

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

Paulo Wagner Pereira Antunes

**OTIMIZAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS
EM AMOSTRAS DE ÁGUAS**

**VITÓRIA
ABRIL – 2013**

Paulo Wagner Pereira Antunes

**OTIMIZAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS
EM AMOSTRAS DE ÁGUAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini

**VITÓRIA
ABRIL – 2013**

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

A636o Antunes, Paulo Wagner Pereira, 1980--
Otimização e desenvolvimento de sistema de detecção de microcistinas em amostras de águas / Paulo Wagner Pereira Antunes. – 2013.
134 f. : il.

Orientador: Sérgio Tulio Alves Cassini.
Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Água - Qualidade. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Água - Análise. 4. Microcistina. I. Cassini, Sérgio Túlio Alves. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

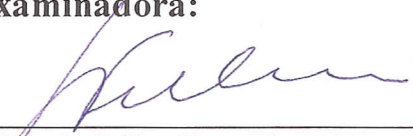


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

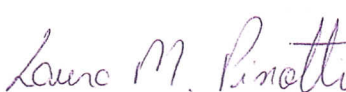
“Otimização e desenvolvimento de sistemas de detecção de microcistinas em amostras de águas”.

PAULO WAGNER PEREIRA ANTUNES

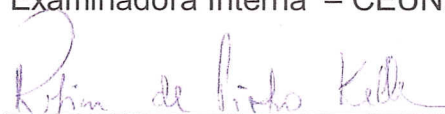
Banca Examinadora:



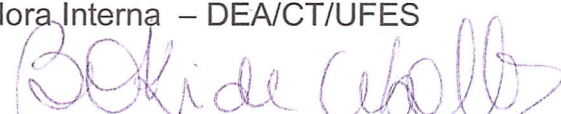
Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini
Orientador – DEA/CT/UFES



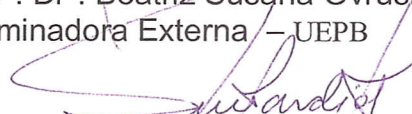
Prof^a. Dr^a. Laura Marina Pinotti
Examinadora Interna – CEUNES/UFES



Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller
Examinadora Interna – DEA/CT/UFES



Prof^a. Dr^a. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Examinadora Externa – UEPB



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Examinador Externo – UFSCAR

Coordenadora do PPGEA: Profa. Dra. Regina de Pinho Keller
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, ES, 22 de abril de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo Lopes Pereira e Neusa Antunes Pereira, por todo o amor, carinho e respeito, ao longo de toda a minha vida e, sobretudo pelos nobres valores que me foram ensinados e que são responsáveis por me guiar em todas as minhas atitudes.

Aos meus irmãos e grandes amigos Júlio César Pereira Antunes e Jorge Luís Pereira Antunes, por todo amor, respeito, companheirismo e pelas prazerosas discussões aos domingos.

À Erlane Batista, minha esposa, por todo o amor, carinho e compreensão. Por todos os momentos agradáveis ao seu lado, que me ajudaram em mais uma grande conquista. E por ter sido a principal responsável na realização de um grande sonho em minha vida: Ser pai.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela presença constante em todos os momentos;
- Aos meus pais e aos meus irmãos, pela saudade sentida nos momentos de ausência e pelo amor acima de tudo;
- À Erlane, por toda a atenção e companheirismo na divisão dos problemas e na busca de suas soluções;
- Ao meu orientador, Professor Sérgio Túlio Alves Cassini, pela orientação, apoio, paciência e, principalmente, pela amizade e confiança depositada em mim no decorrer de todo o nosso trabalho;
- À Professora Regina de Pinho Keller, por todo apoio, amizade e ensinamentos, principalmente durante os estágios de docência;
- Aos amigos e amigas, pela ajuda constante, por me acompanharem de perto, torcendo e sofrendo junto;
- A todos os meus familiares, que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista;
- À Universidade Federal do Espírito Santo, por possibilitar minha formação e realização desse trabalho;
- Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da UFES pela oportunidade;
- Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Ambiental/CT-UFES, pelos ensinamentos e por todo o auxílio prestado;

-
- Ao CNPq e FAPES, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento dos projetos;
 - Aos demais colegas e amigos, que estão ou que passaram pelo Laboratório de Saneamento - Labsan, pelo agradável ambiente de trabalho, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados;
 - A todos que, direta ou indiretamente, por meio de valorosas sugestões, ou um simples bom dia, colaboraram para a realização desse trabalho.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- AAA-Fort** – Amostra ambiental de água fortificada
- AAA-NFort** – Amostra ambiental de água não fortificada
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-FR** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
- CONAMA** – Conselho Nacional de Meio Ambiente
- CV** – Coeficiente de Variação
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- LC/ES** – Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa
- LC/UV** – Cromatografia líquida associada ao detector de ultravioleta
- LOD** – Limite de detecção
- LOQ** – Limite de quantificação
- Mcyst** – Microcistina
- Mcyst-LA** – Microcistina variante LA
- Mcyst-LR** – Microcistina variante LR
- Mcyst-RR** – Microcistina variante RR
- Mcyst-YR** – Microcistina variante YR
- MU** – Metil-umbeliferil
- MUP** – 4-metil-umbeliferil-fosfato
- pNPP** – *p*-nitro-fenil-fosfato
- PP1A** – *Protein Phosphatase type 1*
- PP2A** – *Protein Phosphatase type 2*
- SPE** – *Solid Phase Extraction*
- TCF** – Taxa de Confiabilidade
- TE** – Taxa de Especificidade
- TFN** – Taxa de Falso Negativo
- TFP** – Taxa de falso Positivo
- TS** – Taxa de Sensibilidade

RESUMO

O monitoramento realizado em amostras de águas superficiais da região metropolitana de Vitória, ES, demonstrou a presença de, pelo menos, uma variante de microcistina em 57% das amostras. Em 20% dessas amostras a concentração de microcistina foi superior a 1,0 µg/L, valor máximo permitido pela Legislação Brasileira, para águas de abastecimento público. Poucos laboratórios no estado do Espírito Santo apresentam infraestrutura para a análise de microcistinas e, além disso, os atuais métodos quantitativos são onerosos e demorados. Com o objetivo principal de desenvolver um sistema de detecção de microcistinas, neste estudo foi validado um método quantitativo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e desenvolvido um sistema qualitativo (P/A) para análise da cianotoxina. Na validação um método livre de acetonitrila demonstrou seletividade e linearidade para separar e quantificar diferentes variantes de microcistina (-RR, -YR, -LR e -LA). Níveis de recuperação entre 98,2 e a 106,1% demonstraram a precisão e os limites de detecção (entre 0,17 e 0,25 µg/L) e quantificação (entre 0,55 e 0,82 µg/L) atenderam aos limites nacionais e internacionais de potabilidade. O sistema qualitativo (P/A) desenvolvido mostrou-se de fácil execução, baixo custo e alta sensibilidade, permitindo a determinação visual direta da presença de microcistinas em concentrações acima de 0,80 µg/L, sem a necessidade de nenhum método de processamento, concentração ou limpeza da amostra. Comparado com métodos de tradicionais de detecção de microcistinas, ELISA e CLAE (HPLC), o sistema demonstrou taxas de confiabilidade de 82,4% e 88,2%.

Palavras chaves: Microcistina, método qualitativo, CLAE, validação e monitoramento.

ABSTRACT

The monitoring program performed with surface water samples of the metropolitan region of Vitória, ES, showed the presence of one variant of microcystin in 57% of samples. With 20% of these samples the concentration of microcystin was greater than 1.0 µg / L, the maximum concentration allowed by Brazilian legislation for public water supply. Few laboratories in the state of Espírito Santo have appropriate infrastructure for the analysis of microcystins and furthermore, the current quantitative methods are costly and time consuming. With the main objective to develop a system for microcystin detection, in this study a quantitative method was validated by high performance liquid chromatography (HPLC) and established a qualitative system (P / A) for analysis of microcystins. The validated method free of acetonitrile showed linearity and selectivity to separate and quantify different microcystin variants (-RR,-YR,-LR and-LA). Recovery levels between 98.2 and 106.1% have demonstrated the precision and detection limits (from 0.17 to 0.25 g / L) and quantification (between 0.55 and 0.82 g / L) met the national and international standard limits for drinking water. The qualitative system (P / A) was proven to be easy to use, low cost and high sensitivity, allowing direct visual determination of the presence of microcystin in concentrations above 0.80 mg / L, without the need for any processing method , cleaning or concentration of the sample. Compared with traditional microcystin detection methods such as ELISA and HPLC it was shown the system reliability rates of 82.4% and 88.2%.

Keywords: Microcystin detection methods, water quality and monitoring program.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
SUMÁRIO	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. EUTROFIZAÇÃO E FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉIRAS	8
3.2. CIANOTOXINAS E TOXICIDADE	11
3.3. LEGISLAÇÃO: PADRÕES E LIMITES NACIONAIS PARA CIANOTOXINAS	15
3.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CIANOTOXINAS	18
3.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	25
3.5.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	25
3.5.2. MÉTODOS QUALITATIVOS	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ARTIGO I	49
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO LIVRE DE ACETONITRILA PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	50
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÕES	66
5. AGRADECIMENTO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ARTIGO II	72
VARIANTES DE MICROCISTINAS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE VITÓRIA-ES, BRASIL	73
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	80
4. CONCLUSÕES	87

5. AGRADECIMENTOS	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ARTIGO III	94
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DETECÇÃO DE MICROCISTINA COMO FERRAMENTA AUXILIAR PARA OS PROGRAMAS DE MONITORAMENTO DE QUALIDADE DE ÁGUAS	95
RESUMO	95
ABSTRACT	96
1. INTRODUÇÃO	97
2. MATERIAIS E MÉTODOS	99
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	105
4. CONCLUSÕES	120
5. AGRADECIMENTOS	121
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
DISCUSSÃO FINAL	124
CONCLUSÃO FINAL	129
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA FINAL	131

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Parâmetros de linearidade da curva analítica ($y = \alpha x + \beta$) obtida para as variantes de microcistina.	61
Tabela I.2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) na determinação das variantes de Mcyst-RR, Mcyst-YR, Mcyst-LR e Mcyst-LA, empregando CLAE-FR/PDA.	64
Tabela I.3. Valores de recuperação, média e coeficiente de variação (CV) para diferentes amostras de água fortificadas com microcistina-LR na concentração final de 1,0 µg/L.	64
Tabela I.4. Valores de recuperação, tempo de retenção, média e coeficiente de variação (CV) para amostras de água do Rio Jucu fortificadas com diferentes concentrações de microcistina-LR (0,8; 1,0 e 2,0 µg/L).	66
Tabela III.1 – Parâmetros cinéticos da PP1A imobilizada na ausência e na presença de 0.4 µg/L de Mcyst-LR.	110
Tabela III.2 – Parâmetros da curva derivada da regressão logística sigmoide para inibição da enzima PP1A livre e imobilizada por diferentes concentrações de Mcyst-LR.	112
Tabela III.3 – Parâmetros de desempenho qualitativa do método de detecção de microcistinas com o sistema imobilizado, comparados com os métodos tradicionais: PP1A livre, ELISA e CLAE. Taxa de confiabilidade (TCF), taxa de falso positivo (TFP), taxa de falso negativo (TFN), taxa de sensibilidade (TS) e taxa de especificidade (TE).	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura química das microcistinas. Fonte: Adaptada de Merel <i>et al.</i> (2010).	15
Figura I.1 Estrutura geral de microcistinas e as principais variantes detectadas em florações tóxicas. [X] e [Z] representa resíduos de L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das diferentes variantes de microcistinas.	53
Figura I.2 Perfil cromatográfico da amostra padrão contendo as variantes Mcyst-RR (22,3 min), Mcyst-YR (24,3 min), Mcyst-LR (25,7 min) e Mcyst-LA (29,7 min), na concentração final de 1,0 µg/mL. As soluções de H ₂ O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) e MeOH 100% foram utilizadas como fase móvel A e B, respectivamente. A taxa de fluxo foi de 0,250 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 238 nm.	58
Figura I.3 Sobreposição dos perfis cromatográficos referentes ao padrão de Mcyst-LR em solução de H ₂ O:MeOH (80:20 v/v), amostra ambiental de água não fortificada (AAA-NFort) e fortificada (AAA-Fort) com o padrão de Mcyst-LR. As soluções de H ₂ O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) e MeOH 100% foram utilizadas como fase móvel A e B, respectivamente. A taxa de fluxo foi de 0,250 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 238 nm.	60
Figura I.4 Perfis cromatográficos referentes ao padrão de Mcyst-RR, Mcyst-YR, Mcyst-LR e Mcyst-LA em solução de H ₂ O:MeOH (80:20 v/v), na concentração de 1,0 µg/mL. (A) Análises realizadas com diferentes temperaturas de acondicionamento da coluna (31, 34 e 37°C). (B) Análises realizadas diferentes concentrações de ácido trifluoracético adicionado à fase móvel aquosa (0; 0,01; 0,05 e 0,10% v/v).	62
Figura II.1 – Valores médios dos parâmetros de qualidade de água avaliados durante o período de junho de 2011 a maio de 2012. (–) Reservatório de Duas Bocas, (—) Rio Jucu, (....) Rio Santa Maria, (–.) Lagoa Juara e (....) Lagoa Jacuném.	81
Figura II.2 – Teor de Mcyst total detectada e quantificada nas amostras ambientais de água, entre junho de 2011 e maio de 2012, por CLAE-PDA. VMP - valor máximo de microcistina permitido em amostras de água para abastecimento público (1,0 µg/L). LD - limite de detecção do método utilizado (0,24 µg/L) e LQ - limite de quantificação do método	84

utilizado (0,81 µg/L).

Figura II.3 – Distribuição relativa das variantes de Mcyst -RR, -YR, -LR e -LA nas amostras ambientais, considerando todas as amostras positivas e sua distribuição em cada uma das estações amostrais: Reservatório Duas Bocas, lagoas Juara e Jacuném e Rios Jucu e Santa Maria.	86
Figura III.1 – Fluxograma da imobilização da enzima PP1A em membranas de fibra de vidro.	100
Figura III.2 – (a) Foto das reações com diferentes quantidades de PP1A imobilizadas, após 30 min de reação. (b) Gráfico da atividade da enzima PP1A imobilizada em função do tempo de reação. Foram avaliadas a atividade de 25, 50, 75 e 125 ng de PP1A imobilizada.	106
Figura III.3 – (a) Gráfico da atividade da enzima PP1A imobilizada em função do substrato 4-Metil-umbeliferil-fosfato (MUP), na ausência e na presença de 0,4 µg/L de Mcyst-LR (A). Foto das reações com diferentes quantidades de MUP, na ausência (b) e na presença de Mcyst-LR (c).	108
Figura III.4 – Foto das reações com a enzima PP1A livre (a) e imobilizada (b), na presença de Mcyst-LR nas concentrações entre 0,02 e 5,0 µg/L. (c) Gráfico de regressão logística sigmoide de inibição da enzima PP1A.	111
Figura III.5 - Atividade do sistema imobilizado de detecção aplicado em amostra de água da lagoa Juara “ <i>in natura</i> ” não fortificada (SFNFort) e fortificada com 1,0 µg/L (SFFort) de Mcyst-LR e processada por filtração direta não fortificada (FNFort) e fortificada com 1,0 µg/L de Mcyst-LR (FFort). Cont (-): ausência de reação enzimática/presença de Mcyst-LR. Cont (+): reação enzimática positiva/ausência de Mcyst-LR.	113
Figura III.6 - Atividade do sistema imobilizado de detecção aplicado em amostras de águas de diferentes origens (ultrapura, filtrada, Duas Bocas, Juara e Jacuném) não fortificadas e fortificadas com 0,5 e 1,0 µg/L de Mcyst-LR.	114
Figura III.7 - Sistema simplificado de PP1A imobilizada para detecção de presença (+) / ausência (-) de microcistinas em amostras ambientais de água, coletadas em outubro de 2011, comparado com métodos tradicionais de separação e quantificação de cianotoxinas: PP1A livre, ELISA e CLAE.	116

Figura III.8 - Sistema simplificado de PP1A imobilizada para detecção de117
presença (+) / ausência (-) de microcistinas em amostras ambientais de
água, coletadas em fevereiro de 2012, comparado com métodos
tradicionais de separação e quantificação de cianotoxinas: PP1A livre,
ELISA e CLAE

1. INTRODUÇÃO

A eutrofização de ambientes aquáticos acelerada pelas atividades antropogênicas causa uma série de impactos negativos na qualidade da água e tem sido a causa mais comum da dominância de cianobactérias em recursos hídricos naturais (Silveira, 2004; Camargo e Alonso, 2006; Magalhães *et al.*, 2006; Carneiro e Leite, 2007; Conley *et al.*, 2009). Esta dominância está associada a elevada diversidade metabólica apresentada pelas cianobactérias que favorece o crescimento exuberante de algumas espécies, nos chamados “*Blooms*” ou Florações de cianobactérias. Esta diversidade também é responsável pela alta resistividade às variações ambientais, fazendo com que estes microrganismos sejam encontrados nos mais diferentes habitats aquáticos: oceanos, estuários, mangues e, principalmente, em ambientes aquáticos continentais: rios, lagos e reservatórios, tanto em regiões com temperaturas acima de 50° C, quanto em regiões polares (Whitton, 1999; Hyenstrand *et al.*, 1998; Hyenstrand, 1999; Dokulil e Teubner, 2000; Beck *et al.*, 2012).

As florações causam grande impacto negativo nos corpos d’água alterando as características visuais e de qualidade tais como odor e sabor. Porém o principal impacto está relacionado com a presença de toxinas específicas produzidas por certas espécies e linhagens de cianobactérias. (Tóth e Padisák, 1986; Peaerl, 1987; Townsend *et al.*, 1996; Esteves 1998; Bouvy 1999; Codd *et al.*, 2005). Denominadas de cianotoxinas, podem ser produzidas em todos os estágios do crescimento da célula, sendo liberadas somente quando ocorre o rompimento desta célula (Sivonen e Jones, 1999). No meio aquoso, as cianotoxinas podem persistir por dias ou várias semanas (Kotak *et al.*, 1995; Harada e Tsuji, 1998; Chorus e Bartram, 1999, Zurawell *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011).

As principais cianotoxinas são classificadas em Hepatotoxinas e Neurotoxinas. As hepatotoxinas foram primeiramente isoladas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e suas toxinas foram, então, denominadas de microcistinas (Harada e Tsuji, 1998). No entanto, a produção destes peptídeos não se restringe exclusivamente a esta espécie, visto que outras cepas tóxicas já foram citadas como produtoras de microcistinas (Domingos *et al.*, 1998; Chorus e Bartram, 1999; Brittain *et al.*, 2000). Desta forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso de microcistinas como padrão para os estudos de cianobactérias (Chorus e Bartram, 1999). Os valores foram estabelecidos devido à preocupação com os efeitos toxicológicos crônicos das microcistinas, que podem atuar como promotoras de tumores de fígado (Watanabe *et al.*, 1996; Nobre *et al.*, 1999; Dias *et al.*, 2009). No Brasil, a Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, e a resolução CONAMA 430/2011 estabelecem a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias e de microcistinas, sendo a concentração de 1,0 µg/L, o valor máxima permitido de microcistinas em águas destinadas ao abastecimento público.

As principais metodologias de detecção e quantificação de microcistinas em amostras de água dividem-se em físico-químicas (CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), bioquímicas (ensaio de inibição da fosfatase, ELISA, biologia molecular) ou biológicas (bioensaios, testes de toxicidade). A escolha do método mais adequado irá depender do nível e da qualidade de informação que se quer obter, dos equipamentos disponíveis, do custo da análise, de pessoas treinadas e do tempo necessário para a obtenção de resultados, a fim de que em um caso de risco em potencial, as decisões cabíveis sejam tomadas rapidamente (Mcelhiney e Lawton, 2005; Mountfort *et al.*, 2005; Sangolkar *et al.*, 2006; Mekebri *et al.*,

2009). Entretanto, tais metodologias de detecção e quantificação ainda são muito trabalhosas e onerosas, não atendendo aos critérios da legislação nacional de qualidade de águas, que visam à ampliação das técnicas de monitoramento para pequenas e médias comunidades. É recomendável, portanto, que se aprimorem os procedimentos analíticos de avaliação de cianotoxinas, visando o desenvolvimento de metodologias simplificadas capaz de avaliar diversas cianotoxinas e suas ocorrências nas florações, aumentando significativamente os aspectos de segurança e da qualidade de águas.

Um procedimento que vem demonstrando eficiência na detecção e quantificação de microcistinas é o ensaio de inibição de enzimas fosfatases. O ensaio avalia o efeito inibitório da microcistina na liberação do grupo fosfato pela reação catalisada por enzimas fosfatases alcalinas (Rivasseau, *et al.*, 1999; Rapalla *et al.*, 2002; Mcelhiney e Lawton, 2005; Sangolkar *et al.*, 2006). Neste estudo, a otimização desta reação permitiu o desenvolvimento de um sistema qualitativo (P/A) para a detecção de microcistinas e sua utilização com indicador primário da presença da toxina em amostras de águas. Além disso, rotinas de análises por CLAE foram estabelecidas pela validação de um método menos tóxico, para ser utilizado como metodologias de referência, na separação e quantificação de microcistinas em amostras de águas. A proposta do sistema qualitativo utilizando a enzima fosfatase alcalina (PP1A) imobilizada e o substrato sintético 4-metil-umbeliferil-fosfato (MUP) mostrou-se como uma alternativa de menor custo e de execução facilitada. Neste sistema, a avaliação funciona como uma importante ferramenta de pré-análise, seguida de procedimentos analíticos de quantificação de microcistinas presentes nas amostras que apresentarem resultados positivos.



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar e desenvolver sistemas de detecção de microcistinas em amostras de águas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar uma metodologia livre de acetonitrila para análise de microcistina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Realizar ensaios enzimáticos de detecção de microcistinas utilizando Fosfatase alcalina e substratos sintéticos *p*-nitro-fenil-fosfato (pNPP) e 4-metil-ubeliferil-fosfato (MUP).
- Desenvolver o sistema qualitativo simplificado para análise da presença de microcistina em amostras de águas utilizando enzima fosfatase imobilizada.
- Avaliar o sistema simplificado com diversas amostras ambientais comparando o seu desempenho com os métodos tradicionais de análise de microcistina (PP1A livre, ELISA e CLAE).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. EUTROFIZAÇÃO E FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉIRAS

A eutrofização é dos principais fatores responsáveis pela degradação da qualidade das águas, reconhecida como um problema da poluição desde meados do século XX. Trata-se de um fenômeno de grande interesse da sociedade e da comunidade científica pelo fato de estar diretamente relacionado com as atividades antrópicas, que provoca sérios problemas aos usos múltiplos da água, principalmente, ao tratamento para abastecimento público (Chorus e Bartram, 1999; Yang *et al.*, 2008).

Caracterizada como o aumento da concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo nos ecossistemas aquáticos, capaz de aumentar significativamente a produtividade primária do corpo hídrico, a eutrofização ocorre em virtude de processos naturais e artificiais. A natural é lenta, contínua e resulta do aporte de nutrientes trazidos pelas chuvas e águas superficiais que lavam toda a bacia hidrográfica. Porém, o crescimento das atividades humanas ligadas à industrialização, à ocupação desorganizada dos solos, ao lançamento de efluentes domésticos e ao mau uso de fertilizantes químicos na agricultura acelera artificialmente a eutrofização dos corpos d'água (Sirqueira e Oliveira-filho, 2007; Conley *et al.*, 2009; Smith e Schindler, 2009).

Associada ao aumento da luminosidade e da temperatura, a eutrofização é a causa mais comum do acúmulo excessivo de algas e cianobactérias nos diversos ecossistemas aquáticos. As algas são de vital importância para o equilíbrio do ambiente aquático, pois representam a base da cadeia alimentar, como produtores primários. Porém junto à proliferação das algas, ocorre a multiplicação excessiva de organismos procarióticos, fototróficos, unicelulares, filamentosos ou

coloniais denominados cianobactérias. A semelhança com algas, cianobactérias possuem clorofila-a e a capacidade de realizar fotossíntese oxigênica, já com a estrutura procariótica e parede celular, características de bactérias, são capazes de rápida multiplicação celular (Yoo *et al.*, 1995; Silveira, 2004; Camargo e Alonso, 2006; Magalhães *et al.*, 2006; Carneiro e Leite, 2007; O'Neil *et al.*, 2012).

A diversidade metabólica das cianobactérias permite realizar diversas atividades associadas com a fixação de nitrogênio atmosférico, com a assimilação de formas alternativas de nitrogênio disponível no meio, com a mixotrofia em condições de baixa luminosidade, com a reserva e o acúmulo de fósforo, além da produção de pigmentos acessórios e de toxinas. Esta variada capacidade de adaptações fisiológicas contribui para o sucesso competitivo e pode explicar a grande adaptabilidade das cianobactérias aos mais diferentes habitat aquáticos (Hyenstrand *et al.*, 1998; Whitton, 1999; Beck *et al.*, 2012).

A rápida proliferação de cianobactérias nos ambientes aquáticos denomina-se florações ou “*blooms*”. As florações nem sempre são compostas de espécies tóxicas. O grupo das cianobactérias está representado por aproximadamente 150 gêneros, com mais de 2.000 espécies identificadas (Van den Hoek *et al.*, 1995). Deste número de representantes, aproximadamente 25 gêneros, com pouco mais de 40 espécies, são descritos como produtores de cianotoxinas com potencial toxicológico (Carmichael, 1994; Yoo *et al.*, 1995; Sivonen e Jones, 1999), podendo este número estar subestimado mediante dificuldades relacionadas à identificação taxonômica destes organismos. Contudo, estudos têm demonstrado que de 50 a 70% das cianobactérias presentes em florações são constituídos por espécies tóxicas (Sivonen *et al.*, 1990; Chorus e Bartram, 1999). A ocorrência de

florações tóxicas é um fenômeno de proporções globais. No Brasil, o problema é intensificado, pois sendo a maior parte do território localizada na região tropical e com menos de 50 % dos esgotos tratados, suas águas se encontram em processo potencial de eutrofização (Graham, 2007; Sant'anna *et al.*, 2008).

Segundo Huszar *et al.* (2000), as cianobactérias destacam-se expressivamente por sua dominância, tanto em biomassa, quanto em densidade celular, seja em sistemas aquáticos naturais ou artificiais. Em casos específicos, como ambientes lênticos, foram observados que 62% dos reservatórios e 42% dos lagos estudados no Brasil apresentaram-se dominados por cianobactérias. Estudos realizados em reservatórios brasileiros demonstram que as condições que favorecem a eutrofização como alto tempo de detenção hidráulica dos ambientes lênticos, concentrações de fósforo total entre 50-660 µg/L, pH elevado (7,0 a 9,0), baixa profundidade (entre 2,8 e 14 metros), temperatura da água acima de 20 °C e razão Nitrogênio/Fósforo-total entre 2 e 19 são adequados para a proliferação e manutenção das florações de cianobactérias (Sant'anna e Azevedo, 2000; Figueredo *et al.*, 2004).

