. 39, p. 1375±1381.

OUADRA, B. et al. (2002). Detection and variation of microcystin contents of *Microcystis* blooms in eutrophic Lalla Takerkoust Lake, Morocco. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v. 7, p. 35–44.

PASSAMANI, F. R. F. (2001). **Remoção de Coliformes Fecais e Ovos de Helminthos em Uma ETE do Tipo UASB + Biofiltro Aerado Submerso Tratando Esgoto Sanitário e em Lodo Anaeróbio Submetido a Higienização por Caleagem e por Pasteurização.** Tese (Mestrado) - Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

PILOTTO, L.S., et al. (1997). **Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities.** Aust. N. Zealand J. Public Health, n. 21, p. 562-566.

PMS - Prefeitura Municipal da Serra (2009). **Recursos Naturais: Bacias Hidrográficas.** Disponível em: <<http://app.serra.es.gov.br/semma/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2009.

PMV - Prefeitura Municipal de Vitória (2009). **Parque Pedra da Cebola.** Disponível em: <http://www.vitoria.es.gov.br/secretarias/turismo/turismo/roteiros_parques.asp>. Acesso em: 08 de dezembro 2009.

POURIA, S. et al. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, London, v.352, n.9121, p.21-26.

PROMMANAA, R.; et al. (2006). Microcystins in Cyanobacterial Blooms from Two Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Ponds in Northern Thailand. **ScienceAsia**, v. 32.

RAPALA, J. et al (2002). Detection of micricystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay - Comparison of methods. **Analytica Chimica**, v. 466, p. 213-231.

RIBANI, M. et al. (2004). **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quím. Nova [online]. vol.27, n.5, pp. 771-780. ISSN 0100-4042.

RIVASSEAU, C.; HENNION, M.-C. (1999). Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins. **Anal. Chim. Acta**, 399: 75–87.

ROBILLOT, C.; HENNION, M. (2004). Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, p. 339–346.

SANCHES, S. M.; et al. (2007). Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 32, n., p. 43-48.

SANGOLKAR, L. N.; MASKE, S. S.; CHAKRABARTI, T. (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. **Water research**, v. 40, p. 3485 – 3496.

- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. (2000). Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v.71, n.3/4, p.359-385.
- SANTOS, A. P. M. E.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. (2008). Hepatotoxicidade associada à microcistina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 417-430.
- SILVA, C. S. P. (2006). Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais. (Dissertação de Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Universidade de São Paulo.
- SILVA, L. H. P. (1998). **Avaliação Qualitativa da Lagoa Jacuném, com Ênfase em Eutrofização**. 138 f. Tese (Mestrado) - Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- SILVA, L. H. P.; MENDONÇA, A. S. F., 1997. Avaliação qualitativa da Lagoa Jacuném com ênfase à eutrofização. **19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Foz do Iguaçu – PR. p.2052-2061.
- SIVONEN, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.56, n.9, p.2658-2666.
- SIVONEN, K.; JONES, G. (1999) **Cyanobacterial toxins**. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon. p.369-405.
- SIVONEN, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, v. 35 , p. 12–24.
- STREIT, L.P. et al. (2005). Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. *Apud: ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., (2007). Use of solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [D-Leu1]MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy. V. 52, n. 1.*
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, v.2, p.167.
- THOMPSON, M. et al. - IUPAC (1999). Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure & Appl. Chem.**, v. 71, n. 2, p. 337–348.
- TOWNSEND, S.A.; LUONG-VAN, J.T.; BOLAND, K.T. (1996). Retention time as a primary determination of colours and light attenuation in two tropical **Australian reservoirs**. **Freshwater Biology**, Oxford, v.36, n.1, p.57-69.
- VASCONCELOS, V. M.; PEREIRA, E. (2000). Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). **Wat. Res.**, v. 35, n. 5, p. 1354-1357

- VASCONCELOS, V.M. (1994). Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in portuguese freshwaters. **Archiv fur Hydrobiologie**, Stuttgart, v.130, p.439-452.
- VIEIRA, J. M. S. (2002). **Toxicidade de cianobactérias e concentração de microcistinas em uma represa de abastecimento público da região amazônica do Brasil**. 147p.Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- VIEIRA, J. M. S. et al. (2003). Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 42, p. 709–713.
- WATANABE, M. F.; OISHI, S. (1985). Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.1342-1344.
- WHO - World Health Organization, (1998). **Guidelines for drinking-water quality**. 2. ed. Health Criteria and other supporting information. Geneva: World Health Organization, p. 13-14. Addendum to v. 2.
- YOO, R.S. et al. (1995). **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide**. Denver: WWA Foundation and the American Water Works Association.
- YUNES, J.S. et al. (1998). Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, Southern Brazil. **Verh. Inter. Verein Limn.**, v.2, p.1796-1800.
- YUNES, J.S. et al. (1996). Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, Dordrecht, v.5, p.223-229.
- ZHANG, D. et al. (2009). Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2191–219.
- ZURAWELL, R. W. et al. (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. **Journal of Toxicology and Environmental Health - part B – critical reviews**, Philadelphia, v.8, p.1–37.