A ocorrência de florações de algas tóxicas e o controle de toxinas em águas de abastecimento descrevem representantes do gênero *Microcystis* como sendo o principal causador de efeitos tóxicos em águas continentais. No Brasil, florações desse gênero, em especial, a espécie *Microcystis aeruginosa*, têm sido descritas em diferentes reservatórios lacustres (Azevedo *et al.*, 1994; Talamoni, 1995; Nogueira, 1996; Nobre, 1997; Jardim, 1999; Sant'anna e Azevedo, 2000; Vieira, 2002; Costa, 2003) e em lagoas costeiras no país (Yunes *et al.*, 1998a; Matthiensen *et al.*, 1999; Minillo *et al.*, 2000; Huszar *et al.*, 2000). *Microcystis*

aeruginosa é reconhecida como a cianobactéria mais comum na geração de florações tóxicas em todo o mundo, bem como em todo o território nacional, provocando efeitos nocivos a animais e com potenciais riscos à saúde do homem (Sant'anna e Azevedo, 2000).

3.2. CIANOTOXINAS E TOXICIDADE

As cianotoxinas são endotoxinas que podem ser produzidas em todos os estágios do crescimento da célula e são liberadas quando ocorre lise celular. As causas da produção das cianotoxinas não são totalmente conhecidas e parecem estar relacionadas com diferentes variáveis ambientais (Wood *et al.*, 2012). Cada espécie de cianobactérias parece ser influenciada de maneira diferenciada e responde de forma distinta para cada conjunto de condições ambientais específicas (ex: luminosidade, temperatura, concentração de nutrientes, pH, micronutrientes, fluxo hidráulico, entre outros). Em razão disso, não se faz generalizações relativas aos efeitos de qualquer uma variável ambiental na produção de toxinas. Têm se assumido que esses compostos tenham a função protetora contra herbívoros, como acontece com alguns metabólitos de plantas vasculares. A natureza da formação e imprevisibilidade de produção de toxina torna as florações extremamente perigosas para saúde pública e para a biota aquática ambiente (Carmichael, 1994; Yunes *et al.*, 1998b; Zurawell *et al.*, 2005; Calijuri *et al.*, 2006; Carneiro e Leite, 2007).

As cianotoxinas representam uma classe de metabólitos secundários tóxicos com estruturas químicas variadas, agrupadas, em geral, em três grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipossacarídeos. Os mecanismos de ação e os níveis de toxicidade estão diretamente associados à diversidade estrutural apresentada

pelas cianotoxinas. Com base nos seus efeitos biológicos e aos locais de ataque nos organismos-alvo, as cianotoxinas são classificadas como: Hepatotoxinas, Neurotoxinas, Citotoxinas, Dermatoxinas e Toxinas com potencial irritante ou com ação no sistema gastrointestinal (lipossacarídeos). Atualmente, as hepatotoxinas e neurotoxinas são consideradas como risco prioritário ao ser humano e à saúde animal. Dentre as hepatotoxinas podemos citar as Microcistinas, Nodularinas e Cilindropermopsinas. Entre as neurotoxinas, as Anatoxinas e Saxitoxinas são as principais representantes (Carmichael, 1994; Chorus e Bartram, 1999; Codd *et al.*, 2005; Rastogi e Sinha, 2009; Dorr *et al.*, 2010; Merel *et al.*, 2010).

As neurotoxinas são, em geral, alcalóides de baixa massa molecular, formados por aminas secundárias e produzidos por diferentes espécies dos gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Lyngbya* e *Cylindropermopsis*. Estas toxinas afetam o sistema nervoso, interrompendo a sinalização entre os neurônios e músculos e, se ingeridas em concentrações elevadas, podem causar a morte por paralisação dos músculos respiratórios. A Anatoxina-a, por exemplo, é conhecida como “fator de morte rápida”, devido a sua ação paralisante letal que se desenvolve minutos após a sua exposição (Hawser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994; Chorus e Bartram, 1999; Araoz *et al.*, 2010).

As hepatotoxinas foram primeiramente isoladas em estudos de Bishop *et al.* (1959) sobre a toxicidade hepática de substâncias produzidas por *Microcystis aeruginosa*, que posteriormente Konst *et al.* (1965) denominaram de microcistinas. No entanto, a sua produção não se restringe exclusivamente a esta espécie, visto que diferentes cepas dos gêneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Hapalosiphon*, *Aphanocapsa*, *Synechocystis* e *Oscillatoria*, já foram citadas como

produtoras desta toxina. Esta variedade de cepas potencialmente produtoras associada com a frequência na qual é observada faz da microcistina um importante padrão para os estudos de toxicidade em florações de cianobactérias (Yoo *et al.*, 1995; Sivonen, 1996; Harada e Tsuji., 1998; Domingos *et al.*, 1998; Nascimento e Azevedo, 1999; Brittain *et al.*, 2000).

No Brasil, o caso mais grave de intoxicação relacionada às cianotoxinas ocorreu em Caruaru (PE), em 1996, quando 131 pacientes que faziam tratamento em uma clínica de hemodiálise sofreram intoxicação hepática causada por microcistinas. Sintomas causados pela toxidez, tais como distúrbios visuais, náuseas, vômito e fraqueza muscular foram detectados em 116 pacientes, 100 pacientes desenvolveram problemas hepáticos agudos e 70 mortes foram confirmadas devido à presença de microcistinas na água utilizada para hemodiálise. (Sant'anna e Azevedo, 2000; Azevedo *et al.*, 2002, Dorr *et al.*, 2010). Outro registro que destacou a preocupação com os efeitos tóxicos das florações de cianobactérias foi a ocorrência de mais de 2.000 casos de gastroenterites registrados na região de Paulo Afonso, na Bahia, sendo que 88 resultaram em mortes (Teixeira *et al.*, 1993).

Quanto a sua estrutura química, as microcistinas são peptídeos cíclicos compostos por 7 resíduos de aminoácidos (-D-Ala¹-Xaa²-D-MeAsp³-Zaa⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷-). Os resíduos de D-aminoácidos, alanina (Ala), ácido aspártico metilado (MeAsp) e ácido glutâmico (Glu), se intercalam com os aminoácidos incomuns: N-metil-dehidroxi-alanina (Mdha) e Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienóico (Adda). Nas posições 2 e 4 da estrutura cíclica, ainda são encontrados os resíduos de L-aminoácidos variáveis (Xaa e Zaa), principais

responsáveis pela nomenclatura das microcistinas proposta por Carmichael *et al.* (1988). As diferentes variantes de microcistinas são identificadas pelas letras que corresponde à abreviatura dos resíduos de aminoácidos variáveis (Xaa e Zaa). Microcistina-LR, por exemplo, possui resíduos de leucina e arginina, a microcistina-RR, resíduos de arginina e arginina, a microcistina-LA, resíduos de leucina e alanina, a microcistina-YR, resíduos de tirosina e arginina (Figura 01). (Chorus e Bartram, 1999; Codd, 2000; Zurawell *et al.*, 2005; Puschner e Humbert, 2007; Mekebri *et al.*, 2009; Sangolkar *et al.*, 2010).

A ingestão de águas contaminadas com microcistinas permite a sua absorção via intestinal e em seguida pela corrente sanguínea. Pelo sangue, as microcistinas atingem o fígado, causando uma progressiva deformação, dissociação e necrose das células hepáticas. Os efeitos agudos levam ao quadro de hemorragia hepática que pode resultar em morte do indivíduo intoxicado. Incapaz de atravessar as membranas celulares, a toxina entra nos hepatócitos através do mecanismo transportador de ácidos biliares. Dentro da célula, ligam-se covalentemente às proteínas fosfatases inibindo as reações de desfosforilação de proteínas. Como resultado, proteínas fosforiladas passam a se acumular no interior das células provocando uma série de distúrbios metabólicos. Perturbações no citoesqueleto devido à dificuldade de reorganização dos filamentos de actina são responsáveis pelas mudanças morfológicas dos hepatócitos. A inibição de reações envolvendo proteínas desfosforiladas induz a formação de radicais livres, alterações mitocondriais que são responsáveis por apoptose e desenvolvimento de lesões no fígado. Quando submetido a exposições sucessivas, mesmo que em pequenas concentrações de microcistina, os efeitos toxicológicos podem ser

responsáveis pelo desenvolvimento de tumores e câncer (Puschner e Humbert, 2007; Rastogi e Sinha, 2009; Merel *et al.*, 2010).

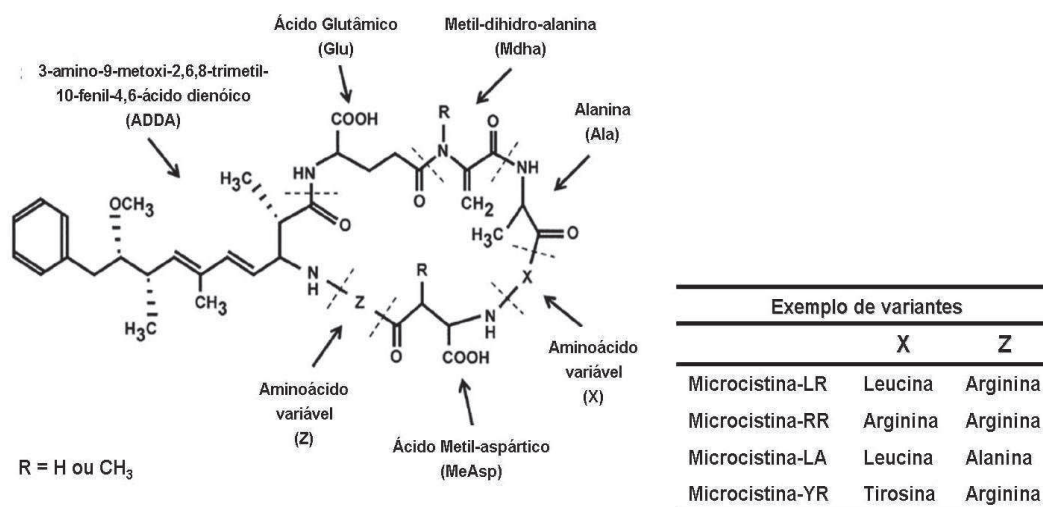


Figura 01 – Estrutura química das microcistinas. Fonte: Adaptada de Merel *et al.* (2010)

3.3. LEGISLAÇÃO: PADRÕES E LIMITES NACIONAIS PARA CIANOTOXINAS

As florações de cianobactérias causam impactos sociais, econômicos e ambientais, alterando as características físico-químicas da água e afetando a capacidade de sobrevivência dos organismos aquáticos. Desde o primeiro relato de contaminação de animais com águas contaminadas com cianotoxinas em um lago australiano em 1878, registros de danos causados à saúde da população e do ambiente tem se tornado cada vez mais frequentes. Florações de cianobactérias têm sido registradas de norte ao sul do país (Deberdt *et al.*, 2004).

A preocupação constante das autoridades de saúde pública em relação às normas relacionadas à saúde e qualidade ambiental. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda são poucas as referências que propõem valores limites para cianobactérias e suas toxinas, apesar de todos os avanços nas técnicas analíticas e moleculares de identificação e quantificação de cianotoxinas. Estudos de toxicidade oral em níveis crônicos, realizados em camundongos

(Fawell *et al.*, 1994) e em porcos (Falconer *et al.*, 1994) foram utilizados como principal referência para se estabelecer um índice de ingestão diária máxima aceitável para a microcistina. O nível seguro para a ingestão desta toxina, ou seja, o valor da dose considerada incapaz de provocar efeitos adversos em humanos, mesmo sendo consumida diariamente durante toda a vida, foi definida em 0,04 µg de microcistina por quilograma de massa corpórea por dia (kg/dia). Considerando este valor como referência, e utilizando a massa corpórea média de um adulto (60 kg) e o seu consumo médio de água por dia (2,0 L/dia), a OMS recomendou um valor limite máximo de 1,0 µg/L para microcistina total em águas utilizadas para abastecimento público. Este valor foi publicado como referência para cianotoxinas na segunda edição do *Guidelines for drinking-water quality* (Chorus e Bartram, 1999, Deberdt *et al.*, 2004).

Atualmente vários países têm definido estratégias de identificação e controle de florações de cianobactérias. Porém são poucos, os que de fato, regulamentaram um limite de concentração máxima de cianotoxina, tanto para águas de recreação, quanto para águas destinadas ao abastecimento público. As autoridades da África do Sul, por exemplo, com políticas de identificação e monitoramento de áreas eutrofizadas, incentivam a criação de mapas, relacionando a ocorrência de florações e níveis necessários de tratamento da água para potabilidade. Porém a criação de uma norma, que estabelece valores máximos permitidos é considerada prematura, por causa das implicações de custos, principalmente para pequenos provedores de água. Nos Estados Unidos, a nível nacional, não há regulamentação de valores máximos para cianotoxinas, fica a critério dos estados estabelecerem seus valores limites próprios. Já países como, Alemanha, Austrália, Canadá, Checoslováquia, Espanha, Finlândia,

França, Polônia e Brasil, definiram entre seus padrões de água potável, valores de referência nacionais para cianotoxinas, principalmente para microcistina, seguindo as orientações da OMS (Chorus e Bartram, 1999; Deberdt *et al.*, 2004; Chorus, 2005; Hudnell, 2010).

O Brasil foi o primeiro país a estabelecer limites para densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas em norma nacional, como força de lei, mesmo sem conhecer a magnitude do problema para a saúde pública, ao longo de todas as regiões do país. Procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade das águas para consumo humano foram estabelecidos na Portaria do Ministério da Saúde n.^o 1.469, de 29/12/2000. Além de discutir padrões de potabilidade, a portaria foi pioneira ao inserir numa norma legal a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias, junto ao ponto de captação em mananciais superficiais. Atualizações realizadas pela Portaria n.^o 518/2004 definiram valores-guia de 1,0 µg/L para equivalentes de microcistinas, 3,0 µg/L para equivalentes de saxitoxinas e 15,0 µg/L para a cilindropermopsinas. O monitoramento obrigatório foi estabelecido para as microcistinas, como o valor máximo permitido para água potável igual ao valor guia de 1,0 µg/L, sendo aceitável a concentração de 1,0 a 10,0 µg/L de microcistinas em até 03 amostras, consecutivas ou não, em 12 meses de análise. Apesar de não estabelecer a obrigatoriedade de monitoramento das saxitoxinas e cilindropermopsinas, devido à escassez de informações e não disponibilidade de técnicas analíticas padronizadas, a norma recomenda as análises e a observação dos seus respectivos valores-guia, como limites máximos (Brasil, 2004; Deberdt *et al.*, 2004 Brasil, 2006). Em 2011, a Portaria n.^o 2.914/2011 reafirmou a necessidade de análise de microcistina, de acordo com a densidade de cianobactérias observada

e reforçou as recomendações de análises de cilindropermopsinas e anatoxinas, quando detectada a presença dos gêneros de cianobactérias potencialmente produtoras destas cianotoxinas (Brasil, 2011a).

De acordo com as portarias do Ministério da Saúde, o Ministério do Meio Ambiente, por meio do Conselho Nacional de Meio Ambiente, estabeleceu a Resolução CONAMA n.º357/2005, que dispõe sobre a obrigatoriedade do monitoramento do número de cianobactérias e/ou biovolume e a sua relação com a necessidade de análise de microcistinas. O monitoramento no ponto de captação deve obedecer a uma frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL, e semanal, quando exceder este valor. Quando o número de cianobactérias no ponto de captação do manancial exceder 20.000 células/mL, a análise da densidade além de passar a ser semanal, deve ser acompanhada da quantificação obrigatória dos níveis de microcistinas na saída do tratamento de água. 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 microrganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder 20.000 células/mL, sob pena de riscos elevados à saúde pública e à biota em geral (Deberdt *et al.*, 2004, Brasil, 2005). Em 2011, o Ministério do Meio Ambiente, por meio da Resolução CONAMA n.º430/2011 ratificou as medidas em relação ao monitoramento das cianobactérias (Brasil, 2011b).

3.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CIANOTOXINAS

A definição de limites legais para a concentração de cianobactérias e suas toxinas estabelece a necessidade imediata de ações de controle e vigilância da qualidade

d'água. No Brasil, estas ações ainda são extremamente tímidas, pois muitos municípios e localidades não dispõem de pessoal e de laboratórios capazes de realizar o monitoramento da qualidade d'água. A estruturação destes laboratórios e capacitação de seus técnicos são medidas básicas para estimular a elaboração de políticas públicas de controle da eutrofização e a implantação de medidas de prevenção e controle das florações de cianobactérias em mananciais utilizados para abastecimento público. Além disso, o fomento de pesquisas na área é fundamental para o desenvolvimento de metodologias analíticas precisas para aumentar significativamente a segurança e a qualidade das águas (Deberdt *et al.*, 2004, Martins, 2010).

Métodos de diagnóstico rápido para florações tóxicas são difíceis, pois os perfis de toxina variam amplamente entre as cinco classes de cianotoxinas. As principais metodologias de detecção e quantificação em amostras de água referem-se às microcistinas, grupo pertencente à classe das hepatotoxinas e presente na maioria das florações comprovadamente tóxicas. Antes do desenvolvimento dos métodos analíticos e moleculares para a detecção, as análises se baseavam em bioensaios em animais para avaliar a toxicidade de amostras de águas com florações. Atualmente, métodos como: imunoensaio do tipo ELISA, testes de biologia molecular, cromatografias de alta eficiência (CLAE) e ensaios de inibição da enzima fosfatase dominam as análises de cianotoxinas. A escolha do método mais adequado irá depender do nível e da qualidade da informação desejada. A disponibilidade de equipamento, o custo da análise, o treinamento pessoal e o tempo necessário para a obtenção de resultados são as principais diferenças entre os métodos e importantes parâmetros a serem considerados durante a definição da metodologia. Entretanto, tais metodologias

de detecção e quantificação ainda dificultam o monitoramento em pequenas e médias comunidades (Mountfort *et al.*, 2005; Mcelhiney e Lawton, 2005; Pearson e Neilan, 2008; Mekebri *et al.*, 2009).

Os bioensaios são testes de avaliação toxicológica realizados em animais ou grupo de células. Em geral, são utilizados para adquirir informações sobre a toxicidade, permitindo relacionar a presença de florações e os seus impactos no ambiente natural. Embora sejam capazes de oferecer uma triagem simples e rápida quanto à presença de cianobactérias, os bioensaios não possuem sensibilidade suficiente para detecção de uma cianotoxina específica. Os testes possuem apenas potencial para correlacionar as classes de toxinas aos seus efeitos adversos. Os bioensaios devem, portanto, estar associados a técnicas qualitativas e quantitativas de análises de cianotoxinas, para a detecção específica da toxina. Além disso, o uso de animais, como camundongos, em testes de toxicidade tem sofrido implicações éticas, com fortes oposições públicas. Testes com animais invertebrados tais como *Daphnia sp*, *Drosophila melanogaster*, larvas de mosquito e camarões (*Artemia salina*) têm sido investigados, no entanto não apresentam especificidade e não foram validados para o monitoramento de rotina (Mcelhiney e Lawton, 2005, Mountfort *et al.*, 2005, Sangolkar *et al.*, 2006; Ferrão-Filho *et al.*, 2010).

Outra metodologia utilizada em ensaios de detecção e quantificação de cianotoxinas, especialmente microcistinas e nodularinas, é o método imunológico ELISA. Baseado em uma reação imuno-enzimática inversamente proporcional à concentração da toxina, este teste reporta valores de concentração de microcistina total de uma amostra, eliminando a necessidade de uma ampla faixa

de padrões analíticos. O manuseio fácil e rápido, na forma de kits, permite a sua aplicação com o mínimo de treinamento técnico e simples processamento da amostra. Além disso, reporta análises de alto desempenho, com sensibilidade de detecção na faixa de ppb ($\mu\text{g/L}$) (Rapala *et al.*, 2002). Vários kits de teste de ELISA estão disponíveis comercialmente no mercado: Abraxis LLC, Pensilvânia Inc., EnviroLogix Inc., Strategic Diagnostic Inc., Wako Chemicals

A possibilidade de reações cruzadas entre variedades de microcistinas têm colocado algumas restrições no uso destes kits, principalmente quando são avaliadas microcistinas hidrofóbicas (Lawton *et al.*, 2010). Os testes de ELISA determinam a concentração total da toxina, sem a distinção das diferentes variantes. A detecção baseada na estrutura química da microcistina faz com que os ensaios de ELISA apresentem baixa correlação entre a reatividade e a toxicidade aguda da amostra, pois detectam tanto a forma ativa, quanto a forma inativa da toxina (Triantis *et al.*, 2010). Apesar dos vários kits de teste de ELISA disponíveis comercialmente, trata-se ainda de uma técnica de custo elevado, o que inviabiliza a sua ampla utilização na avaliação da qualidade de águas, principalmente nas comunidades de médio e pequeno porte. Além disso, os kits de diferentes fabricantes podem resultar em diferentes valores detectados (Metcalf *et al.*, 2002).

Com a biologia molecular em evidência, principalmente, a partir do fim do século passado, surgiram os estudos com ferramentas moleculares para detecção de cianotoxinas. Inicialmente, os métodos moleculares foram desenvolvidos para avaliar a diversidade de cianobactérias presentes em florações. A presença de espécies tóxicas pode ser confirmada pela técnica da reação em cadeia da

polimerase (*PCR-Polymerase Chain Reaction*), utilizando o DNA isolado de amostras ambientais e marcadores moleculares taxonômicos universais construídos a partir do gene 16SrRNA. Na década de 90, foram publicados os primeiros trabalhos sobre a genética e a regulação a nível molecular, das vias biosintética de algumas cianotoxinas, principalmente microcistinas, nodularinas e cilindropermopsinas (Neilan *et al.*, 1999; Pearson e Neilan, 2008).

O sequenciamento do *cluster* do gene *mcy* responsável pela biossíntese de microcistina permitiu ir além da análise presença/ausência de florações tóxicas, possibilitando a identificação da toxina, com relação ao seu potencial de produção. Tais genes foram classificados como marcadores moleculares específicos e passaram a ser utilizados em reações de PCR para a amplificação e detecção da presença dos genes responsáveis pela expressão potencial das toxinas. A possibilidade de detecção destes genes tornou-se relevante, pois permitiu determinar a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas de forma mais precisa em comparação com as análises tradicionais, como por exemplo, a identificação microscópica de cepas tóxicas. Porém como potencial genético para a produção de cianotoxinas é influenciado por fatores ambientais, as toxinas podem não estar sendo produzidas e liberadas no momento da avaliação, tornando-se os métodos moleculares altamente restritivos (Ouellette e Wilhelm, 2003; Dittmann e Borner, 2005; Al-Tebrineh *et al.*, 2011).

Os testes genéticos avaliam o grau de risco das florações, caracterizando o seu potencial de toxicidade, porém para estudos de identificação e de detecção de diferentes cianotoxinas recomenda-se o uso de métodos analíticos, dentre eles, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As técnicas

cromatográficas possuem alto poder de separação entre as diferentes toxinas, inclusive com a possibilidade de distinção entre as diversas variantes de microcistinas. Nas análises de microcistinas é comum o uso de colunas de fase reversa C18, com separação realizada pelo gradiente de hidrofobicidade. Este gradiente abrange diferentes polaridades, permitindo a análise de todas as variantes de microcistinas. A identificação pode ser realizada por um detector ultravioleta combinado (CLAE/UV), ou por uma análise sequencial em espectrometria de massa (CLAE/EM). Embora a análise de toxinas por CLAE seja capaz de fornecer informações precisas e específicas sobre a identidade e a quantidade de cada variante de microcistina, na ordem de nanogramas, o método requer instrumentação e pessoal especializado, cuidados na preparação da amostra e a comparação com padrões da toxina. Toda essa necessidade contribui para o elevado custo unitário da análise por CLAE. Além disso, a falta de padrões para a maioria das variantes de microcistinas pode subestimar a concentração da toxina nas análises por cromatografia (Harada *et al.*, 1999; Dahlmann *et al.*, 2003; Mcelhiney e Lawton, 2005; Akin-Oriola e Lawton, 2006; Wang *et al.*, 2007; Purdie *et al.*, 2009; Oehrle *et al.*, 2010).

Os métodos que exploram a propriedade bioquímica das cianotoxinas passaram a ser utilizados, depois que estudos sobre os mecanismos de ação das hepatotoxinas demonstraram que microcistinas e nodularinas são potentes inibidores de proteínas fosfatases de células eucarióticas (Mackintosh *et al.*, 1990; Matsuhima *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990; Bell e Codd, 1994). Enzimas fosfatases catalisam a liberação de grupos fosfatos de substratos fosforilados e a inibição desta reação pela toxina, pode ser utilizada em ensaios de quantificação. A concentração de microcistina no ensaio enzimático é inversamente proporcional

à concentração do grupo fosfato liberado pela reação entre a enzima fosfatase e o substrato sintético. Entre os substratos, existem exemplos de compostos marcados com fósforo radioativo (P^{32}), cromogênicos (*p*-NPP – *p*-Nitro-Fenol-Fosfato), ou ainda, fluorogênicos (MUP – 4-Metil-Ubeliferil-Fosfato). Esta reação apresenta sensibilidade suficiente para detectar as microcistinas abaixo do nível de 1,0 µg/L, valor máximo permitido pela legislação brasileira para águas destinadas ao abastecimento público. (Heresztyn e Nicholson, 2001; Rapala *et al.*, 2002, Mcelhiney e Lawton, 2005).

Os ensaios de detecção enzimática de microcistina mais comuns se baseia na utilização de substratos colorimétrico, uma vez que apresentam maior conveniência e menor custo, quando comparado, por exemplo, com substratos marcados com fósforo radioativo (Heresztyn e Nicholson, 2001). Trata-se de um ensaio de fácil e rápida aplicabilidade, porém antes da reação é necessário o preparo de uma série de soluções de trabalho, uma vez que este tipo de ensaio não se encontra disponível na forma de kits de análises. A dificuldade do desenvolvimento destes kits está relacionada, principalmente, à alta instabilidade da enzima e também do substrato em soluções aquosas. O ensaio ainda é sensível a inibidores naturais da fosfatase, tais como ácido okadaíco, caliculina e tautomicina, os quais podem superestimar a concentração de microcistinas (Metcalf *et al.*, 2001). No entanto, o uso da fosfatase na detecção de microcistinas fornece importantes informações toxicológicas sobre a atividade biológica da toxina, já que o método se baseia na atividade funcional, em vez do reconhecimento de estruturas químicas. Sendo assim, esta reação é propicia para indicar níveis de toxicidade em amostras de água como uma pré-análise seguida de procedimentos analíticos de identificação das variantes de microcistinas

presentes nas amostras que apresentarem resultados positivos (Mountfort *et al.*, 2005; Mcelhiney e Lawton, 2005).

3.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

3.5.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os testes cromatográficos constitui um método analítico de referência nas análises de microcistina, eficiente na separação e quantificação da toxina em amostras de águas. Por se tratar de um método analítico, os testes cromatográficos necessitam ser validados, para serem aprovados e registrados na Secretaria de Vigilância da Saúde (Brasil, 2006).

A validação é realizada para garantir que a metodologia analítica seja exata, reprodutível e flexível sobre uma faixa específica, em conformidade com as exigências legais ou com o fim proposto pelo método analítico. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, INMETRO e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, INMETRO DOQCGCRE-008 (Brasil 2003b) e a Resolução ANVISA nº899 (Brasil 2003a). A resolução da ANVISA é o guia mais adequado para a validação de técnicas cromatográficas ligadas aos estudos de cianotoxinas, pois descreve uma metodologia que se aplica às técnicas analíticas diretamente associadas às políticas de proteção de saúde pública (Ribani *et al.*, 2004).

A primeira etapa da validação é a definição de uma condição analítica proveniente de uma revisão da literatura científica e de um desenvolvimento prático. É necessário que a melhor condição esteja padronizada para se iniciar os testes de

validação. Em relação aos métodos cromatográficos, esta padronização deve considerar a influência da variação causada pelo uso de diferentes lotes e/ou fabricantes de colunas, da variação da temperatura, da composição da fase móvel e do pH da fase móvel. Os testes de validação envolvem a avaliação de diferentes parâmetros de desempenho do método, conhecidos com parâmetros de validação. Os parâmetros normalmente encontrados para a validação de métodos quantitativos são: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e incerteza de medição (Ribani *et al.*, 2004; Albuquerque Junior *et al.*, 2007).

Os parâmetros de especificidade e seletividade estão relacionados ao evento de detecção do analito. Um método específico é aquele que produz resposta para um determinado analito. Quando um método produz respostas para vários analitos, mas é possível distinguir a resposta de um analito de outros, ele é definido como seletivo. Na técnica de CLAE para análises de microcistinas, por exemplo, a identificação do espectro de absorção UV no comprimento de onda de 238 nm, caracteriza a sua especificidade, pois produz resposta para a toxina de interesse. Além disso, a variação da fase móvel permite a eluição de diferentes variantes de microcistinas em diferentes tempos de retenção, permitindo a seletividade de cada variante (Rapala *et al.*, 2002; Mcelhiney e Lawton, 2005).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. Para o estudo deste parâmetro nos ensaios cromatográficos, é necessária a elaboração de uma curva resposta que demonstre a relação entre a área do pico detectado e o padrão de referência em

diferentes concentrações. Se for observada 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) e coeficiente angular (α). A linearidade é formulada pela expressão matemática ($y = \alpha x + \beta$) e o coeficiente de correlação linear (r) indica o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático para estimar a concentração do analito na amostra a ser quantificada. Para a elaboração desta curva analítica é necessário no mínimo cinco concentrações diferentes, sendo necessário, em geral, um valor de $r > 0,90$ (Brasil, 2003a, b).

Os estudos de linearidade são utilizados para delimitar uma faixa linear de trabalho, definida por um intervalo. Esta faixa linear depende da aplicação pretendida pelo método, devendo cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. O intervalo avaliado para a validação compreende a faixa entre a menor e a maior concentração capaz de serem quantificadas por um método analítico, com a precisão, exatidão e linearidade exigida. A concentração mais esperada da amostra, ou concentração alvo, deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (Brasil, 2003a, Lanças, 2004b).

A avaliação da proximidade dos resultados estimados em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra é definida como precisão. Em geral, a precisão é expressa nos níveis de repetitividade e reprodutibilidade. A repetitividade é a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo local e mesmo procedimento. Também é denominada de 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. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas em 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 (Brasil, 2003a, b).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, as determinações dos parâmetros *Limite de Detecção* (LOD) e do *Limite de Quantificação* (LOQ) tornam-se ainda mais relevantes para a validação do método. O *LOD* é expresso pela menor quantidade do analito que pode ser detectado em uma amostra, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Esta quantidade é igual ao valor da concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% a 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O *LOQ* é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições definidas para a análise. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Em ensaios cromatográficos é necessário determinar ainda, o limite de detecção do equipamento (*LDE*). O *LDE* considera a razão entre sinal e o ruído do equipamento, sendo expresso pelo valor da concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes o valor desta relação (Brasil, 2003a, b).

A baixa concentração do analito determina, na maioria das vezes, a necessidade de uma etapa de concentração. Para determinação de microcistinas em CLAE, o processamento prévio é essencial para a produção de cromatogramas confiáveis. A extração em fase sólida (*SPE – Solid Phase Extraction*), em cartuchos C18, é amplamente utilizada para a concentração de amostras de água e para eliminar contaminantes da matriz (Lanças, 2004a). No entanto, é comum que uma parte substancial do analito permaneça na matriz após a extração, de modo que uma subsequente medição forneça um valor inferior à verdadeira concentração da substância. Assim, 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. A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações e, então, serem submetidas ao processo de extração, concentração e análise (Brasil, 2003a, b, Lanças, 2004b; Albuquerque Junior *et al.*, 2007).

3.5.2. MÉTODOS QUALITATIVOS

Uma tendência na química analítica moderna é o desenvolvimento de novas técnicas ou métodos analíticos capazes de identificar e quantificar um analito em amostras complexas, como aquelas relacionadas à segurança alimentar e problemas ambientais. Em problemas ambientais com cianobactérias, as técnicas

de ELISA ou CLAE são exemplos de métodos analíticos com comprovada eficiência de detecção e quantificação, sendo, portanto, referência nas análises de microcistinas. Porém o alto custo de investimento e operação destas técnicas impõe na prática, a importância de se reconsiderar se os resultados quantitativos são realmente necessários (Trullols *et al.*, 2004).

De acordo com a legislação brasileira, por meio das portarias do Ministério da Saúde e das resoluções do Ministério do Meio Ambiente, no país, é obrigatório o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em águas utilizadas para abastecimento público (Brasil 2006). Este monitoramento se baseia na densidade de cianobactérias, o que não reflete diretamente o perfil toxicológico da amostra. A impossibilidade de distinguir cepas tóxicas e não tóxicas por simples observação microscópica permite que amostras com densidades abaixo de 20.000 células/mL, porém com alta densidade de cepas tóxicas, apresente toxicidade e o nível de cianotoxina não seja determinado. Já amostras com densidades acima de 20.000 células/mL, nem sempre apresentarão níveis elevados de toxina e a detecção semanal, exigida por lei, poderá não ser necessária. Sendo assim, os agentes ou entidades ambientais precisam de uma ferramenta mais ágil para tomada de decisões para o gerenciamento de qualidade de águas referente aos níveis de cianotoxinas.

Uma alternativa é o desenvolvimento de métodos qualitativos do tipo presença/ausência capazes de realizar uma triagem segura das amostras que necessitam ser submetidas a métodos referenciais de avaliação quantitativa. Com a aplicação de métodos qualitativos impediria que tanto amostras com densidade menor que 20.000 células/mL e potencialmente livre de microcistinas, quanto

amostras com densidade maiores que 20.000 células/mL e potencialmente contaminadas com microcistinas sejam submetidas aos métodos de quantificação. Esta triagem das amostras além de aumentar a segurança no controle da presença de toxinas, reduziria significativamente o tempo e o custo das análises (Trullols *et al.*, 2004).

Diante da importância das análises qualitativas, principalmente quando utilizadas para subsidiar as tomadas de decisões, é necessário que a confiabilidade dos resultados seja inquestionável. Apesar da existência de protocolos bem estabelecidos para validação de métodos quantitativos, ainda existe uma lacuna no desenvolvimento de abordagens para a implantação da metrologia em análises qualitativas. Apesar de não existir documentos específicos para a validação de métodos qualitativos, esses métodos também precisam ser validados. Em geral, os documentos de validação de métodos analíticos quantitativos são utilizados como referência na elaboração de procedimentos de validação, embora não exista uma uniformidade sobre quais características devem ser determinadas no processo de validação. O documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (Brasil 2003b) e a Resolução ANVISA nº899 (Brasil 2003a) são as principais referências nacionais. A AOAC (Association Official Analytical Chemists), ISO (International Standards Organization), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISTA (International Seed Testing Association), EPA (US Environmental Protection Agency) e EURACHEM são exemplos de importantes organizações internacionais que lidam com validação de métodos qualitativos (Trullols *et al.*, 2004; Gondim *et al.*, 2011).

Todas as organizações que lidam com validação de métodos qualitativos, apesar dos diferentes focos, propõem e definem cinco parâmetros de desempenho: taxa de falso positivo (TFP), taxa de falso negativo (TFN), taxa de confiabilidade (TCF), taxa de sensibilidade (TS) e taxa de especificidade (TE). A TFP é a probabilidade de se obter um resultado positivo, quando o analito não está presente na amostra. A taxa é estimada pela proporção de resultados positivos incorretos relatados para amostras que respondeu negativamente ao método de referência. Porém quando o analito está presente na amostra, a probabilidade do método qualitativo indicar um resultado negativo é definido como TFN. A TFN é estimada pela proporção dos resultados negativos incorretos relatados para a amostra que respondeu positivamente ao método de referência (Ellison e Fearn, 2005).

A confiabilidade é um dos principais parâmetros de desempenho de um método qualitativo. Trata-se de um parâmetro que estima a probabilidade dos erros de medição. A sua taxa é definida como sendo a proporção de resultados corretos (positivos ou negativos) de um total de testes independentes. Em relação aos métodos quantitativos, a confiabilidade pode ser relacionada à exatidão. A confiabilidade dos métodos qualitativos comparados a diferentes métodos de referência se baseiam na sua sensibilidade (TS) e especificidade (TE). Os parâmetros TS e TE estão, por sua vez, associados aos resultados verdadeiros, ou seja, à capacidade do método em responder exatamente igual ao método de referência. A TS é a probabilidade de se obter um resultado negativo quando a amostra for realmente negativa. Já a TE é a probabilidade de se obter um resultado positivo quando a amostra realmente for positiva pelo método de referência (Trullols *et al.*, 2004; Ellison e Fearn, 2005; Gondim *et al.*, 2011).

Quando amostras independentes, que podem ou não conter o analito de interesse são submetidas às análises qualitativas e comparadas com métodos referenciais, as taxas de falsos resultados, de sensibilidade e especificidade são parâmetros que caracterizam a eficiência do método. Nos casos que envolvem amostras ambientais, quando o método qualitativo for utilizado para detectar a presença/ausência de determinado contaminante, o método deverá ser considerado eficiente quando apresentar baixas taxas de falsos negativos e demonstrar ser mais sensível do que específico. Isto porque, resultados falso-negativos tornam-se um perigo, pois atesta a ausência do contaminante na amostra realmente contaminada. Já os resultados falso-positivos são menos impactantes, em nível de segurança, pois torna o método apenas mais restritivo, o que pode ser facilmente resolvido, esclarecendo os resultados presuntivos por intermédio de um novo teste da amostra.

Para a análise de dados e avaliação dos parâmetros de desempenho dos métodos qualitativos, vários modelos de delineamentos experimentais e ferramentas de análise são propostas na literatura. Para os cinco parâmetros mais comuns descritos no texto, as Tabelas de Contingência e o Teorema de Bayes são as ferramentas de análise mais utilizadas. O teorema formulado por Bayes vem sendo utilizado, desde o século XVIII, para expressar as probabilidades, quando estruturas dicotômicas (ex: presença/ausências; sim/não) estão envolvidas nas análises qualitativas. O teorema calcula a probabilidade de se encontrar um resultado correto, seja negativo ou positivo, quando ele for realmente correto. Para que o procedimento forneça boas estimativas de incerteza e erros associados, o número de testes de ensaios deve ser alto. A principal característica desta ferramenta é que, ao contrário das tabelas de

contingência, a probabilidade de se encontrar um resultado incorreto é estimada individualmente, pois a probabilidade condicional é calculada para cada amostra analisada. Do ponto de vista analítico, as desvantagens do método são a complexidade da nomenclatura e a dificuldade de quantificação dos diferentes valores das probabilidades (Trullols *et al.*, 2004; Gondim *et al.*, 2011).

As tabelas de contingência tratam as análises qualitativas com base nos cálculos de probabilidade. O formato mais simples e utilizado são as tabelas que utilizam a classificação em duas categorias: positivo ou negativo, acima ou abaixo do nível de concentração específica. Em seguida, os resultados do método qualitativo são comparados com os resultados obtidos com um método analítico referencial. Uma das principais características desta abordagem é fornecer uma abordagem geral de como o método é executado, mas não dá informação individual de probabilidade de erro para cada amostra. Nesta ferramenta, assume-se que a amostra desconhecida tem o mesmo comportamento estatístico que as amostras utilizadas para a construção da tabela de contingência. A principal desvantagem das tabelas é que a capacidade do quadro de contingência depende do número total de amostras utilizadas no delineamento experimental e analisadas tanto pelo método qualitativo quanto pelo método referencial. Uma das vantagens mais importantes das tabelas de contingência é que essas podem ser facilmente aplicáveis aos vários tipos de bioensaios existentes, como imunológicos, microbiológicos, clínicos e bioquímicos (Trullols *et al.*, 2004; Gondim *et al.*, 2011).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN-ORIOLO, G.A.; LAWTON, L.A. (2006). **The detection and quantification of cyanobacterial toxins in water using the brine shrimp (*Artemia salina*) assay.** West African Journal Applied Ecology, v.9, p.16-18

ALBUQUERQUE JUNIOR, E.C.; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. (2006). **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, p.1-9.

AL-TEBRINEH, J.; GEHRINGER, M.M.; AKCAALAN, R.; NEILAN, B.A. (2011). **A new quantitative PCR assay for the detection of hepatotoxigenic cyanobacteria.** Toxicon. p.1-9.

ARAOZ, R.; MOLGO, J.; MARSAC, N.T. (2010). **Neurotoxic cyanobacterial toxins.** Toxicon. v.56. p.813.828.

AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. (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.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.; LAU, S.; SHAW, G.; EAGLESHAM, G. (2002). **Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru Brazil.** Toxicology, v. 181-182, p. 441-446.

BECK, C.; KNOOP, H.; ANMANN, I.M.; STEUER, R. (2012). **The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms.** BMC Genomics, V.13, n.56, p.1-17.

BELL, S.G., CODD, G.A. (1994). **Cyanobacterial toxins and human health.** Review Medical Microbiology, v.5, p.256-264.

BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J.; GORHAM, P.R. (1959). **Isolation and identification of the past-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1.** Canada Journal Biochemistry Physiology. v.37. p.453-471.

BOUVY, M.; MOLICA, R.; DE OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B. (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 (2003a). **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15p.

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

Brasil (2004). **Portaria N°518/2004, de 25 de março de 2004**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diário Oficial da União. Brasília, 28p.

Brasil (2005). **Resolução CONAMA nº 357, de 17 março de 2005**. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União. Brasília.

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

Brasil (2011a). **Portaria N°2.914/2011, de 12 de dezembro de 2011**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diário Oficial da União. Brasília, 34p.

Brasil (2011b). **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011**. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União. Brasília.

BRITAIN, S; MOHAMED, Z.A.; WANG, J.; LEHMANN, V.K.B.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHART, K.L. (2000). **Isolation and characterization of microcystin from a Nile River strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont**. Toxicon. v. 38. p. 1759-1771.

CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. (2006). **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos, SP: Ed.RiMa, 109p.

CAMARGO, J.A.; ALONSO, A. (2006). **Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment**. Environment International, v.32, p.831-849.

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

CARMICHAEL, W.W. (1994). **The toxins of Cyanobacteria**. *Scientific American*. v.270. n.1. p.78-86.

CARNEIRO, T.G., LEITE, F. (2007). **Cianobactérias e suas Toxinas**. *Revista Analytica*, v.32, 1p.36-41.

CHEN, H.; BURKE, J.M.; PREPAS, E.E. (2011). **Cyanobacterial toxins in fresh Waters**. *Encyclopedia of Environmental Health*, p.860-871.

CHORUS, I. (2005). **Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries**. Federal Environmental Agency. Berlin, Alemanha.

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

CODD, G.A. (2000). **Cyanobacterial toxins, the perception of water quality and the prioritization of eutrophication control**. *Ecology Engenering*. v.16. p.51-60.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. (2005). **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection**. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v.203. p.264-272.

CONLEY, D.J.; PEAERL, H.W.; HOWARTH, R.W.; BOESCH, D.F.; SEITZINGER, S.P.; HAVENS, K.E.; LANCELOT, C.; Likens, G.E. (2009). **Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus**. *Science*, v.323, p.1014-1015.

COSTA, I. (2003). **Ecotoxicologia de cianobactérias em um reservatório eutrofizado do semiárido nordestino brasileiro**. 179p. Tese (Doutorado) – UFSCAR, São Carlos, 2003.

DAHLMANN, J.; BUDAKOWSKI, W.R.; LUCKAS, B. (2003). **Liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and**

lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. Journal of Chromatography A. v.994. p.45-57.

DEBERDT, G.L.B.; NETO, R.C.; AGUJARO, L.F. (2004). **Florações de cianobactérias e sua inserção na legislação brasileira.** Secretaria de Vigilância e Saúde. Ministério da Saúde. Brasil.

DIAS, E.; ANDRADEA, M.; ALVERCA, E.; PEREIRA, P.; BATOREU, M.C.C.; JORDANB, P.; SILVA, M.J. (2009). **Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from M. aeruginosa on a kidney cell line.** Toxicon. v.53, n.2, p.487-495.

DITTMANN, E.; BORNER, T. (2005). **Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment - lessons from biosynthesis genes.** Toxicology Applied Pharmacology. v.203. p.192-200.

DOKULIL, M.T.; TEUBNER, K. (2000). **Cyanobacterial dominance in lakes.** Hydrobiology, v.438, n.1/3, p.1-12.

DOMINGOS, P.; RUBIM, T.K.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAELI, W.W. (1998). **First report of Microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply.** Environmental Toxicology. v.14. p.31-35.

DORR, F.A.; PINTO, E.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (2010). **Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence toxicity and toxicological assays.** Toxicon. v.56. p.1427-1256.

ELLISON, S.L.R.; FEARN, T. (2005). **Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology.** Trends Analytical Chemistry, v.24, n.6, p.468-476.

ESTEVEZ, F. (1988). **Fundamentos de limnologia.** Rio de Janeiro: Interciência; FINEP.

FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O.R. (1994). **Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) Microcystis aeruginosa water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment.** Environmental Toxicology Water Quality Journal. 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.** Foundation for Water Research, Marlow, England.

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.S.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. (2010). **A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a Daphnia acute toxicity test.** Environmental Pollution, v.158, p.2084-2093.

FIGUEREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. (2004). **Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v.59. p.151-163.

GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G., SOUZA, S.V.C. (2011). **Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v.70, n.4, p.443-447.

GRAHAM, J.L. (2007). **Harmful Algal Blooms.** Science for a changing world. U.S. Department of the Interior. U.S. Geological Survey.

HARADA, K.I.; TSUJI, K. (1998). **Persistence and Decomposition of Hepatotoxic Microcystins Produced by Cyanobacteria in Natural Environment.** Toxin Reviews. v17. n.3. p.384-403.

HARADA, K.I., KONDO, F., LAWTON, L. (1999). **Laboratory analysis of cyanotoxins.** 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.

HAWSER, S.P.; CODD, G.A.; CAPONE, D.G. (1991). **A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium Trichodesmium.** Toxicon. v.29. n.3. p.277-278.

HERESZTYN, T.; NICHOLSON, B.C. (2001). **Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay.** Water Research. v.35. n.13. p.3049-3056.

HUDNELL, H.K. (2010) **The state of U.S. freshwater harmful algal blooms assessments, policy and legislation.** Toxicon. v.55. p.1024-1034.

HUSZAR, V. L. M. ; SILVA, L.H.S.; DOMINGOS, P.; MARINHO, M.; SANT'ANNA, C.L. (2000). **Cyanoprokaryota assemblages in the eighth productive tropical Brazilian waters.** Hydrobiologia, Dordrecht, v.424, n.1-3, p.67-77.

HYENSTRAND, P. (1999). **Factors influencing the success of pelagic cyanobacteria.** 50p. Ph.D.Thesis – Uppsala University, Uppsala, 1999.

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.

JARDIM, F.A. (1999). **Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA-MG, Minas Gerais.** 104p. Dissertação (Mestrado) – UFMG, Belo Horizonte, 1999.

KONST, H.; MCKERCHER, P.D.; GORHAM, P.R.; ROBERTSON, A.; HOWELL, J. (1965). **Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals.** Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science. v.29. p.221–228.

KOTAK, B.G., LAM, A.K-Y., PREPAS, E.E., KENEFICK, S.L., HRUDEY, S.E. (1995). **Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes.** Journal of Phycology, v.31, n.1, p.148-163.

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.; CHAMBERS, H. ; EDWARDS, C.; NWAOPARA, A.A.; HEALY, M. (2010). **Rapid detection of microcystin in cells and water.** Toxicon. v.55. p.973-978.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. (1990). **Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants.** FEBS Letters. v.264. p.187-192.

MAGALHÃES, A.B.S.; AGUIAR, R.M.; MAGALHÃES, M. A. (2006). **Isolamento de cianobactérias potencialmente tóxicas nos pontos de captação de água para consumo humano no município de Viçosa - Minas Gerais - Brasil.** XXX - Congreso de la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Montevideo, p 1-8.

MARTINS, C.F. (2010). **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória.** Dissertação (Mestrado) – Engenharia Ambiental, UFES, Vitória.

MATSUHIMA, R.; YOSHIZAWA, S.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; FURUSAWA, M.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (1990) ***In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts.** Biochemistry and biophysical Research Communication. v.171. p.867-874.

MATTHIENSEN, A., YUNES, J.S., COOD, G.A. (1999). **Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos, RS.** Revista Brasileira de Biologia, v.59, n.2, p.1-15.

MCELHINEY, J., LAWTON, L.A. (2005). **Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins.** Toxicology and Applied Pharmacology, v.203, p.219– 230.

MEKEBRI, A.; BLONDINA, G.J.; CRANE, D.B. (2009). **Method validation of microcystin in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. v.1216. p.3147-3155.

METCALF, J.S.; BELL, S.G.; CODD, G.A. (2001). **Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria.** Applied and Environmental Microbiology, v.67, p.904-909.

METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A.; RESSELER, J.; GERBERSDORF, S.; PFLUGMACHER, S.; CODD, G.A. (2002). **Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR.** Journal of Water Supply Research Technology Aquatic, v.51, n.3, p.145-151.

MEREL, S.; CLEMENT, M., THOMAS, O. (2010). **State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine.** *Toxicon*. v.55. p.677-691.

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.

MOUNTFORT, D.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. (2005). **Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS.** *Toxicon*. v.45. p.199-206.

NASCIMENTO, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (1999) **Changes in cellular component in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios – an ecophysiological study.** *Environmental Toxicology*. v.14. n.1. p.37-44.

NEILAN, B.A.; DITTMANN, E.; ROUHIAINEN, L.; BASS, R.A.; SCHAUB, V.; SIVONEN, K.; BORNER, T. (1999). **Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria.** *Journal Bacteriology*. v.181. p.4089-4097.

NOBRE A.C.L., JORGE M.C.M., MENEZES D.B., FONTELES M.C., MONTEIRO H.S.A. (1999) **Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney.** *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, v.32, p.985-988.

NOBRE, M.M.Z.A. (1997). **Detecção de toxinas (microcistinas) produzidas por cianobactérias (algas azuis) em represas para abastecimento público, pelo método de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) e identificação química.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 154p.

NOGUEIRA, M.G. (1996). **Composição, abundância, dominância e distribuição espacial (horizontal e vertical) das comunidades fitoplanctônica e zooplanctônica e dos fatores físico-químicos da represa de Jurumirim, Rio Paranapanema – SP.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 439p.

O'NEIL, J.M.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; GOBLER, C.J. (2012). **The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change.** Harmful Algae, v.14, p.313-334.

OEHRLE, S.A.; SOUTHWELL, B.; WESTRICK, J. (2010). **Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.** Toxicon, v.55, p.965-972.

OUELLETTE, A.J.A.; WILHELM, S.W. (2003). **Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox.** Front Ecology Environmental. v.1. p.359-366.

PEAERL, H.W. (1987). **Dynamics of blue green algal (Microcystis aeruginosa) blooms in the lower Neuse River, North Carolina: causative factors and potential controls.** Water Resources Research Institute of the University of North Carolina.

PEARSON, L.; NEILAN, B.A. (2008). **The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk.** Current Opinion in Biotechnology. v.19. p.281-288.

PURDIE, E.L.; YOUNG, F.M.; MENZEL, D.; CODD, G.A. (2009). **A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase.** Toxicon. p.1-4.

PUSCUNER, B.; HUMBERT, J.F. (2007). **Chapter 59 – Cyanobacterial (blue-green algae) toxins** in Veterinary Toxicology, Edited by Ramesh C. Gupta. p.714-724.

RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONEN, K.S., LATHI, K. (2002). **Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods.** Analytica Chimica Acta. n.466, p.213-231.

RASTOGI, R.; SINHA, R.P. (2009). **Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites.** Biotechnology Advances. v.27. p.521-539.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. (2004). **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. v.27, n.5, p.771-780.

RIVASSEAU, C., RACAUD, P., DEGUIN, A., HENNION, M-C. (1999). **Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples**. Analytica Chimica Acta, v.394, p.243-257.

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.

SANGOLKAR L.N.; MASKE, S.S.; MUTHAL, P.L.; KASHYAP, S.M.; CHAKRABARTI, T. (2010). **Isolation and characterization of microcystin producing Microcystis from Central Indian water bloom**. Harmful Algae, v.8. p.674–684.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. (2000). **Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil**. Nova Hedwigia, Weinheim, v.71, n.3/4, p.359-385.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R., DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. (2008) **Review of toxic Cyanobacteria in Brazil**. Algological Studies, Stuttgart, v. 126, p. 215-265.

SILVEIRA, M.P. (2004). **Aplicação do Biomonitoramento para Avaliação da Qualidade das Águas dos Rios**. Embrapa - Documentos36. ISSN 1515-4691.

SIRQUEIRA, D.B.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. (2007). **Cianobactérias de águas doce e saúde pública: uma revisão**. Universitas Ciência da Saúde. v.3. n.1. p.109-127.

SIVONEN, K.; NIEMELA, S.I.; NIEMI, R.M.; LEPISTO, L.; LUOMA, T.H.; RASAMEN, L.A. (1990) **Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters**. Hydrobiologia. v.190. p.267-275.

SIVONEN, K. (1996). **Cyanobacterial toxins and toxin production**. Phycologia. v.35. p.12-24.

SIVONEN, K., JONES, G. (1999). **Cyanobacterial toxins**. In: Chorus, I.& Bartram, J. (ed.). **Toxic cyanobacteria in water**. London: E & FN Spon., p.41-111.

SMITH, V.H.; SCHINDLER, D.W. (2009). **Eutrophication science: where do we go from here?** Trends in Ecology and Evolution. v.24. n.4. p.201-207.

TALAMONI, J.L.B. (1995). **Estudo comparativo das comunidades planctônicas de lagos de diferentes graus de trofia e uma análise do efeito Microcystis aeruginosa (cyanophyceae) sobre algumas espécies de microcrustáceos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 305p.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S. & HAGE, E. (1993). **Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil**. Bulletin of PAHO. v.27. n.3. p.244-253.

TOTTH, G.L, PADISAK, J. (1986). **Meteorological factors affecting the bloom of Anabaenopsis raciborskii Wools. (cyanophyta: hormogonales) in the shallow lake Balaton, Hungary**. Journal of Plankton Research, v.8, n.2, p.353-363.

TOWNSEND, S.A., LONG-VAN, J.T., BOLAND, K.T. (1996). **Retention time as a primary determination of colors and light attenuation in two tropical Australian reservoirs**. Freshwater Biology, v.36, n.1, p.57-69.

TRIANI, T.; TSIMELI, K.; KALOUDIS, T.; THANASSOULIAS, N.; LYTRAS, E.; HISKIA, A. (2010). **Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters**. Toxicon, v.55, p.979-989.

TRULLOLS, E.; RUISANCHEZ, I.; RIUS, F.X. (2004). **Validation of qualitative analytical methods**. Trends in Analytical Chemistry, v.23, n.2, p.137-145.

VAN den HOEK, C.; MANN, N.H.; JAHNS, H.M. (1995) **Algae, An introduction to phycology**. Cambridge University Press.

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, USP, São Paulo.

WANG, J.; PANG, X.; GE, F.; MA, Z. (2007). **An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China.** *Toxicon*, v.49, n.8, p.1120-1128.

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

WHITTON, B.A. (1999). **Perspective on the use of phototrophs to monitor nutrients in running waters.** *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* v.9. p.545-549.

WOOD, S.A.; DIETRICH, D.R.; CARY, S.C.; HAMILTON, D.P. (2012). **Increasing Microcystis cell density enhances microcystin synthesis: a mesocosm study.** *Inland Waters*, v.2, p.17-22.

YANG, X., WU, X. HAO, H., HE, Z. (2008). **Mechanisms and assessment of water eutrophication.** *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v.9, n.3, p.197-209.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. (1995) **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins—a resource guide.** Denver, Colorado, American Water Works Association Research Foundation, 229 p.

YOSHIZAWA, S.; MATSUHIMA, R.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (1990). **Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity.** *Journal Cancer Resarch Clinical Oncology.* v.116. p.609-614.

YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A.; PARISE, M.; SALOMON, P.S.; RAGGET, S.L.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A. (1998a). **Microcystis aeruginosa Growth Stages and the Occurrence of MCs in Patos Lagoon, Southern Brazil.** *Hamful Algae.* Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO. p.18-21.

YUNES, J.S., MATTIENSEN, A., PARISE, M., SALOMON, P.S., RAGGETT S.L., BEATTIE, K.A., CODD, G.A. (1998b). **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.

ZURAWELL, R.W.; Chen, H.; Burke, J.M.; Prepas, E.E. (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.



ARTIGO I

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO LIVRE DE ACETONITRILA PARA
ANÁLISE DE MICROCISTINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)***

RESUMO

Florações de cianobactérias apresentam risco à saúde pública, devido à presença de cianotoxinas, sendo mais frequentes as microcistinas. Técnicas cromatográficas líquidas para quantificar microcistinas, invariavelmente utilizam acetonitrila como componente orgânico da fase móvel. Crises mundiais têm afetado o preço e a disponibilidade deste solvente que, associada à sua toxicidade, incentiva a validação de métodos de análise de microcistinas, livres de acetonitrila. A validação do método utilizando metanol como componente orgânico atendeu a amostras de águas de diferentes origens, apresentando limites de detecção entre 0,17 e 0,25 µg/L e de quantificação entre 0,55 e 0,82 µg/L, para as variantes de microcistina (-RR, -YR, -LR e -LA).

PALAVRAS-CHAVE: Detecção microcistina, acetonitrila e metanol.

* Trabalho submetido na revista Química Nova (ISSN 1678-7064), recebido em 8/11/12; aceito em 25/4/13; publicado na web em 13/6/13.

**VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHOD FREE OF ACETONITRILE FOR
MICROCYSTIN ANALYSIS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY (HPLC)**

ABSTRACT

Blooms of cyanobacteria represent risk to public health due their cyanotoxins such as microcystins. Liquid chromatography techniques to separate and quantify microcystins invariably use the acetonitrile as organic component of the mobile phase. The price and availability of acetonitrile together its elevated toxicity encourages the validation of the methods of analysis of microcystin free acetonitrile. In this work, the organic component utilized was the methanol. The validation was performed with different environmental water samples. The method showed limits of detection between 0.17 and 0.25 µg/L and quantification between 0.55 and 0.82 µg/L for the microcystin variants: -RR, -YR, -LR, -LA.

Keywords: Microcystin, acetonitrile and methanol

1. INTRODUÇÃO

A modificação de ambientes aquáticos pelo acúmulo de nutrientes produzidos nos diferentes processos antropogênicos é a principal causa de eutrofização em rios e lagos em todo o mundo. A eutrofização é apontada como sendo um dos principais fatores responsável pelo aumento das florações de cianobactérias. Essas florações promovem a deterioração da qualidade da água e constituem um sério risco à saúde pública.^{1,2} As cianobactérias produzem metabólitos tóxicos denominados cianotoxinas que podem ser letais para os animais selvagens, domésticos e seres humanos. As cianotoxinas podem causar graves irritações na pele, além de efeitos neurotóxicos e hepatóxicos.^{3,4}

As florações de cianobactérias nem sempre são compostas de espécies tóxicas, entretanto 50 a 70 % delas apresentam toxicidade. A ocorrência de florações tóxicas não é apenas um fenômeno local, regional ou específico de um só país, mas de proporções globais.⁵⁻⁹ As ocorrências de florações e o controle de suas toxinas em águas de abastecimento descrevem representantes do gênero *Microcystis* e a cianotoxina microcistina como os mais comuns em florações no Brasil e no mundo.¹⁰⁻¹³ Portanto, nos estudos com florações, a microcistina é utilizada como padrão para detectar e quantificar a presença de cianotoxinas. Seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), a legislação brasileira estabeleceu como concentração máxima de microcistina permitida em águas destinadas ao abastecimento público, o valor de 1,0 µg/L.¹⁴⁻¹⁶ As microcistinas são peptídeos cíclicos compostos por sete resíduos de aminoácidos (Figura I.1). A estrutura cíclica proporciona às microcistinas uma extrema estabilidade em água e tolerância a mudanças radicais de pH e temperatura, mantendo a toxicidade das microcistinas mesmo após a fervura.³

Nas posições 2 e 4 da estrutura, são encontrados resíduos de L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das diferentes variantes de microcistinas.¹⁷ A separação e quantificação destas variantes podem ser realizadas por técnicas analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseada na diferente hidrofobicidade destes resíduos de L-aminoácidos. Invariavelmente, as técnicas cromatográficas de análises de microcistinas utilizam fase reversa de separação (CLAE-FR) e o solvente acetonitrila (ACN) como componente orgânico da fase móvel.¹⁸⁻²⁰

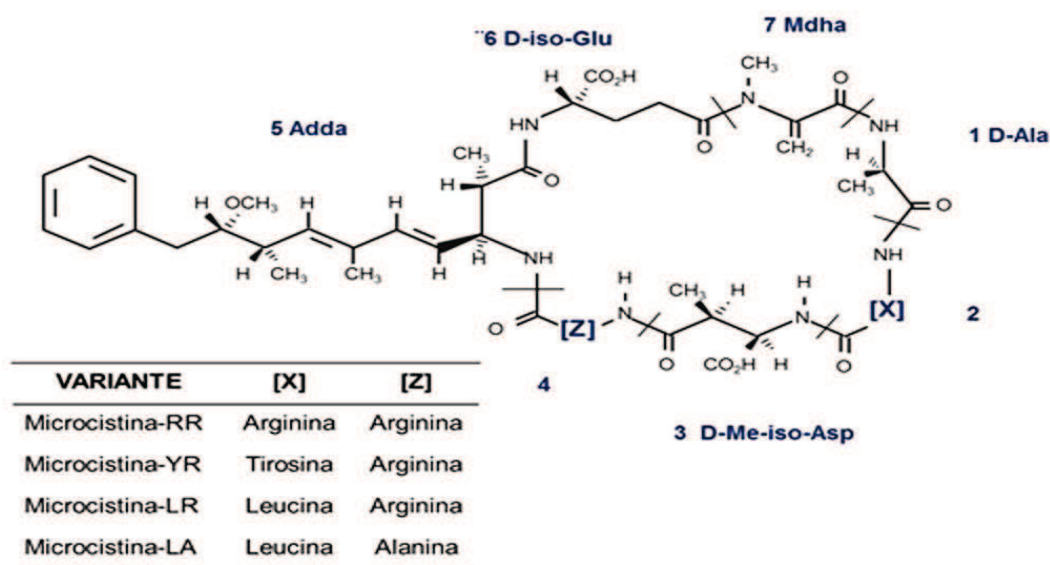


Figura I.1 Estrutura geral de microcistinas e as principais variantes detectadas em florações tóxicas. [X] e [Z] representam os resíduos de L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das diferentes variantes.

A ACN é um subproduto da produção de fibras e resinas de acrílico, produtos de uso predominante na fabricação de automóveis, eletrodomésticos e eletrônicos. No final de 2008, a disponibilidade de ACN diminuiu em todo o mundo por diferentes razões, principalmente devido à crise econômica global que reduziu a demanda por produtos a base destas fibras e resinas. O preço da ACN chegou a custar cinco vezes mais na Europa, devido uma redução de 80 % na sua oferta.²¹ Embora seja difícil uma nova combinação de fatores capaz de promover uma alta

redução no fornecimento de ACN como ocorreu em 2008, o volume deste solvente é gerado devido a processos industriais que estão sujeitos a crises e retrações mundiais. Além disso, outra preocupação em relação ao uso de ACN é o seu alto potencial toxicológico. A ACN é prontamente absorvida quando em contato com trato gastrointestinal, pele e pulmões, espalhando-se rapidamente por todo corpo. A intoxicação por ACN pode causar graves efeitos sistêmicos devido a sua degradação em cianeto, um potente inibidor da cadeia transportadora de elétrons.²²

Nas análises cromatográficas, diferentes modificadores podem ser utilizados em alternativa ao uso da ACN. A seletividade da técnica de CLAE-FR é influenciada pelo tipo de modificador orgânico da fase móvel, isto porque o mecanismo de retenção do analito na fase estacionária depende do tipo de modificador utilizado.²³ Além do metanol (MeOH), outros solventes tais como etanol, isopropanol e acetona podem ser utilizados como modificadores orgânicos. Entretanto a alta absorção na região UV-VIS e a necessidade de pressões mais elevadas dificultam a ampla utilização destes solventes.²⁴ O etanol merece destaque por se tratar de um solvente muito menos tóxico quando comparado à aqueles mais utilizados tais como metanol e acetonitrila.²⁵ Porém o aumento da viscosidade quando dissolvidos em água, dificulta a aplicação do etanol e metanol principalmente em sistemas cromatográficos mais antigos, os quais apresentam sistemas de bombas mais sensíveis à variação de pressão.²⁶

Nas técnicas de CLAE-FR, o menor caráter hidrofóbico do MeOH comparado à ACN exige um aumento de sua concentração na fase móvel. Além disso, a sua menor viscosidade em soluções aquosas é responsável por um aumento na pressão do sistema. Porém apesar de pequenas alterações com relação à linha

de base e no tempo de retenção dos analitos avaliados, a utilização do MeOH como modificador orgânico nas técnicas de CLAE-FR demonstra eficiência de separação e seletividade semelhante às técnicas que utilizam ACN.²³ O MeOH também apresenta risco potencial para a saúde humana, desenvolvendo efeitos colaterais semelhantes à ACN, porém os níveis de exposição ocupacional e concentração letal é cerca de duas vezes maior (1,5 a 2,0 g/m³.h). Os efeitos crônicos de inalação também são menores. O valor limite de exposição ocupacional recomendado para turnos de 8 horas é 0,26 g/m³ de MeOH dissolvido no ar. Este valor é mais do que três vezes a concentração média de ACN recomendada para se evitar qualquer efeito tóxico.²⁷

Nas análises de microcistinas, o MeOH é o principal solvente utilizado na extração da toxina a partir de células de cianobactérias. O desenvolvimento de técnicas cromatográficas de separação de microcistinas utilizando o MeOH como composto orgânico da fase móvel além de reduzir custos e toxicidade em relação ao uso de ACN, ainda diminui o grau de limpeza necessária para remoção de possíveis contaminantes presentes na amostra.²¹ Portanto, o objetivo deste estudo foi padronizar e validar um método de separação e quantificação de microcistinas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e metanol como componente orgânico da fase móvel em alternativa ao uso da acetonitrila.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

O metanol grau CLAE utilizado foi da marca Tedia (Tedia Company, Fairfield, USA) e o ácido Trifluoracético (TFA) da marca Merck (Darmstadt, Germany). A água utilizada foi obtida no sistema de ultrapurificação da Millipore (Bedford,

USA). Os cartuchos de extração em fase sólida (SPE) da marca Chromabond[®] C18ec (6 mL, 500 mg) foram obtidos da Macherey-Nagel (Duren, Germany). As variantes de microcistinas utilizadas (-RR, -YR, -LR e -LA) foram padrões analíticos para análises ambientais, da marca Sigma (St.Louis, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. PREPARADO DE SOLUÇÕES E AMOSTRAS

A fim de simular a contaminação com microcistinas, 500 mL de amostras ambientais de águas foram fortificadas nas concentrações finais de 0,8; 1,0 e 2,0 µg/L. Estas amostras foram coletadas no lago de Duas Bocas e nos rios Jucu e Santa Maria, principais mananciais utilizados na captação de água para o abastecimento público da região metropolitana de Vitória-ES. Após a fortificação, volumes de 500 mL das amostras foram submetidos à extração em fase sólida por adsorção em cartuchos C18, conforme a norma ISO 20179:2005. Em seguida, o material adsorvido no cartucho foi eluído com 6,0 mL de solução de MeOH:H₂O:TFA (89,9:10:0,1 v/v) e submetido a evaporação a temperatura ambiente. O material foi então ressuspenso com 0,5 mL de solução de MeOH:H₂O (80:20 v/v) para as análises cromatográficas.

2.3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A análise das amostras foi realizada em um sistema de cromatografia da série Shimadzu CBM-20A, equipado com um desgaseificador de solventes DGU-20AS, uma bomba quaternária de gradiente LC-20AT, um injetor automático de amostras SIL-20AHT e um detector de arranjo de diodos SPD-M20A. A coluna cromatográfica utilizada neste estudo foi a coluna analítica Kinetex[™] C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 nm). O comprimento de onda de detecção foi de 238 nm. O

volume de injeção para as análises foi de 50 µL da amostra e a vazão da fase móvel foi de 0,250 mL/min. Em todas as análises, a coluna permaneceu acondicionada à temperatura constante de 37 °C utilizando um módulo aquecedor de coluna da Shimadzu.

A solução de H₂O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) foi utilizada como fase móvel A, enquanto a fase B foi composta por metanol 100 %. O vazão utilizada nas análises foi de 0,250 mL/min. O perfil do gradiente iniciou-se com 100 % da fase móvel A e foi executado de forma isocrática no intervalo de 0 a 1 min. Entre 1 e 3 minutos aplicou-se um gradiente linear de metanol variando a porcentagem da fase móvel B de 0 a 20 %. Entre 3 e 8 minutos o gradiente linear variou de 20 a 40 %. Em seguida, o gradiente linear de 40 a 62 % foi aplicado no intervalo de 8 e 25 minutos. Entre 25 e 25,5 minutos, o gradiente retornou a condição inicial e manteve-se até o re-equilíbrio da coluna. Todas as soluções preparadas para compor as fases móveis foram previamente filtradas e desgaseificadas por 15 minutos em banho de ultrassom (Limpsonic[®], Brasil) antes de serem utilizadas.

2.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

As variantes de microcistinas (Mcyst-RR, -YR, -LR e -LA) foram dissolvidas em solução de MeOH 20 % e a solução padrão de 10 µg/mL foi estocada a -20 °C. A curva analítica foi obtida pela injeção de soluções padrões com concentrações entre 0,2 e 2,0 µg/mL. Os dados foram processados utilizando o *software* LCSolutions (versão 2.1). O coeficiente de correlação, a inclinação e o intercepto da curva padrão, bem como a tabela de análise de variância e os respectivos erros padrões foram calculados para verificar a validação do modelo linear da equação utilizada para padronizar o método de quantificação. Os parâmetros

determinados para a validação do método foram: Especificidade, Linearidade, Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ), Recuperação, Precisão e Robustez. Os parâmetros de desempenho do método foram determinados de acordo com a Resolução nº899/2003 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.²⁸

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Testes de eluição foram realizados para definir a melhor condição analítica para separação e quantificação das diferentes variantes de microcistina (Mcyst). Na Figura I.2 está representado o cromatograma referente à separação de uma amostra contendo as variantes Mcyst-RR, -YR, -LR e LA na concentração final de 1,0 µg/mL. O método permitiu a eluição distinta de cada variante com o tempo de retenção variando entre 22 e 30 minutos (Mcyst-RR: 22,3 min; Mcyst-YR: 24,3 min; Mcyst-LR: 25,7 min e Mcyst-LA: 29,7 min).

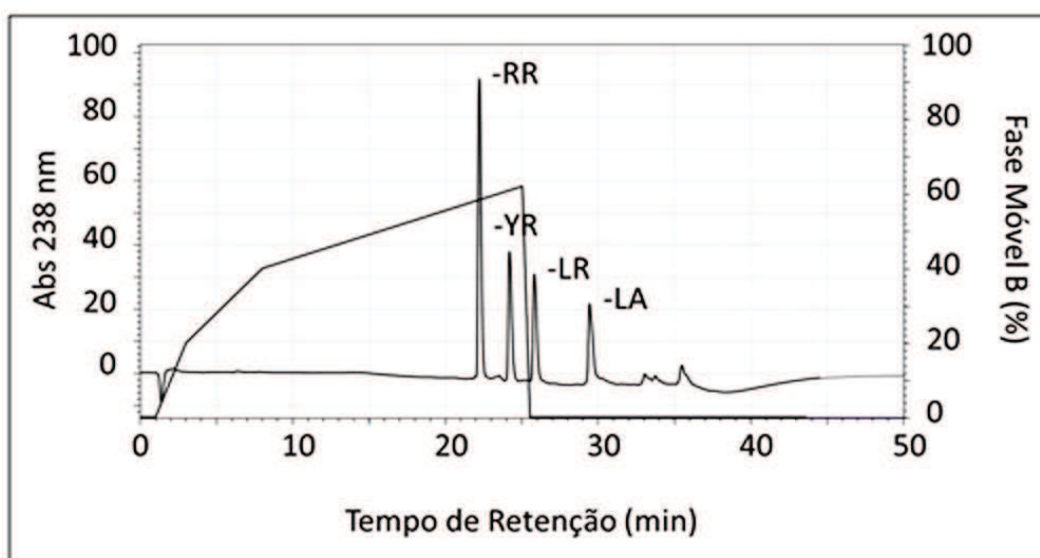


Figura I.2 Perfil cromatográfico da amostra padrão contendo as variantes Mcyst-RR (22,3 min), Mcyst-YR (24,3 min), Mcyst-LR (25,7 min) e Mcyst-LA (29,7 min), na concentração final de 1,0 µg/mL. As soluções de H₂O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) e MeOH 100% foram utilizadas como fase móvel A e B, respectivamente. A taxa de fluxo foi de 0,250 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 238 nm.

A alta definição e elevada intensidade dos picos referentes às variantes demonstram a eficiência e seletividade do método. Apesar do elevado tempo de análise, o método mostra-se favorável, pois com o vazão de 0,250 mL/min, a análise requer uma baixa quantidade de solvente. Durante a padronização, a redução do tempo de eluição principalmente nos primeiros 20 minutos foi avaliada, porém o aumento da vazão para 0,500 mL/min provocou a superposição dos picos, impedindo a separação das variantes. Além disso, durante a avaliação das amostras, nos primeiros 20 minutos são eluídos diversos interferentes. A diminuição deste tempo inicial, como o aumento vazão demonstrou a influência destes interferentes na eluição das variantes, reduzindo a eficiência de separação das microcistinas.

A especificidade de um método é a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.²⁸ Sendo assim, o teste de especificidade foi realizado comparando-se uma amostra ambiental de água fortificada e não fortificada com uma amostra padrão contendo as variantes de Mcyst-RR, -YR, -LR e -LA na concentração final de 1,0 µg/L. A amostra ambiental foi fortificada com o padrão de Mcyst-LR na concentração final de 1,0 µg/L. Em seguida, as amostras ambientais foram concentradas e injetadas no cromatógrafo a líquido e seus perfis de eluição foram comparados com o perfil obtido com a amostra contendo as variantes de Mcyst. A sobreposição dos perfis cromatográficos (Figura 1.3) demonstra a ausência de interferência de compostos da matriz capaz de prejudicar a determinação das variantes. Quando se compara os resultados de separação da amostra fortificada com a amostra do padrão de Mcyst observa-se que o tempo de retenção da variante Mcyst-LR não se altera, mesmo na presença

das impurezas presentes na amostra. Esta capacidade da técnica em manter a resposta analítica da variante de Mcyst-LR na amostra fortificada semelhante à resposta obtida com o padrão, demonstra a especificidade do método.

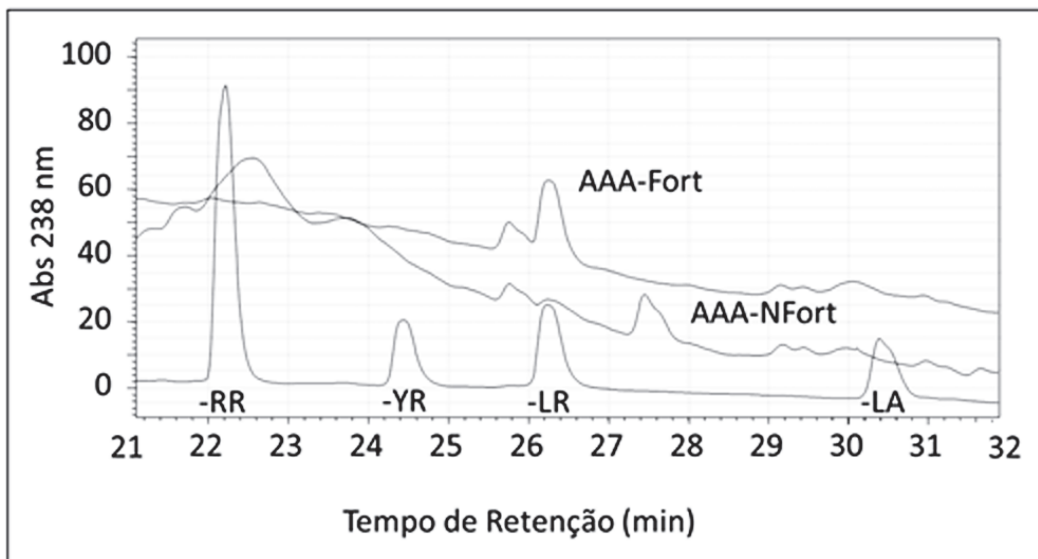


Figura I.3 Sobreposição dos perfis cromatográficos referentes ao padrão de Mcyst-LR em solução de H₂O:MeOH (80:20 v/v), amostra ambiental de água não fortificada (AAA-NFort) e fortificada (AAA-Fort) com o padrão de Mcyst-LR. As soluções de H₂O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) e MeOH 100% foram utilizadas como fase móvel A e B, respectivamente. A taxa de fluxo foi de 0,250 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 238 nm.

A linearidade da resposta de detecção das variantes de Mcyst pela técnica cromatográfica foi avaliada pela relação entre a concentração injetada e a área do pico de resposta. A faixa de concentração avaliada foi de 0,20 a 2,0 µg/mL, equivalente a 20 e 200 % do valor máximo de microcistina (1,0 µg/mL) permitido pela legislação brasileira em amostras de águas para abastecimento público. A linearidade foi avaliada por sete repetições de cada nível de concentração e a curva analítica foi estabelecida para cada variante de Mcyst (Tabela I.1).

A técnica mostrou-se capaz de correlacionar diretamente os valores da concentração de Mcyst na amostra com a área do pico de resposta para todas as variantes avaliadas. A resposta linear da técnica foi satisfatória, apresentando coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99. Valores de coeficientes

semelhantes também foram observados em diferentes estudos para determinação de Mcyst utilizando técnicas de CLAE com ACN como modificador orgânico. Em separações associadas ao sistema de detecção por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) observou-se a linearidade no intervalo de concentração de Mcyst-LR de 0,03 a 2,00 µg/mL, com o coeficiente de correlação de 0,9996.²⁰ Estudo de separação da variante Mcyst-LR associada ao sistema de detecção por espectrofotometria UV/Visível apresentou linearidade no intervalo de 0,05 a 5,00 µg/mL, com valor de (r) igual a 0,9926.²⁹ Já quando a separação de cinco variantes de Mcyst (-RR, -LR, -LY, -LW e -LF) foi associada ao sistema de detecção por arranjos de diodos, os valores de (r) variaram entre 0,9630 e 1,000, para o intervalo de linearidade de 0 a 10,00 µg/mL.³⁰ A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) um valor acima de 0,90.³⁰

Tabela I.1. Parâmetros de linearidade da curva analítica ($y = ax + \beta$) obtida para as variantes de microcistina.

Concentração µg/mL	Área média Mcyst-RR	Área média Mcyst-YR	Área média Mcyst-LR	Área média Mcyst-LA
0.2	141299	57087	56739	49485
0.4	469009	214089	291727	194825
0.8	979914	453304	516492	405162
1.0	1468769	670218	758850	552474
2.0	3136349	1620747	1641211	984799
Intercepto com eixo y (β)	-231785	-165041	-111312	-14140
Inclinação da reta (α)	1671424	872875	868541	513055
Coefficiente de correlação (r)	0,9960	0,9920	0,9950	0,9900

A robustez de uma técnica analítica é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e aleatórias variações dos parâmetros analíticos otimizados. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o pH da fase móvel, a

temperatura de acondicionamento da coluna ou vazão da fase móvel. Na validação da técnica em questão, o teste de robustez foi avaliado variando-se as temperaturas de acondicionamento da coluna e as concentrações de ácido trifluoracético (TFA) na fase móvel aquosa. As temperaturas avaliadas foram de 31, 34 e 37 °C, já as concentrações de TFA adicionada à fase aquosa foram 0; 0,01; 0,05 e 0,10 % (v/v). As demais condições otimizadas foram fixadas (vazão 0,250 mL/min e a fase móvel orgânica MeOH 100 %).

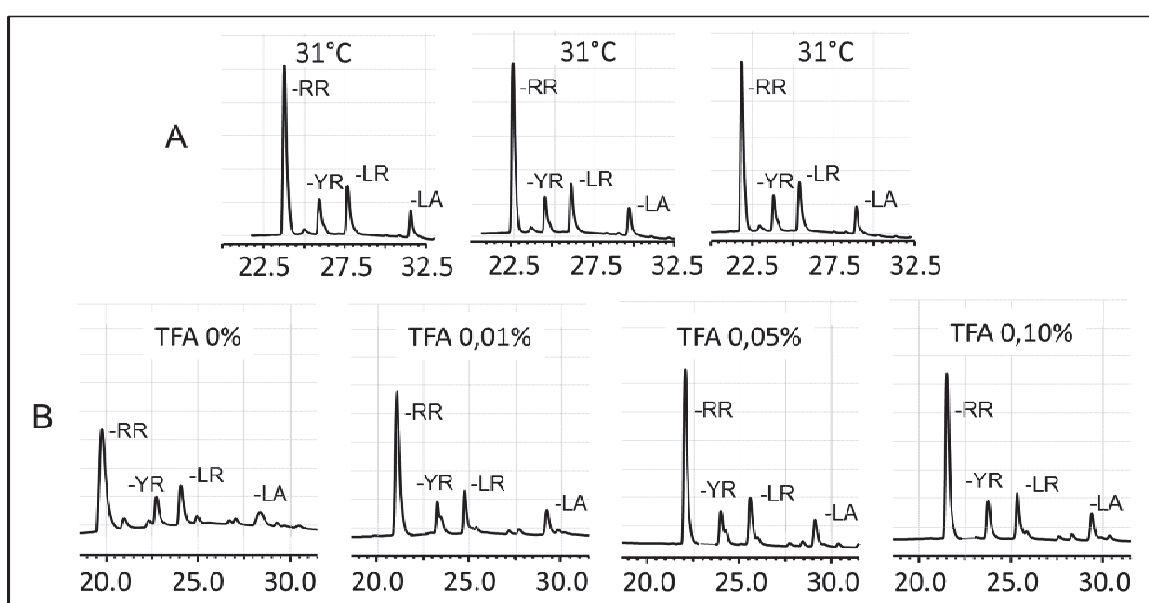


Figura 1.4 Perfis cromatográficos referentes ao padrão de Mcyst-RR, Mcyst-YR, Mcyst-LR e Mcyst-LA em solução de H₂O:MeOH (80:20 v/v), na concentração de 1,0 µg/mL. (A) Análises realizadas com diferentes temperaturas de acondicionamento da coluna (31, 34 e 37°C). (B) Análises realizadas diferentes concentrações de ácido trifluoracético adicionado à fase móvel aquosa (0; 0,01; 0,05 e 0,10% v/v).

Os resultados demonstraram robustez da técnica no intervalo de temperatura avaliada (Figura 1.4). Em relação à variação da temperatura de acondicionamento das colunas, as resoluções cromatográficas entre as variantes de Mcyst não apresentaram diferenças, apenas pequenas variações no tempo de retenção. A temperatura de 37 °C apresentou o menor tempo de retenção e foi utilizada para o acondicionamento da coluna nas demais análises de validação. Além do menor tempo de retenção, a temperatura de 37 °C permitiu a execução das análises com

menor pressão no sistema cromatográfico, já que a viscosidade da fase móvel decresce exponencialmente em função da temperatura.³¹ Os resultados dos testes de variação do pH da fase móvel aquosa demonstraram a robustez do técnica com concentrações de TFA de 0,01 a 0,10 % (Figura I.4). A resolução cromatográfica obtida com a fase móvel contendo TFA 0,10 % foi definida como condição ótima para os demais ensaios cromatográficos.

A capacidade do método em detectar pequenas concentrações é expressa pelo Limite de detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ). O método é considerado sensível quando pequenas variações nas concentrações expressam respostas analíticas significativas. Para a determinação de LOD e LOQ do método, soluções foram preparadas com concentrações de 0,80; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/L das variantes de Mcyst-RR, -YR, -LR e -LA. O LOD e LOQ foram calculados a partir dos valores de desvio padrão, do intercepto com o eixo y e o valor médio da inclinação da curva analítica. Estes valores foram calculados utilizando as curvas analíticas obtidas com três repetições para cada nível de concentração. De acordo com os resultados obtidos, o método é capaz de detectar com eficiência as variantes avaliadas a partir da concentração de 0,17µg/L (LOD), valor de LOD observado para Mcyst-RR. Os limites de quantificação (LOQ) variaram entre 0,55 (Mcyst-RR) e 0,82 µg/L (Mcyst-YR) (Tabela I.2). Sistemas de separação de Mcyst utilizando técnicas de CLAE-FR e ACN, como modificador orgânico, quando associado ao sistema de detecção por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*), apresentaram valores de LOD e LOQ de 0,05 e 0,15 µg/mL, para Mcyst-LR.²⁰ Quando o sistema de detecção foi do tipo ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass spectrometry*), a capacidade de detecção foi ainda maior, com o LOD de 0,002

$\mu\text{g/mL}$.³² Embora as técnicas de CLAE-FR utilizando ACN demonstrem menores valores de LOD e LOQ, a técnica utilizando o metanol, aqui validada, mostra-se satisfatória, pois os valores encontrados para LOD e LOQ do método são menores que o valor máximo permitido pela legislação brasileira para detecção de Mcyst em amostras de águas para abastecimento público.

Tabela I.2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) na determinação das variantes de Mcyst-RR, Mcyst-YR, Mcyst-LR e Mcyst-LA, empregando CLAE-FR/PDA.

	Detector PDA	
	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Mcyst-RR	0,17 \pm 0,03	0,55 \pm 0,03
Mcyst-YR	0,25 \pm 0,07	0,82 \pm 0,07
Mcyst-LR	0,21 \pm 0,12	0,70 \pm 0,12
Mcyst-LA	0,22 \pm 0,03	0,75 \pm 0,03

A precisão e a acurácia determina o erro de uma medição analítica e são critérios primários para se avaliar a eficiência da técnica analítica. A precisão define a repetibilidade da técnica e determina o desvio da análise em relação ao resultado obtido. Os testes de repetibilidade do método foram expressos por meio da estimativa do desvio padrão relativos (DPR) de sete de amostras de diferentes corpos d'água da região metropolitana de Vitória-ES (Tabela I.3).

Tabela I.3. Valores de recuperação, média e coeficiente de variação (CV) para diferentes amostras de água fortificadas com microcistina-LR na concentração final de 1,0 $\mu\text{g/L}$.

Repetição	Amostra	Mcyst-LR ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
1°	Lago Duas Bocas	1,0	90,0	90,1	0,1
2°	Lago Duas Bocas	1,0	90,2		
3°	Rio Jucu	1,0	93,6	93,9	0,5
4°	Rio Jucu	1,0	94,2		
5°	Rio Santa Maria	1,0	95,2	96,6	1,4
6°	Rio Santa Maria	1,0	96,6		
7°	Rio Santa Maria	1,0	98,0		

Volumes de 500 mL da amostra de água foram coletados e fortificados com Mcyst-LR, na concentração final de 1,0 µg/L. Em seguida, concentrados em cartuchos de extração tipo SPE e analisadas no sistema de cromatografia líquida. Para técnicas analíticas de separação e quantificação em amostras com pequenas concentrações de impurezas, o DPR de até 20 % é aceitável.³³ No entanto, o guia de validação da ANVISA não permite que valores de DPR sejam superiores a 5 %.²⁸ O valor de DPR entre 0,1 e 1,4 % encontrado para as diferentes amostras de água são inferiores aos valores aceitos, indicando a precisão do método.

Neste trabalho, a precisão do método também foi avaliada por experimentos de recuperação. Isto porque para separar e quantificar variantes de Mcyst em amostras ambientais de água, pela técnica cromatográfica, é necessário uma preparação previa das amostras. Esta preparação visa clarificar e concentrar a amostra antes de ser injetada no cromatógrafo.³⁴ Devido à esta etapa previa, para o processo de validação passa a ser necessário calcular o fator de recuperação para diferentes concentrações de Mcyst. O teste de recuperação foi realizado pela adição da variante de Mcyst-LR em sete amostras de água do rio Jucu. As concentrações utilizadas foram de 0,80; 1,0 e 2,0 µg/L. Estes valores representam respectivamente o ponto médio da curva analítica, o valor máximo permitido pela legislação brasileira e o limite superior da curva. A percentagem de recuperação foi observada entre 98,18 e 106,13 % (Tabela I.4).

A precisão de técnicas analíticas que utilizam tratamento prévio das amostras deve ser avaliada pela percentagem de recuperação, através de ensaios com

amostras fortificadas. Embora seja desejável atingir níveis de recuperação próximos de 100 %, maximizando a sensibilidade da técnica, é provável que níveis de recuperação acima de 70 % não comprometam a integridade da técnica. Um intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos está entre 70 e 120 %.²¹ Portanto, a técnica cromatográfica, empregando fase móvel a base de metanol, aqui validada, prova ser eficiente para a análise de Mcyst em amostras ambientais de água.

Tabela I.4. Valores de recuperação, tempo de retenção, média e coeficiente de variação (CV) para amostras de água do Rio Jucu fortificadas com diferentes concentrações de microcistina-LR (0,8; 1,0 e 2,0 µg/L).

Mcyst-LR µg/L	Recuperação (%)								Média	DPR
	Rep01	Rep02	Rep03	Rep04	Rep05	Rep06	Rep07			
0,8	98,2	99,2	98,6	98,5	98,7	99,1	99,2	98,8	0,4	
1,0	99,5	101,4	101,9	102,2	103,2	104,3	104,9	102,5	1,8	
2,0	99,2	99,6	104,7	104,8	105,1	105,3	106,1	103,5	2,8	

4. CONCLUSÕES

A técnica cromatográfica de CLAE-FR, utilizando MeOH como modificador orgânico da fase móvel, aqui validada, demonstrou seletividade, linearidade e precisão para separar e quantificar as variantes de Mcyst-RR, Mcyst-YR, Mcyst-LR e Mcyst-LA em diferentes tipologias ambientais de água. A extração em fase sólida, tipo SPE, como tratamento prévio das amostras para a determinação de Mcyst, não alterou a precisão do método, que apresentou níveis de recuperação entre 98,18 e 106,13 %. Os valores de LOD entre 0,17 µg/L (Mcyst-RR) e 0,25 µg/L (Mcyst-YR) e os valores de LOQ entre 0,55 µg/L (Mcyst-RR) e 0,82 µg/L (Mcyst-YR), atende os limites internacionais de potabilidade recomendado pela Organização Mundial de Saúde. Portanto, o uso do MeOH se apresenta como uma opção menos tóxica e mais econômica como alternativa a utilização de ACN

como modificador orgânico da fase móvel na separação e quantificação de Mcyst por CLAE-FR.

5. AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos também a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela disposição de toda a estrutura necessária para o desenvolvimento de experimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARNEIRO, T.G., LEITE, F. (2007). **Cianobactérias e suas Toxinas**. *Revista Analytica*, v.32, p.36-41.
2. FULWEILER, R.W.; RABALAIS, N.N.; HEISKANEN, A.S. (2012). **The eutrophication commandments**. *Marine Pollution Bulletin*. v.64, p.1997-1999.
3. SIVONEN, K., JONES, G. (1999). **Cyanobacterial toxins**. In: **Chorus, I.& Bartram, J. (ed.). Toxic cyanobacteria in water**. London: E & FN Spon., p.41-111.
4. YEN, H.K.; LIN, T.F.; LIAO, P.C. (2011). **Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry**. *Toxicon*, v.58, p.209-218.
5. SIVONEN, K.; NIEMELA, S.I.; NIEMI, R.M.; LEPISTO, L.; LUOMA, T.H.; RASAMEN, L.A. (1990) **Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters**. *Hydrobiologia*. v.190. p.267-275.
6. VASCONCELOS, V. M.; PEREIRA, E. (2001). **Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal)**. *Water Research*. v.35. n.5. p.1354-1357.
7. 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.
8. PARL, H.W.; HALL, N.S.; CALANDRINO, E.S. (2011). **Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change**. *Science of the Total Environmental*, v.409, p.1739-1745.
9. O'NEIL, J.M.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; GOBBLER, C.J. (2012). **The rise of harmful cyanobacterial blooms: The potential roles of eutrophication and climate change**. *Harmful Algae*, v.14, p.313-334.

-
10. YUNES, J.S., SALOMON, P.S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K.A., RAGGETT, S.L., CODD, G.A. (1996). **Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil.** Journal of Aquatic Ecosystem Health, v.5, p.223-229.
11. 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, n.2, p.1-15.
12. SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. (2000). **Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil.** Nova Hedwigia, Weinheim, v.71, n.3/4, p.359-385.
13. CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. (2005). **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection.** Toxicology and Applied Pharmacology. v.203. p.264-272.
14. DEBERDT, G.L.B. ; NETO, R.C.; AGUJARO, L.F. (2004). **Florações de cianobactérias e sua inserção na legislação brasileira. Secretaria de Vigilância e Saúde.** Ministério da Saúde. Brasil.
15. 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.
16. 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.
17. CARMICHAEL, W.W. (1994). **The toxins of Cyanobacteria.** Scientific American. v.270. n.1. p.78-86.
18. RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. (2002). **Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods.** Analytica Chinica Acta. n.466, p.213-231.

-
19. MOUNTFORT, D.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. (2005). **Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS.** *Toxicon*. v.45. p.199-206.
20. ALBUQUERQUE JÚNIOR, E.C.; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. (2006). **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, p.1-9.
21. PURDIE, E.L.; YOUNG, F.M.; MENZEL, D.; CODD, G.A. (2009). **A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase.** *Toxicon*. p.1-4.
22. HASHIMOTO, K.; MORIMOTO, K.; DOBSON, S. (1993). **Environmental Health Criteria for Acetonitrile.** World Health Organization Library.
23. RAFFERTY, J.L.; SIEPMANN, J.I.; SCHURE, M.R. (2011) **Mobile phase effects in reversed-phase liquid chromatography: A comparison of acetonitrile/water and methanol/water solvents as studied by molecular simulation.** *Journal of Chromatography A*, v.1218, p.2203–2213.
24. RIBEIRO, R.L.V.; GRESPAN, C.B.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; BRUNS, R.E. (1999). **Optimization through Factorial Planning of the Use of Ethanol : Water as a Mobile Phase for Reversed Phase HPLC.** *High Resolution of Chromatography*, v.22, p.52-54.
25. ARAGÃO, N.M.; VELOSO, M.C.C.; ANDRADE, J.B. (2009). **Efeito da acidez de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada.** *Química Nova*, v.32, p.2476-2486.
26. RIBEIRO, R.L.V.; GRESPAN, C.B.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; BRUNS, R.E. (2004). **Reevaluation of Ethanol as Organic Modifier for Use in HPLC-RP Mobile Phases.** *Journal Brazillian Chemistry Sociaty*, v.15, p.300-306.

-
27. FISHBEIN, L. (1997). **Environmental Health Criteria for Methanol**. World Health Organization Library.
28. BRASIL (2003). 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.
29. SANCHES, S.M.; VIEIRA, E.M.; PRADO, E.L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A.M.M. (2007) **Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico**. Eclética Química, v.32, p.43-48.
30. LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. (1995) **Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters**. Analyst, v. 119, p. 1525-1530.
31. BORGES, E.M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. (2010) **Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa**. Química Nova, v.33, n.4, p.945-953.
32. ZHANG, L.; PING, X.; YANG, Z. (2004) **Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector**. Talanta, v.62, p.193-200
33. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G. ; COLLINS, C.H. ; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. (2004). **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. v.27, n.5, p.771-780.
34. HARADA, K.I., KONDO, F., LAWTON, L. (1999). **Laboratory analysis of cyanotoxins**. 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.



ARTIGO II

VARIANTES DE MICROCISTINAS EM AMOSTRAS SUPERFICIAIS DE ÁGUAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE VITÓRIA-ES, BRASIL

RESUMO

A presença das variantes de microcistinas-LR, -RR, -YR e -LA foi avaliada em 60 amostras de água coletadas em diferentes mananciais superficiais da região metropolitana de Vitória-ES, entre 2011 e 2012. O conteúdo total de Mcyst foi quantificado por CLAE-PDA, sendo detectada a presença de pelo menos uma variante em 57% das amostras. Dentre as amostras avaliadas, 20% apresentaram valores superiores a 1,0 µg/L, valor máximo permitido pela Legislação Brasileira. As maiores frequências de detecção de Mcyst foram observadas nas lagoas Juara e Jacuném, respectivamente 67 e 83% das 12 amostras avaliadas para cada lagoa. Apesar da alta variabilidade observada nos níveis de Mcyst total e nos parâmetros de qualidade de água, os resultados demonstraram associação direta entre esses níveis e as concentrações de clorofila-a, fósforo total e nitrogênio total. Mcyst-LR foi a variante dominante nas amostras, seguida da -RR, -YR e -LA.

PALAVRAS-CHAVE: Microcistina, qualidade da água e monitoramento.

MICROCYSTIN VARIANTS IN SURFACE WATER SAMPLES OF OF THE METROPOLITAN REGION OF VITORIA, ES, BRAZIL

ABSTRACT

The occurrence of microcystin (MCYST) variants LR,-RR,-YR and-LA was evaluated in 60 water samples collected at different surface water sources of metropolitan area of Vitória, ES, Brazil, between 2011 and 2012. The total content of MCYST was quantified by HPLC-PDA, being detected the presence of at least one variant in 57% of samples. Among these samples, 20% showed values greater than 1.0 µg / L, the maximum concentration allowed by Brazilian legislation. The highest frequencies of detection of MCYST were observed at Juara and Jacunem ponds with 67 and 83% of positive samples, respectively. Although the high variability of MCYST levels and water quality parameters, the results showed close association between MCY concentration and chlorophyll-a, total phosphorus (P_{total}) and total nitrogen (N_{total}). MCYST LR was predominant type in the water samples, followed by the RR, YR and LA microcystin type.

KEYWORDS: Microcystin, Water Quality, Monitoring Program

1. INTRODUÇÃO

A principal preocupação com a ocorrência de florações de cianobactérias é a capacidade desses microrganismos de produzir e liberar para o meio aquático, toxinas que podem trazer sérios riscos à biota e à saúde humana (Codd, *et al.*, 2005; Sirqueira e Oliveira-Filho, 2007; Carneiro e Leite, 2007; Chen *et al.*, 2011). No Brasil existem inúmeros estudos sobre a detecção de florações de cianobactérias tóxicas e a presença de suas cianotoxinas nas águas eutrofizadas, porém poucos deles foram realizados no estado do Espírito Santo (Azevedo *et al.*, 1994; Yunes *et al.*, 1996; Sant'anna e Azevedo, 2000; Delazari-Barroso *et al.*, 2007; Ame *et al.*, 2010).

Dentre as cianotoxinas, as microcistinas (Mcyst) são consideradas o grupo mais abundante nas florações. Identificadas pela primeira vez em cepas de *Microcystis aeruginosa*, as Mcyst são conhecidas como potentes hepatoxinas e possíveis promotoras de tumores hepáticos (Harada e Tsuji, 1998; Almeida *et al.*, 2006). No entanto, a produção desta toxina não se restringe exclusivamente às cepas desta espécie, visto que outras cepas de *Microcystis* e dos gêneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix* (Yoo *et al.*, 1995, Sivonen, 1996), *Aphanocapsa* (Domingos *et al.*, 1999), *Synechocystis* (Nascimento e Azevedo, 1999) e *Oscillatoria* (Brittain *et al.*, 2000) já foram citadas como potenciais produtoras de Mcyst.

Nem todas as cepas de cianobactérias dos gêneros citados produzem a toxina, uma vez que apenas as linhagens tóxicas possuem genes para a síntese de Mcyst (Metcalf *et al.*, 2001). Além disso, sua produção é influenciada pelas condições ambientais, principalmente, de temperatura, pH, intensidade de luz e

concentração de nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro (Carmichael, 1992; Meibner, *et al.*, 1996; Kotak *et al.*, 2000).

Pequenas mudanças estruturais podem ter importantes efeitos sobre a excreção, distribuição e absorção das Mcyst. Estudos demonstraram a existência de mais de 90 variantes estruturais desta toxina, porém apenas algumas ocorrem com frequência em concentrações elevadas (Park *et al.*, 2001; Welker e von Dohren, 2006). A Mcyst-LR é a variante identificada com maior frequência nos estudos de florações de cianobactérias tóxicas. Estas variações influenciam a toxicidade das Mcyst, que por menor que seja o efeito, representa um risco à saúde pública seja pelo contato direto, via ingestão da água e atividades de recreação ou pelo contato indireto, através do consumo de pescado contaminado (Dawson, 1997; Kuiper-goodman *et al.*, 1999; Ferrão-Filho *et al.*, 2002; Dorr *et al.*, 2010).

Neste estudo avaliou-se a presença e a distribuição de variantes de Mcyst em amostras de água de mananciais superficiais da região metropolitana de Vitória-ES, entre o período de 2011 e 2012. Os resultados foram utilizados para observar as possíveis associações entre os níveis de Mcyst detectados e os parâmetros de qualidade de água: clorofila-a, nitrogênio total, fósforo total, temperatura e pH.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS

Os mananciais superficiais avaliados foram escolhidos devidos aos seus usos predominantes. O Reservatório e os Rios Jucu e Santa Maria são os principais corpos d'águas utilizados no abastecimento público da população de 1.500.392 habitantes distribuídos nos municípios de Vitória, Cariacica, Serra e Vila Velha,

idades que compõem a região metropolitana de Vitória-ES (Brasil, 2010). Já as lagoas Juara e Jacuném são corpos d'água referencialmente eutrofizados, com usos predominantes de recreação e pesca (Delazari-Barroso *et al.*, 2007, Martins, 2010).

O reservatório de Duas Bocas localiza-se em uma reserva biológica na cidade de Cariacica-ES. Com história fortemente vinculada à produção de água, Duas Bocas abastece 25% do município de Cariacica, o que corresponde à uma população de aproximadamente 90.000 habitantes (Brasil, 2010). O reservatório pertence à sub-bacia do Rio Santa Maria, principal manancial utilizado no abastecimento público da região metropolitana. O reservatório, com uma área de 0,51 km² e profundidade média de 4 m, não apresenta fontes de contaminação por agricultura, poluição doméstica ou industrial, a matéria orgânica dissolvida é proveniente dos detritos em decomposição da floresta de Mata Atlântica que recobre suas margens (Delazari-Barroso *et al.*, 2007).

As bacias hidrográficas dos rios Santa Maria e Jucu são responsáveis pelo abastecimento da região da Grande Vitória. Além de abastecer 42,7 % dos mais de 3,5 milhões de habitantes da região metropolitana, estes mananciais são utilizados no abastecimento de pólos industriais e na irrigação, especialmente na produção de hortifrutigranjeiros, uma das economias mais importantes da região serrana do estado. Ao longo da bacia destes rios, estão situadas diversas unidades de conservação e fragmentos florestais responsáveis pela proteção das nascentes, margens e solo, além da manutenção do micro clima e da biodiversidade na região. A região de abrangência destas bacias sofre intenso processo de desmatamento das áreas de nascentes e das áreas de recarga de

aquíferos, redução drástica de mata ciliar, uso excessivo e degradador dos recursos hídricos, falta ou insuficiência de saneamento básico, gestão incompleta ou incipiente dos recursos hídricos e pouco envolvimento da sociedade na gestão e na conservação dos recursos naturais. Todos esses fatores comprometem a quantidade e qualidade da água destes mananciais e o abastecimento público das populações urbanas e rurais de grande parte do estado (ANA, 2010).

As lagoas Juara e Jacuném localizam-se na cidade de Serra-ES. A Juara situa predominantemente na área rural, porém com uma de suas margens voltada para área urbana. A Jacuném localiza-se na área urbana, entre o centro industrial e bairros adjacentes. A lagoa Jacuném já foi utilizada para abastecimento público, porém em 1983 os sistemas de captação e tratamento foram desativados. Atualmente o manancial é muito utilizado para pesca e recreação, assim como a lagoa Juara que abriga um projeto de piscicultura. O projeto realizado através da Associação de Pescadores da Lagoa Juara, com incentivo público/privado, possibilita a criação de tilápias em até 150 tanques-rede na lagoa. O projeto conta com restaurante onde são servidos pratos à base da tilápia e com a venda de peixes frescos abatidos na hora.

2.2. AMOSTRAGEM

Cada manancial constituiu uma estação amostral, na qual foram realizadas coletas mensais no período de junho de 2011 a maio de 2012, totalizando 60 amostras, 12 por cada um dos 05 pontos de coleta. Em Duas Bocas e nos rios Jucu e Santa Maria, as coletas foram realizadas no ponto de captação localizado na entrada do tratamento de águas. Já nas lagoas Juara e Jacuném, os pontos de coletas localizaram no braço da lagoa próximo à área residencial e as coletas

foram realizadas na superfície nas margens dos mananciais. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em frascos de polietileno e mantidas ao abrigo da luz por 3 horas até a realização das análises no laboratório de Saneamento Ambiental (Labsan) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA

Os parâmetros de qualidade da água escolhidos para avaliar as condições ambientais da área de amostragem e estabelecer a sua relação com os níveis de Mcyst foram: clorofila-a (10200 H), fósforo total (4500-P), nitrogênio total (4500-N_{ORG}), temperatura e pH. Todas as análises foram realizadas seguindo as metodologias propostas por APHA (1998), com os números dos métodos citados entre parênteses.

2.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE MICROCISTINAS

Para identificação das variantes e a quantificação do teor total de Mcyst, 500 mL das amostras, previamente filtradas à vácuo com membranas de fibra de vidro (0,8 – 8,0 µm), foram submetidas à extração em fase sólida em cartuchos C18 (Chromabond[®] 6mL/500mg, Macherey-Nagel), conforme a norma ISO 20179:2005. As toxinas foram eluídas usando 4,0 mL de solução de MeOH:TFA:H₂O (89,9:0,1:10 v/v). O eluato foi evaporado à temperatura ambiente e ressuspenso em 0,5 mL de solução de MeOH:H₂O (80:20 v/v) para as análises cromatográficas.

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia da série Shimadzu CBM-20A, equipado com um desgaseificador de solventes DGU-20AS, uma bomba quaternária de gradiente LC-20AT, um injetor automático de

amostras SIL-20AHT e um detector de arranjo de diodos SPD-M20A. A coluna cromatográfica utilizada neste estudo foi a coluna analítica Kinetex™ C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 nm). Para as análises foram injetadas 50 µL da amostra, em fluxo da fase móvel de 0,250 mL/min, temperatura de 37°C e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 238 nm.

A solução de H₂O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) foi utilizada como fase móvel A, enquanto a fase B foi a solução de Metanol 100%. O perfil do gradiente iniciou-se com 100% da fase móvel A e foi executado de forma isocrática no intervalo de 0 a 1 min. Entre 1 e 3 min aplicou-se um gradiente linear de metanol, variando a porcentagem da fase móvel B de 0 a 20%. Entre 3 e 8 min., o gradiente linear variou de 20 a 40%. Em seguida, o gradiente linear de 40 a 62% foi aplicado no intervalo de 8 e 25 min. Entre 25 e 25,5 min., o gradiente retornou à condição inicial e manteve-se isocrático até 50 min. Todas as soluções preparadas para compor as fases móveis foram previamente filtradas e mantidas por 15 min em banho de ultrason (Limpsonic®, Brasil) antes de serem utilizadas.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água e o teor de Mcyst total avaliados durante o período de estudo estão apresentados na Figura II.1. Em todas as estações amostrais, os valores médios de pH variou entre 5,6 e 8,3 e a temperatura média, entre 18 e 29°C. As condições ambientais de baixa turbulência, profundidade e tempo de detenção de ambientes lênticos associados à elevadas concentrações de fósforo, nitrogênio, pH (7,0 < pH < 9,0) e temperaturas (> 20°C) são adequados para a proliferação, dominância e manutenção das florações de cianobactérias (Figueredo, *et al.*, 2004). No Brasil, os ambientes aquáticos

apresentam em geral temperaturas médias entre 20 e 30°C (Sant'anna e Azevedo, 2000), faixa também observada nas amostras avaliadas neste estudo. Altas temperaturas associado aos ambientes neutros a alcalinos encontrados nas amostras favorecem o desenvolvimento de cianobactérias.

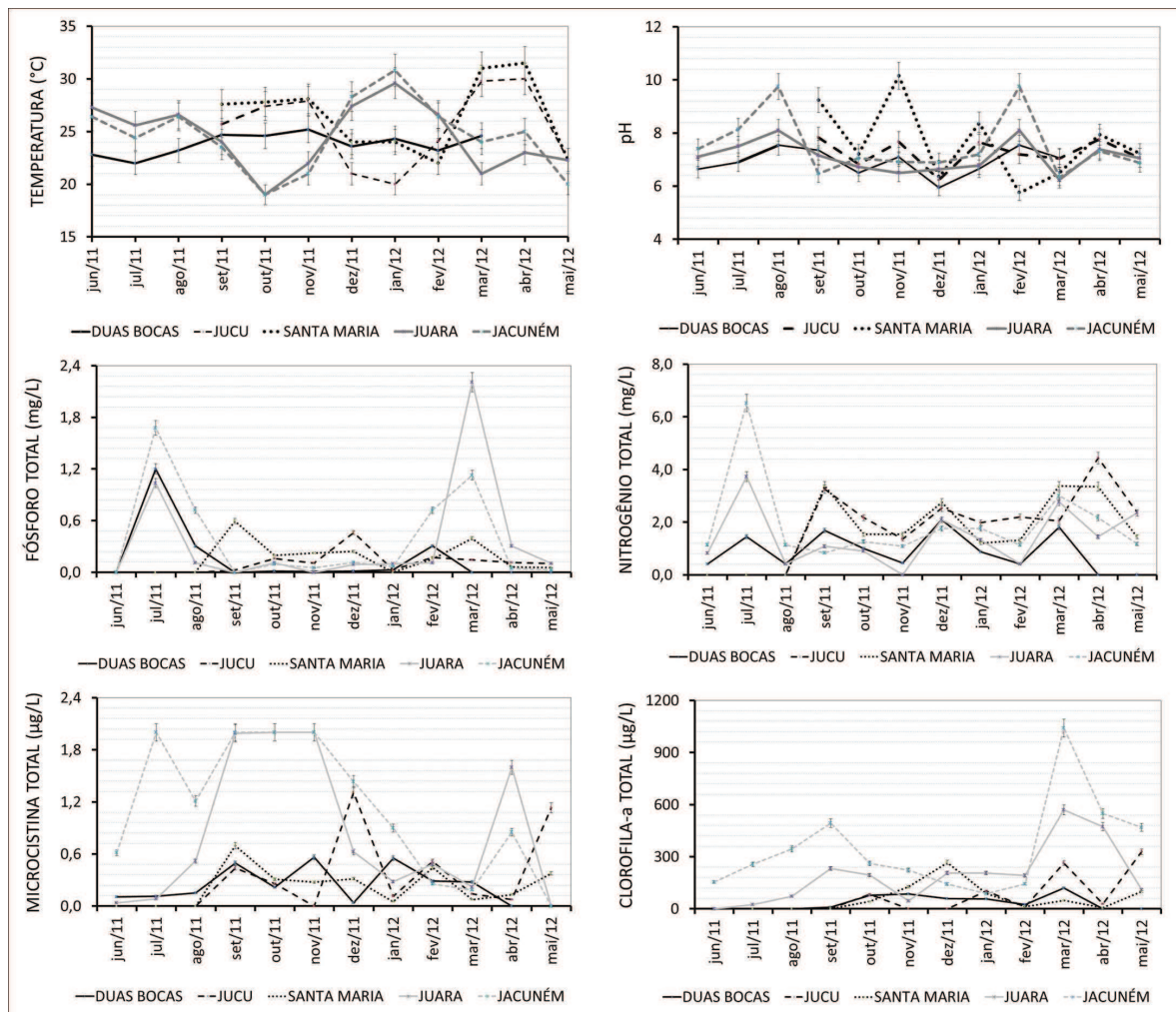


Figura II.1 – Valores médios dos parâmetros de qualidade de água avaliados durante o período de junho de 2011 a maio de 2012. (—) Reservatório de Duas Bocas, (---) Rio Jucu, (....) Rio Santa Maria, (-.-) Lagoa Juara e (-.-.-) Lagoa Jacuném.

Os resultados do monitoramento mensal de Mcyst total e dos parâmetros de qualidade de água, clorofila-a, fósforo e nitrogênio-total demonstraram uma alta variabilidade nos valores detectados ao longo do período de junho-2011 a maio de 2012 (Figura II.1). Apesar da alta variabilidade pode se observar nos gráficos, uma relação direta entre os níveis de Mcyst total e os parâmetros avaliados. Nas

amostras de água da lagoa Jacuném, por exemplo, foram observados os maiores valores médios de Mcyst total, clorofila-a e nitrogênio total. Já os menores valores médios de clorofila-a, fósforo e nitrogênio total foram observados nas amostras dos mananciais utilizadas para o abastecimento público, os quais também apresentaram os menores níveis de Mcyst.

A concentração de clorofila-a é uma medida amplamente utilizada para estimar a biomassa de algas e cianobactérias, sendo utilizada como uma importante ferramenta de triagem para determinar quando as análises de cianotoxinas são necessárias (Bartram *et al.*, 1999). Nos protocolos da Organização Mundial da Saúde, publicados a partir de 1999, amostras com valores de clorofila-a superior a 1,0 µg/L, sugere-se iniciar as avaliações de cianotoxinas (Chorus e Bartram, 1999). Rogalus e Watzin (2008) realizaram um estudo de associação entre a densidade de células de cianobactérias potencialmente tóxicas e a concentração de clorofila-a, os resultados demonstraram que o limiar entre a densidade de células e a concentração de clorofila-a era de cerca de 5,0 µg/L. Os valores médios de clorofila-a detectados em todas as amostras ficaram entre 14 e 364 µg/L. Considerando os autores citados, todos os mananciais avaliados apresentaram valores acima do limite indicativo da necessidade do monitoramento dos níveis de cianotoxina.

O aumento na concentração de nutrientes, nitrogênio e fósforo, em rios, lagos e reservatórios podem resultar em visíveis florações de cianobactérias. A dominância de cianobactérias nas florações é favorecida pela presença de células diferenciadas denominadas heterocistos. A capacidade de assimilar nitrogênio da atmosfera pelos heterocistos faz do fósforo, o nutriente limitante do crescimento

de cianobactérias. Concentrações de fósforo inferiores a 0,1 mg/L são suficientes para induzir florações de cianobactérias, portanto a forma de contenção de florações está no controle da origem do fósforo no ambiente (Bartram *et al.*, 1999; Havens *et al.*, 2003). Apesar dos níveis de fósforo detectados nas amostras não ter acompanhado de forma direta a variação de Mcyst total, observa-se que os valores médios encontrados são superiores a 0,19 mg/L, indicando, segundo os autores citados, a possibilidade de indução de florações de cianobactérias.

As análises de presença de Mcyst por CLAE-PDA demonstrou uma concentração média de Mcyst total entre 0,28 e 1,12 µg/L. As maiores frequências de detecção da toxina foram observadas nas lagoas Juara e Jacuném, respectivamente 67 e 83% das amostras. Na lagoa Juara não foi detectada a presença de Mcyst, apenas nos meses de junho, julho, agosto de 2011 e maio de 2012, Já na lagoa Jacuném apenas nos meses de março e maio de 2012. As condições ambientais médias de temperatura (27^oC e 28^oC), pH (7,3 e 8,0) e nitrogênio total (2,22 e 2,44 mg/L) observadas nas lagoas Juara e Jacuném, respectivamente, são adequadas para proliferação de cianobactérias. Os valores médios de clorofila-a quantificados (194 e 347 µg/L) reforçam esta indicação de proliferação, que associada com a informação da detecção de Mcyst na maioria das amostras, indica também a possibilidade de dominância de cianobactérias tóxicas nestes mananciais durante as florações.

Além da indicação de florações tóxicas, os resultados chamam a atenção para os níveis de Mcyst total encontrados, visto que as lagoas Juara e Jacuném apresentaram, respectivamente, em 33 e 50% de suas amostras, valores de Mcyst total acima de 1,0 µg/L. Além disso, no mês de junho de 2011, para lagoa

Jacuném e no período de setembro a novembro de 2011, para as duas lagoas estes valores ficaram acima de 2,0 µg/L (limite máximo de detecção do método utilizado). Já na maior parte das amostras de água do reservatório de Duas Bocas e dos rios Jucu e Santa Maria apresentaram níveis de Mcyst total abaixo de 0,24 µg/L, porém no Rio Jucu nos meses de dezembro de 2011 e maio de 2012 foram observados valores acima de 1,0 µg/L (Figura II.2).

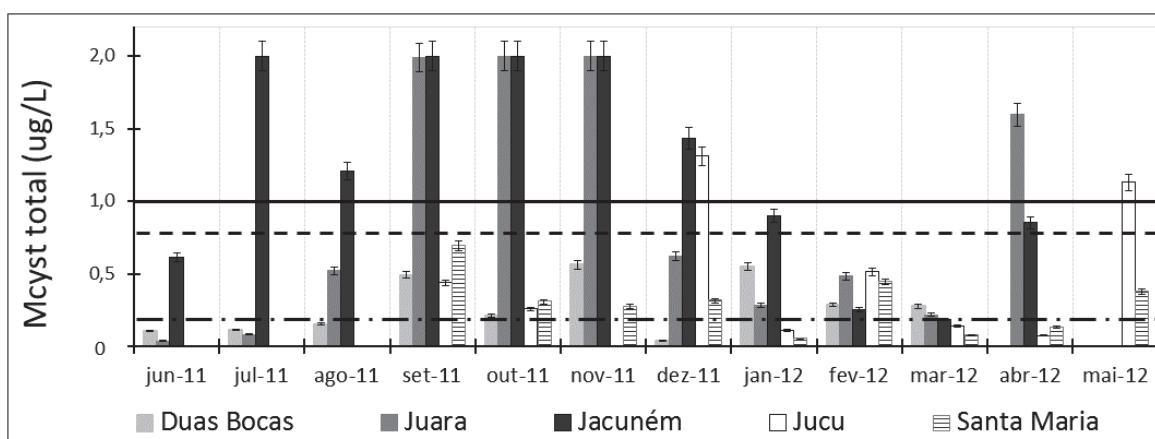


Figura II.2 – Teor de Mcyst total detectada e quantificada nas amostras ambientais de água, entre junho de 2011 e maio de 2012, por CLAE-PDA. VMP - valor máximo de microcistina permitido em amostras de água para abastecimento público (1,0 µg/L). LOD - limite de detecção do método utilizado (0,24 µg/L) e LOQ - limite de quantificação do método utilizado (0,81 µg/L).

Com relação à detecção e quantificação das diferentes variantes, em 57% das amostras foi observada a presença de pelo menos uma variante de Mcyst. Dentre todas as amostras avaliadas, 20% apresentaram valores superiores a 1,0 µg/L, sendo 10% das amostras referentes à lagoa Jacuném, 7% da lagoa Juara e 3% do rio Jucu. Das amostras com valores menores que 1,0 µg/L, todas as estações amostrais apresentaram uma pequena variação na porcentagem (5 a 10%) de amostras positivas (Figura II.3). Está pequena variação demonstra que mesmo amostras como Duas Bocas e Santa Maria, que não apresentaram valores de Mcyst total superiores a 1,0 µg/L, necessitam de um monitoramento constante, pois demonstraram a presença da toxina em parte de suas amostras.

No Brasil, Mcyst já foram detectadas em amostras brutas de reservatórios de abastecimento público, em concentrações que variam de 0,5 a 100 µg/L em São Paulo (Nobre, 1997), de 0,5 a 1,11 µg/L em Minas Gerais (Jardim, 1999) e entre 0,2 e 6,60 µg/L no Paraná (Hirooka *et al.*, 1995). Os autores citados alertaram que uma elevada incidência de cianobactérias tóxicas poderia estar ocorrendo nestes locais, assim como as evidências encontradas no nosso estudo.

Com relação à presença das variantes -RR, -YR, -LR e -LA nas amostras, a Mcyst-LR foi a principal variante encontrada, seguida da -RR, -YR e -LA. Nas amostras de águas do reservatório de Duas Bocas apenas as variantes -YR e -LR foram detectadas, já nos rios Jucu e Santa Maria, as variantes -RR e -LR. Na lagoa Jacuném foi detectada a presença das quatro variantes de Mcyst avaliadas. Além disso, a distribuição destas variantes mostrou uma relativa homogeneidade, sendo que a variante-LA, demonstrou um pequeno predomínio (Figura II.3). Segundo Messineo *et al.* (2009), a variante Mcyst-LA foi raramente detectada nas ocorrências de florações em países como Itália, África do Sul, Marrocos e Grécia, porém em estudos na Argentina, Ame *et al.* (2010) relata sempre ter encontrado níveis de Mcyst-LA, inclusive acima da variante Mcyst-LR. A variabilidade espacial observada para as variantes de Mcyst em água tem sido observada em diferentes países da Europa (Messineo *et al.*, 2009), da América do Sul (Ame *et al.*, 2003), da África (Ballot *et al.*, 2005); da Ásia (Zhang *et al.*, 2009). Esta variação pode ser consequência das diferentes condições ambientais, aos quais os corpos d'água estão submetidos, ou ainda estarem sujeitos a mudanças na dominância de espécies e estirpes de cianobactérias tóxicas ao longo do período de amostragem.

No Brasil, a legislação limita a concentração de Mcyst em águas para consumo humano em 1,0 µg/L, sendo aceitável a concentração de até 10 µg/L, em até 3 amostras, consecutivas ou não, nas análises realizadas nos últimos 12 meses (Brasil, 2006). Para as amostras de águas coletadas nos mananciais destinados ao abastecimento público da região (Duas Bocas, Jucu e Santa Maria), os níveis encontrados estão de acordo com a legislação, porém as constantes observações da presença de Mcyst nas amostras, principalmente de Duas Bocas e Santa Maria, indicam a necessidade de um monitoramento contínuo nestes mananciais.

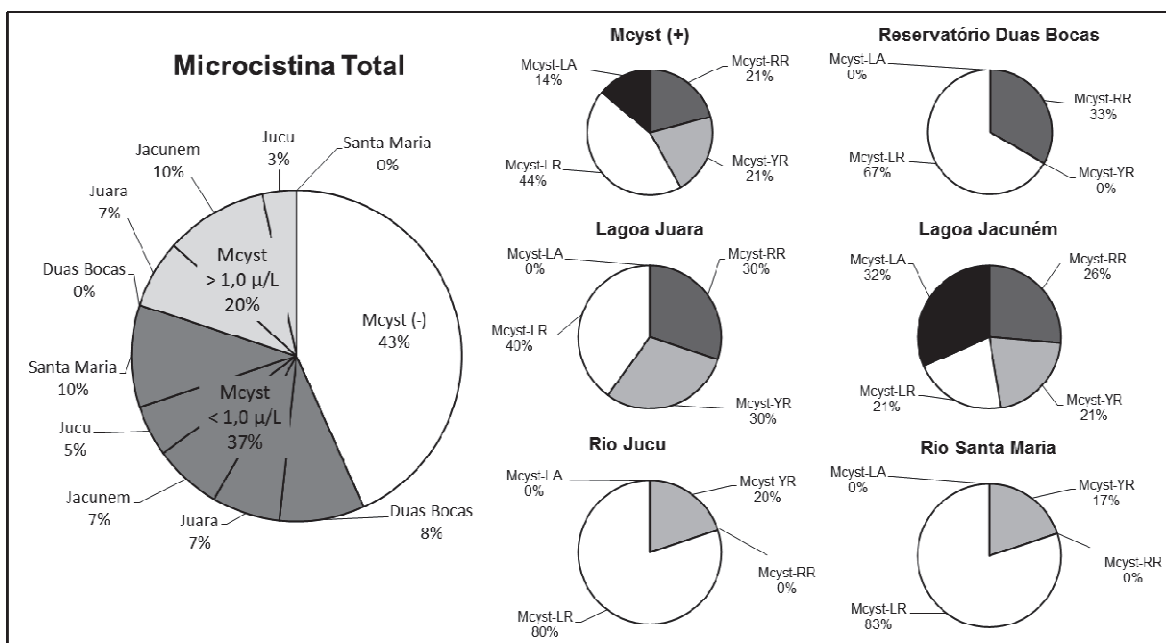


Figura II.3 – Distribuição relativa das variantes de Mcyst -RR, -YR, -LR e -LA nas amostras ambientais, considerando todas as amostras positivas e sua distribuição em cada uma das estações amostrais: Reservatório Duas Bocas, lagoas Juara e Jacuném e Rios Jucu e Santa Maria.

Considerando os usos da lagoa Juara e Jacuném que são, principalmente, a pesca e a recreação de contato primário, a presença de níveis elevados de Mcyst pode representar riscos à saúde da população. Segundo critérios da legislação brasileira, estas estações amostrais podem ser consideradas impróprias para balneabilidade, já que as consequências adversas da exposição direta, mesmo com pouco contato com cianobactérias durante a recreação aquática, podem

provocar irritações da pele e aumentar a probabilidade de sintomas gastrointestinais.

Ainda há o risco de exposição indireta à toxina através do consumo de pescados, devido ao processo de bioacumulação de Mcyst nos tecidos dos peixes, mesmo em períodos de baixos níveis desta toxina dissolvida em água (Deblois *et al.*, 2008). A toxina acumulada nos músculos de peixes podem atingir concentrações que, se ingerido de forma regular, podem ultrapassar o limite de ingestão diária tolerável de 0,04 µg/kg, proposto pela OMS (Chorus e Bartram, 1999), representando um risco para os consumidores deste pescado. Na lagoa Juara é realizada ainda o cultivo de tilápias para comercialização, coordenada pela associação de moradores da região. As espécies de tilápia, em geral, não podem evitar o consumo de cianobactérias, quando presentes (Bennet e Thorpe, 2003). Desta forma, além do monitoramento dos níveis de Mcyst dissolvida em água, estudos de bioacumulação em peixes, principalmente nas tilápias cultivadas, devem ser realizados para garantir a segurança da saúde pública tanto dos moradores envolvidos na produção, quanto de seus consumidores.

4. CONCLUSÕES

As quatro variantes de Mcyst avaliadas neste estudo foram detectadas nas diferentes amostras de água coletadas nos mananciais superficiais localizados na da região metropolitana de Vitória-ES. A presença de pelo menos uma variante em 57% de todas as amostras avaliadas e a detecção de níveis de Mcyst total acima de 1,0 µg/L em 20% das amostras indicam a necessidade de se manter o monitoramento contínuo. Apesar dos níveis de Mcyst em nenhuma das amostras referentes aos corpos d'água utilizados no abastecimento público da região ter

ultrapassado o valor máximo permitido pela legislação brasileira, a detecção frequente de Mcyst é um sinal de alerta para os gestores da qualidade destes mananciais. A relação direta apresentada entre os níveis de Mcyst total e os parâmetros de clorofila-a, fósforo total, nitrogênio total, temperatura e pH demonstram que a qualidade da água destes mananciais, além de favorecer o desenvolvimento de cianobactérias, estimula a produção de Mcyst, principalmente nas lagoas Juara e Jacuném. Nestas lagoas, devido à alta concentração e frequência de detecção de Mcyst, medidas de controle devem ser aplicadas para garantir que esses corpos d'água não ofereçam riscos por exposição direta via recreação ou por exposição indireta por consumo de pescado provenientes destes mananciais.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo, com bolsa de pesquisa da FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, e financiamento do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da FAPES. Agradecemos à CESAN por permitir as coletas na Estação de Tratamento de Água de Duas Bocas, Cariacica-ES, e à Prefeitura Municipal de Vitória, pelo auxílio nas coletas nos rios Jucu e Santa Maria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. v.37, p. 192-198.

AME, M.V., DIAZ, M.P., WUNDERLIN, D.A. (2003). **Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Dam (Córdoba—Argentina): a field and chemometric study.** Environmental Toxicology, v.18, p.192–201.

AME, M.V., GALANTI, L.N., MENONE, M.L., GERPE, M.S., MORENO, V.J., WUNDERLIN, D.A. (2010). **Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina.** Harmful Algae, v.9, p.66-73.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. (2010). **Atlas Brasil - Abastecimento urbano de água - Resultados por estado.** Engecorps/Cobrape, Brasília, v.2, 78p.

APHA (1998). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** American Public Health Association, Washington, DC.

AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. (1994). **First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** Journal of Applied Phycology, v.6, n.3, p.261-265.

BALLOT, A.; KRIENITZ, L.; KOTUT, K.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. (2005). **Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya.** Harmful Algae, n.4, v.1, p.139–150.

BARTRAM, J., BURCH, M., FALCONER, I.R., JONEM, G., KUIPERGOODMAN, T. (1999). **Situation assessment, planning and management.** In: Chorus, I., Bartram, J, (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management., London, p.179–209.

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, USA, p.50.

BRASIL (2010). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, <http://www.ibge.gov.br>, site acessado dia 30-04-2013.

BRITAIN, S; MOHAMED, Z.A.; WANG, J.; LEHMANN, V.K.B.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHART, K.L. (2000). **Isolation and characterization of microcystin from a Nile River strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont**. *Toxicon*, v. 38, p.1759-1771.

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

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.

CARNEIRO, T.G., LEITE, F. (2007). **Cianobactérias e suas Toxinas**. *Revista Analytica*, v.32, p.36-41.

CHEN, H.; BURKE, J.M.; PREPAS, E.E. (2011). **Cyanobacterial toxins in fresh Waters**. *Encyclopedia of Environmental Health*, p.860-871.

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.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. (2005). **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection**. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v.203. p.264-272.

DAWSON, R.M. (1997). **The toxicology of microcystins**. *Toxicon* v.36, p.953–962.

DEBLOIS, C.P.; ARANDA-RODRIGUES, R.; GIANI, A.; BIRD, D.F. (2008). **Microcystin accumulation in liver and muscle of tilápia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs**. *Toxicon*, v.51, p.435-448.

DELAZARI-BARROZO, A., SANT'ANNA, C.L., SENNA, P.A.C. (2007). **Phytoplankton from Duas Bocas Reservoir, Espírito Santo State, Brazil**. *Hoehnea*, v.34, n.2, p.211-229.

DOMINGOS, P.; RUBIM, T.K.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. (1998). **First report of Microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply**. *Environmental Toxicology*. v.14. p.31-35.

DORR, F.A.; PINTO, E.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (2010). **Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence toxicity and toxicological assays**. *Toxicon*. v.56. p.1427-1256.

FERRÃO-FILHO, A.S., KOZLOWSKY-SUZUKI, B., AZEVEDO, S.M.F.O. (2002). **Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community**. *Aquatic Toxicology*, v.59, p. 201-208.

FIGUEREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. (2004). **Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.59. p.151-163.

HARADA, K.I.; TSUJI, K. (1998). **Persistence and Decomposition of Hepatotoxic Microcystins Produced by Cyanobacteria in Natural Environment**. *Toxin Reviews*. v17. n.3. p.384-403.

HAVENS, K.E., JAMES, R.T., EAST, T.L., SMITH, V.H. (2003). **N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution**. *Environmental Pollution*, v. 122, p.379-390.

HIROOKA, E.Y., PINOTTI, M.H.P., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, F., UENO, Y. (1999). **Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA**. *Natural Toxins*, v.7, p.103-109

JARDIM, F.A. (1999). **Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA-MG**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 104p.

KOTAK, B.G., LAM, A.K.Y., PREPAS, E.E., HRUDEY, S.E. (2000). **Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v.57, n.8, p.1584–1593.

KUIPER-GOODMAN, T., FALCONER, I.R., FITZGERALD, J. (1999). **Human health aspects.** In: Toxic Cyanobacteria in Water. Ed.Chorus, I., Bartram, London, p.113-153.

MARTINS, C.F. (2010). **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória.** Dissertação (Mestrado) – Engenharia Ambiental, UFES, Vitória.

MEIBNER, K., DITTMAN, E., BORNER, T. (1996). **Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes.** FEMS Microbiology Letters, v.135, p. 295-303.

MESSINEO, V., BOGIALLI, S., MELCHIORRE, S., SECHI, N., LUGLIE, A., CASIDDU, P., MARIANI, M.A., PADEDDA, B.M., Di CORCIA, A., MAZZA, R., CARLONI, E., BRUNO, M. (2009). **Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters.** Limnologica. v.39, n.2, p.95–106.

METCALF, J.S., BELL, S.G., CODD, G.A. (2001). **Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria.** Applied and Environmental Microbiology. v.67, p.904-909.

NASCIMENTO, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (1999) **Changes in cellular component in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios – an ecophysiological study.** Environmental Toxicology. v.14. n.1. p.37-44.

NOBRE, M.Z.A. (1997). **Detecção de toxinas (microcistinas) produzidas por cianobactérias (algas azuis) em represas para abastecimento público, pelo método de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA),** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 154p.

PARK, H.D.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRAISHI, A.; KATO, K. (2001). **Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a heterotrophic lake.** Environmental Toxicology, v.16, p.337–343.

ROGALUS, M.A. ; WATZIN, M.C. (2008). **Evaluation of sampling and screening techniques fortiered monitoring of toxic cyanobacteria in lakes.** Harmful Algae, v.7, p.504-514.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. (2000). **Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil.** Nova Hedwigia, Weinheim, v.71, n.3/4, p.359-385.

SIRQUEIRA, D.B.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. (2007). **Cianobactéiras de águas doce e saúde pública: uma revisão.** Universitas Ciência da Saúde. v.3. n.1. p.109-127.

SIVONEN, K. (1996). **Cyanobacterial toxins and toxin production.** Phycologia. v.35. p.12-24.

WELKER, M., von DOHREN, H. (2006). **Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis.** FEMS Microbiology Review. 30, 530–563

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. (1995) **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins—a resource guide.** American Water Works Association Research Foundation, 229 p.

YUNES, J.S., SALOMON, P.S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K.A., RAGGETT, S.L., CODD, G.A. (1996). **Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil.** Journal of Aquatic Ecosystem Health, v.5, p.223-229.

ZHANG, D., XIE, P., LIU, Y., CHEN, J., WEN, Z. (2009). **Spatial and temporal variations of microcystins in hepatopancreas of a freshwater snail from Lake Taihu.** Ecotoxicology Environmental Safety, v.72, p.466-472.



ARTIGO III

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DETECÇÃO DE MICROCISTINA
COMO FERRAMENTA AUXILIAR PARA OS PROGRAMAS DE
MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUAS.**

RESUMO

Foi desenvolvido um sistema simplificado para a detecção qualitativa de microcistinas em amostras de águas utilizando enzima fosfatase imobilizada. Os métodos atuais de detecção desta toxina ainda são trabalhosos e de alto custo. Além disso, estes métodos não fornecem informações sobre a viabilidade das microcistinas. Com o desenvolvimento do sistema enzimático imobilizado foi possível desenvolver análises de fácil execução e baixo custo. Utilizando-se o substrato fluorogênico 4-metil-umbeliferil-fosfato (MUP), o sistema de detecção demonstrou alta sensibilidade e permitiu a determinação visual direta da presença de microcistinas em concentrações acima de 0,80 µg/L. Comparado com métodos de referência na detecção de microcistinas, tais como ELISA e CLAE, o sistema demonstrou taxas de confiabilidade de 82,4 % e 88,2 % respectivamente. O sistema de detecção desenvolvido combina a facilidade de interpretação dos resultados com a capacidade de avaliar a atividade e a especificidade das microcistinas presentes em amostras de águas. Nas condições avaliadas não foi necessário nenhum processo de concentração ou limpeza das amostras, para os ensaios de detecção de microcistinas em águas superficiais de diferentes origens.

PALAVRAS CHAVE: Microcistina, monitoramento e qualidade de águas.

DEVELOPMENT OF MICROCYSTIN DETECTION SYSTEM AS AUXILIARY TOOL IN MONITORING PROGRAMS FOR WATER QUALITY

ABSTRACT

It was developed a simplified system for qualitative detection of microcystin in water samples using immobilized enzyme phosphatase. Current methods of detection of this cyanotoxin are laborious and expensive. Furthermore, these methods do not provide information on the viability of microcystin. With the use of immobilized enzyme system, it was possible to implement an easy and inexpensive microcystin detection assay as compared with standard quantitative tests. Using the fluorogenic substrate 4-methyl-umbeliferil-phosphate (MUP), the detection system showed high sensitivity allowing a direct visual determination of the presence of microcystin concentrations above 0.80 µg / L. Compared to reference methods for microcystin detection, such as ELISA and HPLC, the proposed system demonstrated reliability rates of 82.4% and 88.2% respectively. The developed detection system combines ease of interpretation of the results with the ability to assess the activity and specificity of microcystin present in water samples. In the study conditions it was not necessary any concentration or cleaning process to assess the samples in order to detect microcystin in surface waters of different origins.

KEYWORDS: Microcystin, monitoring and Water Quality Programs.

1. INTRODUÇÃO

Florações tóxicas de cianobactérias constituem um alto risco para o meio ambiente e saúde pública devido à liberação de toxinas em corpos d'água superficiais. Estudos com florações pelo Brasil e por todo mundo descrevem as microcistinas como sendo a cianotoxina mais frequente em florações tóxicas (Hyenstrand *et al.*, 1998; Sant'anna e Azevedo, 2000; Codd *et al.*, 2005; Mcelhiney and Lawton, 2005; Sirqueira e Oliveira-Filho, 2007; Blaha *et al.*, 2009).

A detecção e quantificação de microcistinas em amostras de água são realizadas por métodos de referência como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os testes de imuno-ensaio tipo ELISA. A CLAE além de requerer equipamento caro e pessoal altamente qualificado, ainda envolve análises demoradas e exigem trabalhosos métodos de concentração e clarificação de amostras ambientais. Os testes de ELISA de fácil execução e necessidade mínima de amostra possuem baixa especificidade, altos custo e não apresenta correlação entre a reatividade e a toxicidade aguda, uma vez que avalia a presença da molécula de microcistina, independentemente de estar ativa ou não. Desta forma, mesmo que estas técnicas já estejam padronizadas, as suas aplicações na rotina de monitoramento ambiental ainda é limitada (Triants *et al.*, 2010).

Um dos principais fatores responsáveis pelo alto custo das análises de microcistina é que a grande maioria das amostras apresentam níveis da toxina abaixo de 1,0 µg/L valor referencial de legislação Brasileira de qualidade de águas. O desenvolvimento de uma metodologia qualitativa capaz de realizar uma triagem das amostras, por meio de uma pré-análise de presença e ausência da

toxina seguida de procedimentos analíticos de identificação e quantificação apenas nas amostras que apresentarem resultados positivos poderia reduzir, significativamente, os gastos com análises de microcistina.

Métodos enzimáticos utilizados na detecção e quantificação de microcistinas possuem o potencial de ser adaptados e utilizados em sistemas de triagem. Baseados nos estudos sobre o mecanismo de inibição de enzimas fosfatases de células eucarióticas pelas moléculas de microcistinas (Mackintosh *et al.*, 1990; Matsuhima *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990; Bell e Codd, 1994), ficou demonstrado nos ensaios enzimáticos, que a concentração da toxina é inversamente proporcional à concentração do grupo fosfato liberado pelo substrato sintético. Geralmente, estes ensaios baseiam-se na utilização de substratos sintéticos colorimétricos (*p*-NPP ou *p*-Nitro-Fenol-Fosfato) e fluorométricos (MUP ou metil-umbeliferil-fosfato). Em ensaios fluorométricos, por exemplo, a presença de microcistina pode ser detectada pela ausência de fluorescência de uma reação (Heresztyn e Nicholson, 2001; Rapala *et al.*, 2002; Mcelhiney e Lawton, 2005).

Os ensaios enzimáticos caracterizam-se pela rapidez e sensibilidade de ensaio, detectando a presença da molécula de microcistina ativa, ou seja, capaz de promover o efeito toxicológico de inibição da enzima fosfatase. Porém, antes da reação é necessário o preparo de uma série de soluções de trabalho, uma vez que este tipo de ensaio não se encontra disponível na forma de kits de análises. A dificuldade do desenvolvimento destes kits está relacionada, principalmente, à alta instabilidade da enzima e também do substrato em soluções aquosas

(Heresztyn e Nicholson, 2001; Rapala *et al.*, 2002; Mcelhiney e Lawton, 2005; Mountfort *et al.*, 2005)

Uma maior estabilidade e melhor desempenho da enzima podem ser alcançados com o processo de imobilização. A imobilização de enzimas possui uma série de aplicações, teóricas e práticas, com objetivo de facilitar a sua utilização. Porém, a sua utilização em larga escala ainda apresenta alguns entraves devido, principalmente, ao processo de ativação e imobilização onde são utilizadas elevadas quantidades de reagentes potencialmente redutores da atividade enzimática. Um método de imobilização, recentemente desenvolvido por Simons *et al.*, (2002) especialmente aplicado para enzimas fosfatases alcalinas por Taylor *et al.*, (2005) permite ligações cruzadas entre enzimas e o suporte de fibra de vidro ativada, sem a utilização de reagentes químicos de ativação e imobilização.

Assim, o presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de um sistema simplificado de detecção qualitativa tipo presença/ausência (P/A), com base no efeito inibitório das microcistinas sobre a reação catalisada pela enzima fosfatase alcalina imobilizada em tiras de membranas de fibra de vidro, cuja reação inibitória pode ser detectada visualmente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza, a variante de Mcyst-LR (cod.33893), a enzima Proteína Fosfatase Alcalina-1-PP1A (cod.P7937-25UG) e o substrato sintético *p*-nitrofenil-fosfato - *p*NPP (cod.N9389-50TAB) foram adquiridos da marca SIGMA-ALDRICH (St.Louis, USA). O substrato sintético 4-

metil-umbeliferil-fosfato - MUP (cod.44093) utilizado foi da marca CLYCOSYNTH (Cheshire, UK). As soluções estoque de microcistinas foram preparadas com metanol grau CLAE da marca TEDIA (Fairfield, USA) através de diluições da solução estoque em água ultra pura (MiliQ Plus, MILIPORE, Belford, USA).

2.2. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE PP1A

A enzima foi imobilizada em microfiltros de fibra de vidro GF-1 (47 mm / 0,7 µm) da Macherey-Nagel (Duren, Germany). Para ativação das membranas, tiras retangulares (1,0 x 3,0 cm) foram submersas em solução de ácido clorídrico concentrado e mantidas em agitação por 2 h. Em seguida, foram lavadas (3x) com água destilada, secas por 15 minutos em estufa a 100°C e adicionadas em solução de tolueno contendo 2,0 % (v/v) 3-aminopropil-trimetoxisilano. Após serem submetidas a um refluxo a 80 °C por 18 h, as tiras foram lavadas com tolueno, acetona e água destilada. As tiras ativadas foram utilizadas para recobrir uma das paredes internas de cubeta de metacrilato de 5,0 mL com tampa, as quais serviram de suporte para os ensaios de imobilização enzimática (Figura III.1).

Para a imobilização da enzima, foi preparada uma solução estoque da enzima fosfatase alcalina PP1A na concentração de 2,5 µg/L em tampão Tris-HCl pH 8,3 40mM, acrescido de MgCl₂ 34mM, EDTA 4mM, DTT 4mM e BSA 0,5 mg/mL. Sobre as paredes internas das cubetas recobertas com as tiras ativadas foram aplicados 30 µL de PP1A 2,5 µg/L. Em seguida as cubetas foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas por 2h e armazenadas a 4°C até o momento dos testes.

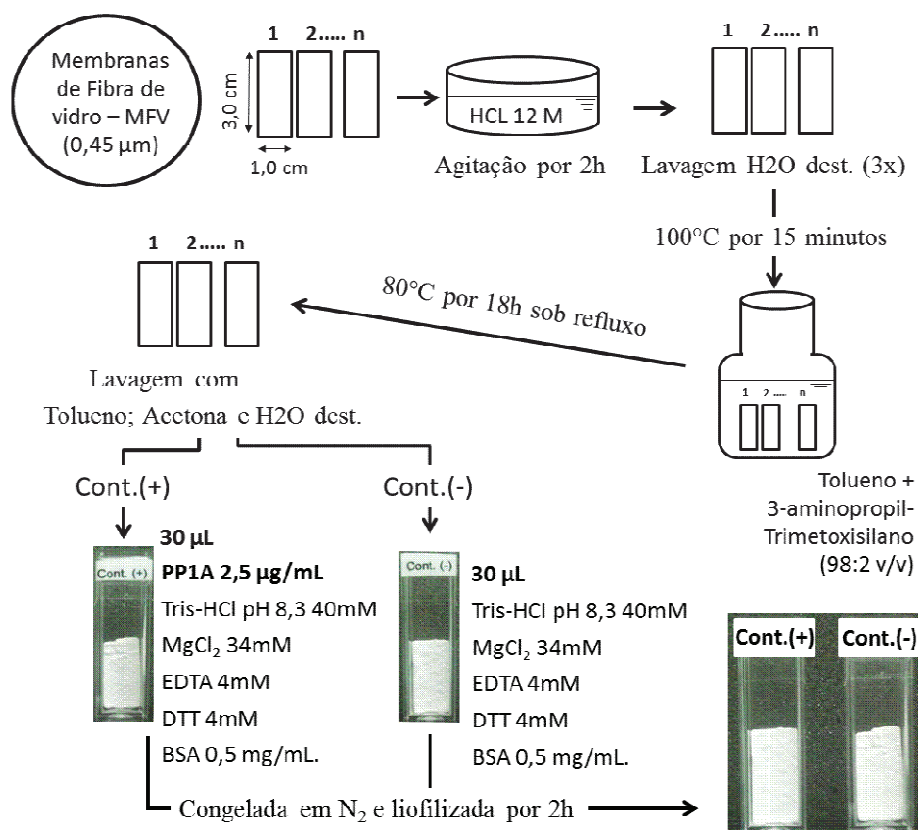


Figura III.1 - Fluxograma da imobilização da enzima PP1A em membranas de fibra de vidro.

2.3. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO

A eficiência da imobilização da enzima fosfatase na fibra de vidro após o processo de imobilização foi avaliada por meio da enzima livre em solução. Um ensaio variando a concentração de PP1A livre em solução foi utilizado para obter uma curva analítica de atividade. As atividades de cinco concentrações diferentes (10, 25, 50, 75 e 100 ng) da enzima, em triplicata, foram quantificadas e seus valores médios aplicados na curva analítica relacionando a atividade enzimática com a quantidade de PP1A livre. A quantidade de enzima PP1A imobilizada foi estimada utilizando a equação obtida a partir da curva analítica.

2.4. ENSAIOS FLUOROGÊNICOS

A atividade enzimática foi determinada pela medição da fluorescência emitida pelo metil-umbeliferil (MU) formado à temperatura ambiente, pela hidrólise

enzimática do substrato 4-metil-umbeliferil-fosfato (MUP), segundo metodologia descrita por Bouaicha *et al.* (2002). O substrato foi preparado em tampão Tris-HCl pH 8,3 40 mM, contendo MgCl₂ 34mM, EDTA 4mM e DTT 4mM.

Para os ensaios com a fosfatase PP1A livre, a enzima foi diluída para 0,25 µg/L no mesmo tampão acrescido de 0,5 mg/mL de BSA. O ensaio foi realizado em cubetas de metacrilato de 5,0 mL, através da adição de 50 µL de PP1A 0,25 µg/mL, 2000 µL de amostra e 600 µL de tampão 5X pH 8,3 (Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 170 mM, EDTA 20 mM e DTT 20 mM). Nos ensaios com o sistema imobilizado, foram adicionados apenas a amostra e o tampão 5X na cubeta já contendo a enzima imobilizada. Tanto para os ensaios com a fosfatase PP1A livre, quanto para os ensaios em sistema imobilizado, após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 400 µL de solução de substrato. A fluorescência foi medida após 30 minutos em espectrofluorímetro (QuantiFluorTM-ST-Fluorometer, Promega) com comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão 460 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. EFEITO DA MATRIZ DE AMOSTRAS DE ÁGUA

O efeito das diferentes matrizes de água sobre a atividade do sistema simplificado de detecção de microcistina (M cyst-LR) foi avaliado em dois experimentos. No primeiro, avaliou-se a questão do efeito dos sólidos suspensos sobre a atividade do sistema. Duas amostras da Lagoa Juara foram fortificadas com M cyst-LR na concentração final de 1,0 µg/L, uma das amostras permaneceu “*in natura*” e a outra foi submetida ao processo de filtração em membrana de fibra de vidro de 0,45 µm. As duas amostras foram submetidas à avaliação pelo sistema e

comparadas com uma amostra da mesma lagoa não fortificada e filtrada e também com uma amostra não fortificada e não filtrada.

No segundo experimento foi avaliado o efeito da origem da amostra de água sobre a atividade do sistema. Amostras de águas utilizadas foram coletadas em três diferentes mananciais da região da Grande Vitória, ES, Brasil: Reservatório de Duas Bocas e Lagoas Juara e Jacuném, além de amostras de água da torneira e água ultrapura produzida no laboratório. Alíquotas de cada uma das amostras foram fortificadas com Mcyst-LR, na concentração final de 0,5 e 1,0 µg/L. A atividade do sistema foi avaliada com amostras de águas não fortificadas das diferentes origens e comparadas com suas respectivas amostras fortificadas.

2.6. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO

Os parâmetros de taxa de confiabilidade (TCF), taxa de falso positivo (TFP), taxa de falso negativo (TFN), taxa de sensibilidade (TS) e taxa de especificidade (TE) foram utilizados para avaliar o desempenho do sistema imobilizado como método qualitativo de detecção de microcistinas. Para avaliar os parâmetros de desempenho, 34 amostras de águas de diferentes origens, coletadas durante o período de 2011 e 2012, foram avaliadas quanto à presença/ausência da toxina pelo sistema simplificado. Os resultados foram comparados com os valores quantificados por ensaios enzimáticos (PP1A) com a enzima livre (Sassolas *et al.*, 2011), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Cassini *et al.*, 2013) e por imuno-ensaio (ELISA). A quantificação de microcistina por ELISA foi realizada utilizando um kit comercial (Beacon Analytical Systems, ME, USA) de acordo com os protocolos do fabricante.

Nos ensaios de PP1A com a enzima livre a atividade foi determinada medindo-se a produção de cor associada à formação de *p*-nitrofenil (*p*NP) pela hidrólise enzimática do substrato *p*NPP à temperatura ambiente. O *p*NPP (45 mM) foi dissolvido em tampão Tris-HCl pH 8,3 50 mM, acrescido de $MnCl_2$ 0,2 mM e $MgCl_2$ 20 mM. A enzima PP1A (0,50 μ g/L) foi diluída no tampão Tris-HCl pH 8,3 50 mM, acrescido de $MgCl_2$ 2 mM, BSA 0,5 mg/mL e β -mercaptoetanol 0,1%. Os ensaios foram realizados em microplacas, aplicando-se 20 μ L de solução de PP1A 0,50 μ g/mL e 20 μ L da amostra. Após a incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 180 μ L de solução de *p*NPP 45 mM. O *p*NP produzido na hidrólise enzimática foi mensurado após 2h a 405 nm, em espectrofotômetro de leitura de microplacas. A quantidade de toxina detectada na amostra foi determinada utilizando curva analítica de inibição preparada com solução padrão de *Mcyst*-LR na concentração entre 0,02 e 5,0 μ g/L. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A quantificação de microcistina por CLAE foi realizada após extração em fase sólida (SPE) de 500 mL das amostras, segundo metodologia descrita na ISO 20179 (ISO, 2005), utilizando cartuchos C18 (Chromabond® 6mL/500mg, Macherey-Nagel). As toxinas foram eluídas usando-se 4,0 mL de solução de MeOH:H₂O:TFA:Água (89,9:10:0,1 v/v). O eluato foi evaporado à temperatura ambiente e ressuspenso em 0,5 mL de solução de MeOH:H₂O (80:20 v/v). As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia Shimadzu CBM-20A, equipado com bomba quaternária de gradiente e um detector de arranjo de diodos, do tipo PDA. A solução de H₂O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) e MeOH 100% foram utilizadas como soluções de fase móvel. A coluna fase reversa utilizada foi a Kinetex™ C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 μ m, 100 nm).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA PP1A

Os sistemas de vigilância de qualidade de águas, em geral, dependem do envio de amostras para laboratórios qualificados para realização das análises de microcistinas. Além do elevado tempo de resposta, os altos custos das análises não são justificados pelo fato da maior parte das amostras apresentarem resultado negativo para a presença de microcistinas.

O método que explora a propriedade bioquímica de inibição da atividade da enzima fosfatase alcalina pela microcistina pode ser uma importante alternativa para diminuir o tempo e o custo das análises desta toxina. Isto porque, além de permitir identificar a toxicidade da amostra, a simplicidade dos ensaios permite desenvolver sistemas qualitativos rápidos e de alta simplicidade operacional. A avaliação da atividade enzimática é realizada na presença de substratos sintéticos cromóforos (*p*NPP), radioativos (P^{32}) ou fluorogênicos (MUP). Os níveis de microcistina são inversamente proporcionais à hidrólise destes substratos, porém a sensibilidade de detecção quantitativa desta toxina ainda exige equipamentos analíticos de alto custo (Bouiacha *et al.*, 2002).

Visando a praticidade operacional dos ensaios e, principalmente, a redução de custos, o objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema qualitativo simplificado com sensibilidade de diferenciação visual da presença/ausência de microcistinas diretamente em águas, sem a necessidade de pré-concentração da amostra. Para isso, os ensaios enzimáticos foram otimizados, utilizando os substratos sintéticos *p*-NPP e MUP, para detecção de microcistinas.

Para a detecção enzimática da toxina, em geral, utiliza-se soluções de fosfatase PP1A livre. Porém ensaios com enzimas livres em solução sofrem rápida inativação, já o processo de imobilização estabiliza a atividade enzimática, além de permitir sua reutilização. A enzima PP1A foi imobilizada em superfícies de membranas de fibra de vidro (Figura III.01). A imobilização em fibra de vidro constitui uma forma fácil de ligação cruzada de proteínas, sem a utilização direta de reagentes químicos. As enzimas são imobilizadas sobre a superfície por meio da ligação covalente entre os íons carboxilato da enzima e os íons amônio ligados à superfície da fibra de vidro (Taylor *et al.*, 2005).

O passo inicial para o desenvolvimento do sistema qualitativo detecção foi definir a quantidade de enzima a ser imobilizada. Ensaios de imobilização com 0; 25; 50; 75 e 125 ng de PP1A foram avaliados pela desfosforilação do substrato MUP, no intervalo de tempo de 0 a 240 (Figura III.2b). A linearidade da reação foi observada até 50 minutos, principalmente para os ensaios com 75 e 125 ng de PP1A imobilizada. Acima de 50 minutos, o valor de fluorescência observado tende a ser subestimado, isto porque alterações no tempo de reação provocam variações não significativas na fluorescência emitida (Figura III.2a). O tempo de reação escolhido para os demais ensaios foi o de 30 minutos, localizado no intervalo de linearidade. A quantidade de enzima definida para os demais ensaios de imobilização foi de 75 ng. Esta quantidade evidenciou uma diferença visual na fluorescência, quando comparado com 25 e 50 ng, porém pouca diferença quando comparado com 125 ng (Figura III.2a).

3.2. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO

A retenção da enzima na fibra de vidro após o processo de imobilização foi estimada em função da atividade da enzima livre em solução, na forma de equivalente livre em solução. Na prática, este equivalente é um indicativo das condições necessárias para se alcançar a hidrólise do substrato, sendo utilizado, portanto, para estimar a quantidade absoluta de enzima imobilizada. Nos ensaios realizados, a enzima, após o processo de imobilização, conseguiu reter 70 % da atividade específica aparente da enzima livre em solução. Valor muito próximo aos 67 % da atividade mantida após processo de imobilização da fosfatase em discos de fibra de vidro, realizado por Taylor *et al.* (2005).

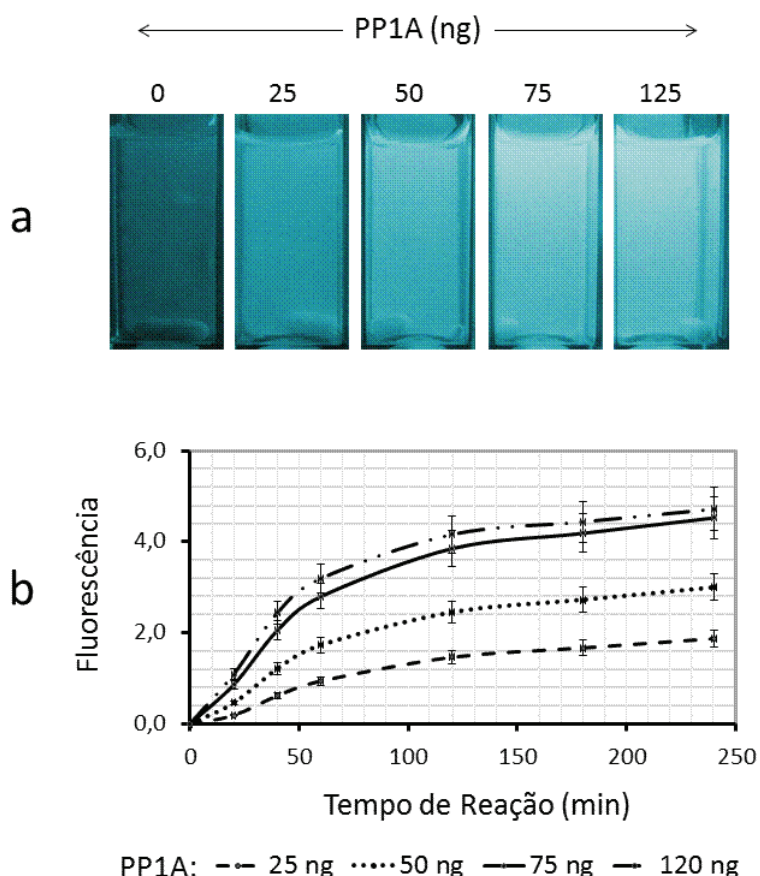


Figura III.2 - (a) Foto das reações com diferentes quantidades de PP1A imobilizadas, após 30 min de reação. (b) Gráfico da atividade da enzima PP1A imobilizada em função do tempo de reação. Foram avaliadas a atividade de 25, 50, 75 e 125 ng de PP1A imobilizada.

3.3. ENSAIOS FLUOROGÊNICOS

O próximo passo para o desenvolvimento do sistema qualitativo de detecção foi definir a quantidade de substrato a ser utilizada. Ensaios realizados com concentrações entre 1,0 e 10,0 mg/mL de MUP (\approx 4,0 a 40,0 mM) demonstraram uma resposta linear em concentrações do substrato menores que 5,0 mg/mL. Em concentrações acima deste valor observou-se a saturação da enzima e mesmo dobrando-se a quantidade de substrato (10,0 mg/mL) não se observou variação significativa na atividade da enzima PP1A imobilizada (Figura III.3a).

Visualmente, a fluorescência observada com a concentração de 5,0 mg/mL de MUP (\approx 20,0 mM) foi maior do que os ensaios com 1,0 e 2,5 mg/mL, porém não se mostrou diferente em relação às concentrações de 7,5 e 10,0 mg/mL (Figura III.3b). Sendo assim, o ensaio padrão para avaliação do sistema imobilizado foi definido com 5,0 mg/mL de MUP. Estudos demonstram a capacidade de detecção de microcistina-LR em amostras de água utilizando concentrações finais de MUP 25 vezes menor, porém os ensaios foram quantitativos e realizados em micro volumes ($V_{FINAL} = 300 \mu\text{L}$) em placas de 96 poços, exigindo uma manipulação do ensaio mais complexa e o uso de espectrofluorímetro para leitura da amostra (Bouaicha *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2005). O ensaio fluorométrico em macro volumes ($V_{FINAL} = 3,0 \text{ mL}$) otimizado neste estudo, além de permitir uma manipulação mais simples do ensaio, promove uma redução do custo à medida que evita a necessidade de equipamentos de leitura, pois permite a diferenciação visual da reação.

O efeito do substrato sobre o sistema imobilizado também foi avaliado na presença de 0,4 $\mu\text{g/L}$ de Mcyst-LR. Os resultados demonstraram que esta

concentração de microcistina promoveu a redução visual na atividade enzimática nos ensaios para todas as concentrações do substrato (Figura III.3c). Mesmo elevando-se a concentração do substrato, a atividade enzimática do sistema imobilizado não se aproxima da atividade observada nos ensaios realizados na ausência de Mcyst-LR (Figura III.3a).

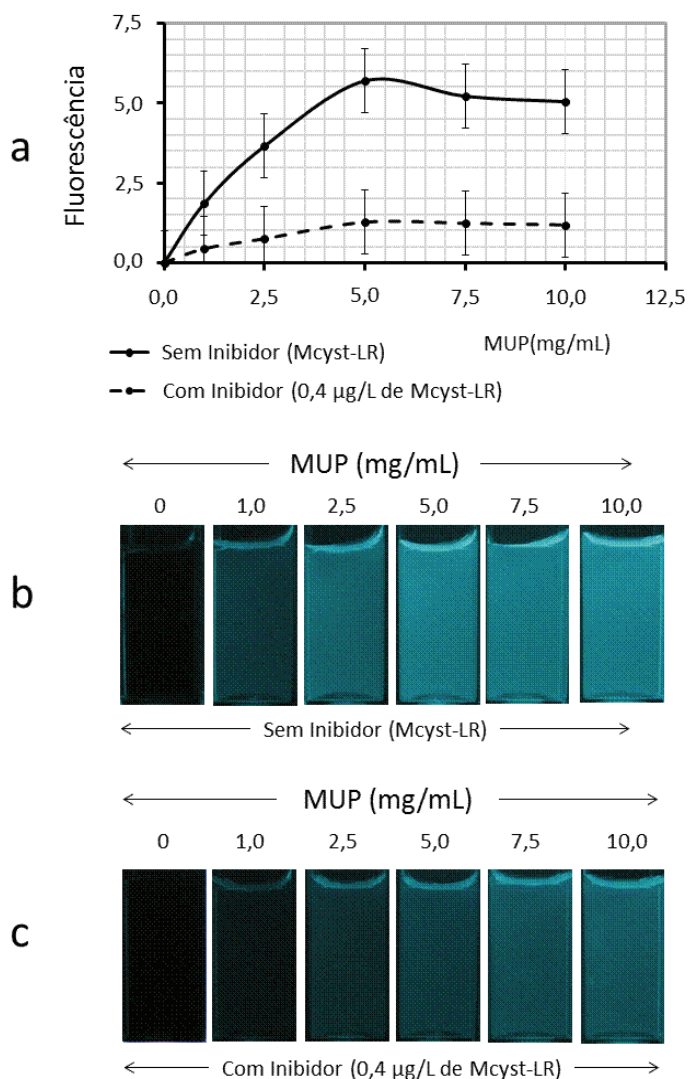


Figura III.3 - (a) Gráfico da atividade da enzima PP1A imobilizada em função do substrato 4-Metil-umbeliferil-fosfato (MUP), na ausência e na presença de 0,4 µg/L de Mcyst-LR (A). Foto das reações com diferentes quantidades de MUP, na ausência (b) e na presença de Mcyst-LR (c).

A atividade da PP1A imobilizada aumentou linearmente até a concentração de 5,0 mg/mL de MUP, iniciando-se a partir desse valor, uma estabilização da taxa de reação, sugerindo assim que a atividade da PP1A imobilizada em função da

concentração de MUP segue a cinética do tipo de Michaelis-Menten, tanto no ensaio na ausência quanto na presença de 0,40 µg/L de Mcyst-LR.

Os parâmetros cinéticos de constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) foram calculados utilizando o método de Lineweaver-Burk (Tabela III.1). A inibição da atividade enzimática apresentou-se de forma não competitiva, à medida que os valores de V_{max} obtidos na presença da toxina não se aproximaram dos valores de V_{max} obtidos na ausência da toxina, mesmo com o aumento na concentração do substrato. Além disso, os valores muito próximos de K_m indicam que a afinidade da PP1A imobilizada pelo substrato não se altera pela presença da toxina. Sendo assim, como não se observou a influência da concentração do substrato sobre a inibição provocada pela Mcyst-LR, foi possível utilizar maiores concentrações do substrato, permitindo um menor tempo de reação e principalmente, a observação visual da inibição da reação enzimática, tornando-se desnecessária a utilização de equipamentos analíticos para se realizar uma avaliação qualitativa da presença de microcistina na amostra.

Tabela III.1 - Parâmetros cinéticos da PP1A imobilizada na ausência e na presença de 0.4 µg/L de Mcyst-LR.

Parâmetros	PP1A Imobilizada	
	Sem Inibidor (Mcyst-LR)	Com Inibidor (0.4 µg/L of Mcyst-LR)
Equação da Regressão Linear	$y = 0.400 x + 0.1287$	$y = 1.688 x + 0.5905$
Coefficiente de Determinação (R^2)	0.9742	0.9807
V_{max} (fluorescência/min)	0.259	0.056
K_m (mg/mL)	3.1	2.9
V_{max}/K_m	8.35×10^{-2}	1.9×10^{-2}

A sensibilidade do sistema imobilizado foi avaliada em ensaios com diferentes concentrações de Mcyst-LR. Os resultados foram comparados com ensaios utilizando a enzima PP1A livre em solução (Figura III.4). As reações, realizadas

em cubetas de metacrilato, ao serem dispostas em sequência crescente de concentração de Mcyst-LR, permitiu a observação de diferenças visuais na fluorescência. Para a enzima livre, a ausência de fluorescência pode ser visualmente observada em ensaios com concentrações de Mcyst-LR acima de 0,2 $\mu\text{g/L}$ (Figura III.4a), já para enzima imobilizada, em ensaios acima de 0,8 $\mu\text{g/L}$ de Mcyst-LR (Figura III.4b). As curvas de inibição obtidas com a enzima PP1A livre e imobilizada demonstraram uma resposta logística sigmoide (Figura III.4c), típica dos ensaios de inibição da enzima fosfatase na presença de microcistinas.

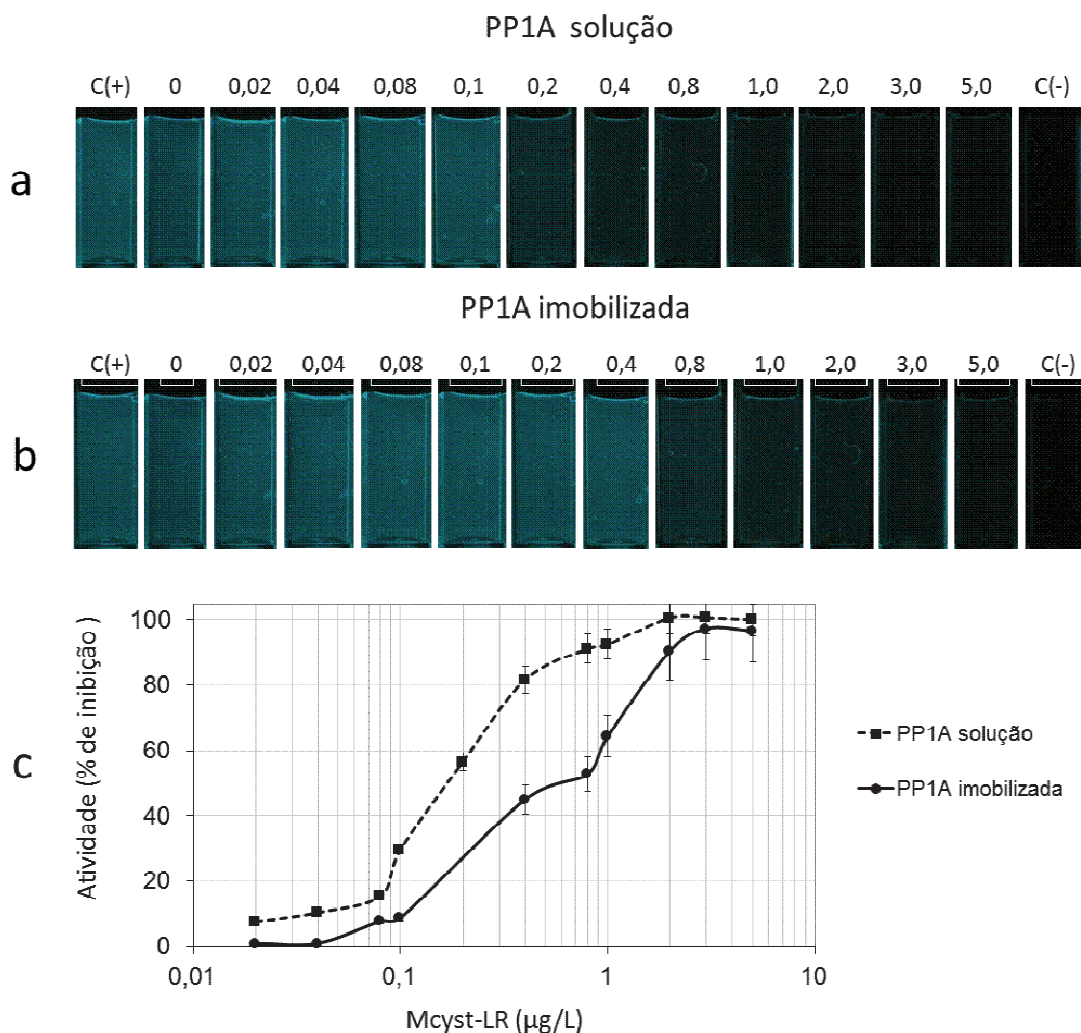


Figura III.4 - Foto das reações com a enzima PP1A livre (a) e imobilizada (b), na presença de Mcyst-LR nas concentrações entre 0,02 e 5,0 $\mu\text{g/L}$. (c) Gráfico de regressão logística sigmoide de inibição da enzima PP1A.

A Tabela 2 resume os parâmetros da regressão logística sigmoide: limite de detecção, o coeficiente de inibição de 50% da reação (CI50) e o coeficiente de correlação da regressão (r). O desempenho obtido nos testes fluorométricos com os dois sistemas, demonstra a maior sensibilidade do sistema livre. O limite de detecção (0,05 µg/L) é 2,0 vezes menor que o valor obtido com o sistema imobilizado (0,11 µg/L). O valor de CI50 obtido com a PP1A livre (0,19 µg/L) é 3,7 vezes menor que o valor observado no sistema imobilizado (0,71 µg/L). Esse comportamento pode estar associado aos impedimentos estéricos, típico de sistemas imobilizados, que resultam na dificuldade de acesso da toxina ao sítio de inibição da enzima. As análises visuais e gráficas permitem observar a menor sensibilidade do sistema imobilizado, porém sem comprometer a eficiência de detecção do sistema, que possibilita identificar amostras com concentrações de Mcyst-LR maiores que o limite máximo permitido para águas de abastecimento (1,0 µg/L), estabelecido pela legislação brasileira.

Tabela III.2 - Parâmetros da curva derivada da regressão logística sigmoide para inibição da enzima PP1A livre e imobilizada por diferentes concentrações de Mcyst-LR.

PP1A	Equação Logística Sigmoide	Coeficiente de correlação (r)	Limite de Detecção (µg/L)	CI ₅₀ (µg/L)
Livre	$y = \frac{94,6}{1 + (10,9 e^{13,2x})}$	0,9914	0,05	0,19
Imobilizada	$y = \frac{95,6}{1 + (7,4 e^{-3,0x})}$	0,9711	0,11	0,71

3.4. EFEITO DA MATRIZ DE AMOSTRAS DE ÁGUA

Os principais métodos de detecção de microcistinas não permitem o seu monitoramento em tempo real, pois antes da análise, exigem além da coleta, um pré-processamento da amostra. A avaliação dos efeitos da matriz de uma amostra de água da lagoa Juara sobre o desempenho do sistema com a enzima

imobilizada demonstrou que a capacidade de avaliar a presença da microcistina nas amostras foi a mesma tanto para amostra “*in natura*” quanto para a amostra processada por filtração direta (Figura II.5a). Alíquotas da amostra sem filtrar (SF) e da amostra filtrada (F) também foram fortificadas com Mcyst-LR na concentração final de 1,0 µg/L. Nas amostras não fortificadas, independentemente da filtração, o sistema enzimático não detectou a presença de microcistina tanto na amostra sem filtrar não fortificada (SFNFort) quanto na amostra filtrada não fortificada (FNFort). Além disso, a detecção da toxina nas amostras fortificadas não sofreu interferência da matriz, pois tanto a amostra não filtrada e fortificada (SFFort) quanto a amostra filtrada e fortificada (FFort) demonstraram o mesmo efeito de inibição sobre o sistema enzimático (Figura III.5b).

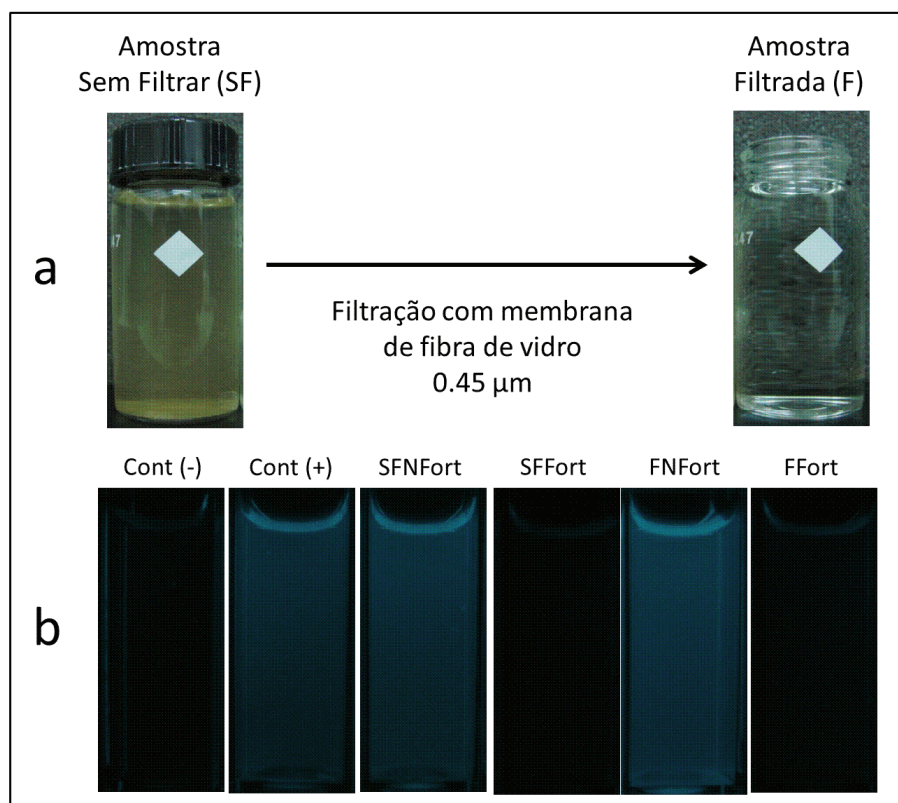


Figura III.5 - Atividade do sistema imobilizado de detecção aplicado em amostra de água da lagoa Juara “*in natura*” não fortificada (SFNFort) e fortificada com 1,0 µg/L (SFFort) de Mcyst-LR e processada por filtração direta não fortificada (FNFort) e fortificada com 1,0 µg/L de Mcyst-LR (FFort). Cont (-): ausência de reação enzimática/presença de Mcyst-LR. Cont (+): reação enzimática positiva/ausência de Mcyst-LR.

Além do sistema detectar a presença de microcistinas em amostras “*in natura*”, sem a necessidade de qualquer pré-processamento da amostra, também não se observou a influência da matriz da amostra na resposta enzimática (Figura III.6).

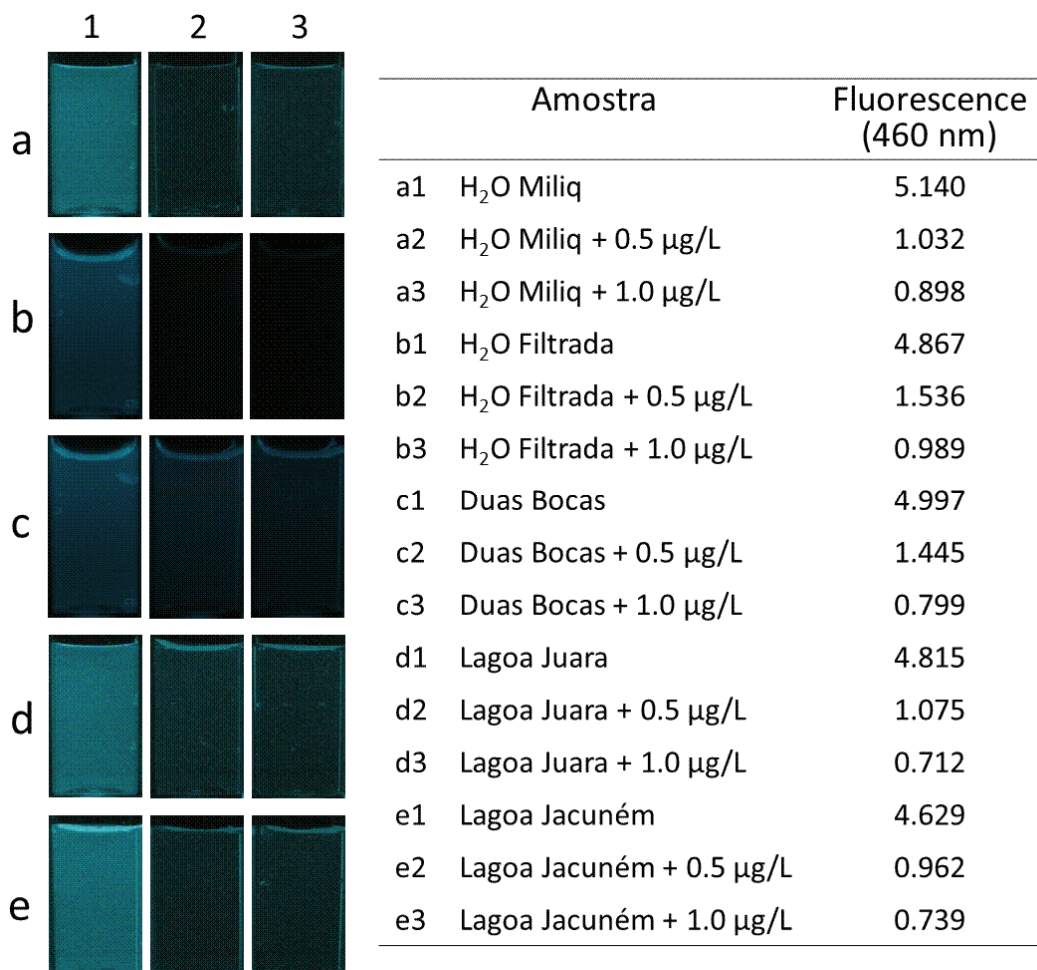


Figura III.6 - Atividade do sistema imobilizado de detecção aplicado em amostras de águas de diferentes origens (ultrapura, filtrada, Duas Bocas, Juara e Jacuném) não fortificadas e fortificadas com 0,5 e 1,0 µg/L de Mcyst-LR.

Amostras de águas de diferentes origens: água miliQ (ultrapura), água filtrada (água de torneira), amostra do lago de Duas Bocas (água bruta destinada ao abastecimento público) e amostras das lagoas Juara e Jacuném (águas com histórico de contaminação com cianobactérias), não fortificadas e fortificadas com 0,5 e 1,0 µg/L de Mcyst-LR foram avaliadas pelo sistema enzimático imobilizado. Os ensaios com as amostras não fortificadas apresentaram reação enzimática positiva para todas as amostras de águas avaliadas. Já as respostas enzimáticas

negativas das amostras fortificadas demonstram que a observação visual da redução da fluorescência deve-se exclusivamente à presença da toxina. Para todas as amostras de águas avaliadas, não se observou a interferência da matriz capaz de prejudicar a identificação da presença da toxina, mesmo na concentração de Mcyst-LR de 0,5 µg/L. Além disso, os valores medidos no espectrofluorímetro demonstram proporcionalidade entre a perda de fluorescência e o aumento da concentração da toxina.

3.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO

A avaliação de amostras de água do reservatório de Duas Bocas e das Lagoas Juara e Jacuném, coletadas mensalmente, no período de junho de 2011 a maio de 2012 foram avaliadas pelo sistema imobilizado de detecção de microcistina. O desempenho do sistema imobilizado foi avaliado por comparação entre os resultados de presença/ausência de microcistina nas amostras e os níveis da toxina, quantificados pelos seguintes métodos de referência: ensaios enzimáticos com a enzima livre (PP1A livre), imuno-ensaio (ELISA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A presença/ausência de microcistinas nas amostras foi detectada pelo sistema imobilizado por diferenciação visual de fluorescência, com base nos controles (-) e (+) para a reação enzimática. O controle (-) refere-se ao sistema sem a enzima imobilizada e no ensaio enzimático no lugar da amostra, adicionou-se água destilada. A ausência de reação enzimática foi classificada como positiva para presença de microcistina, uma vez que a toxina inibe a ação da enzima fosfatase. O controle (+) refere-se ao sistema com a enzima imobilizada e no ensaio, adicionou-se água destilada como amostra. A reação enzimática positiva

representa a amostra negativa para microcistinas, com máxima atividade da enzima devido à ausência de inibição.

Para as amostras coletadas em outubro de 2011, por exemplo, o sistema enzimático imobilizado classificou a amostra de Duas Bocas como negativa para a presença de microcistinas e para as amostras das lagoas o resultado obtido foi positivo para a presença da toxina. Estes resultados qualitativos foram comprovados pelas análises quantitativas (PP1A livre, ELISA e CLAE) que não detectaram a presença da toxina na amostra de Duas Bocas, porém nas amostras das lagoas os níveis de toxina detectados foram maiores que 2,0 µg/L para lagoa Juara e maiores que 1,89 µg/L para a lagoa Jacuném (Figura III.7).

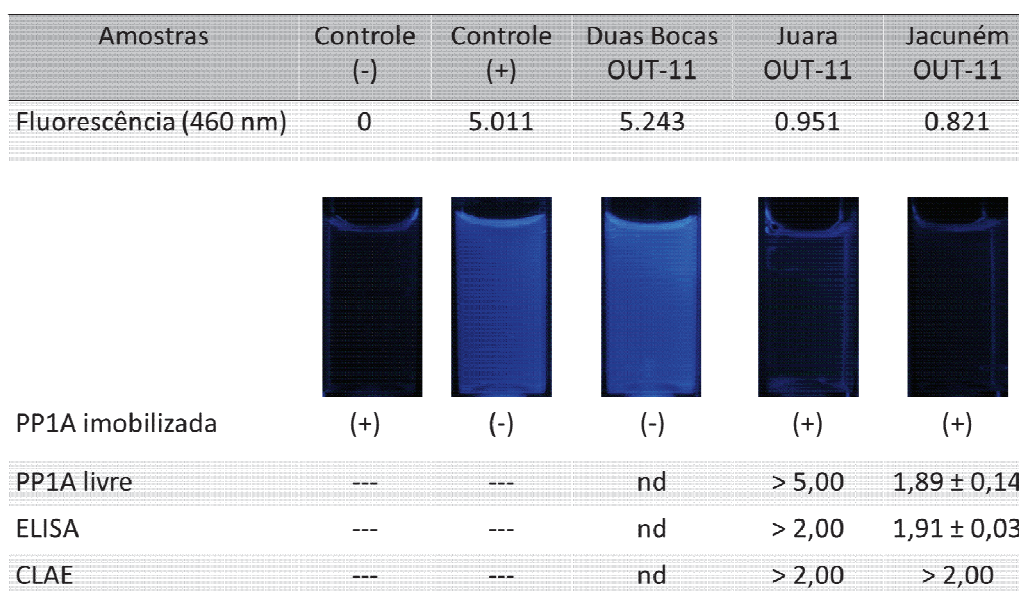


Figura III.7 - Sistema simplificado de PP1A imobilizada para detecção de presença (+) / ausência (-) de microcistinas em amostras ambientais de água, coletadas em outubro de 2011, comparado com métodos tradicionais de separação e quantificação de cianotoxinas: PP1A livre, ELISA e CLAE.

Já para as amostras coletadas em fevereiro de 2012, por exemplo, o sistema enzimático imobilizado classificou todas as amostras como negativa para a presença de microcistinas. Estes resultados qualitativos foram comprovados pelas

análises quantitativas (PP1A livre, ELISA e CLAE) que não detectaram a presença da toxina em nenhuma das amostras (Figura III.8).






Amostras	Controle (-)	Controle (+)	Duas Bocas FEV-12	Juara FEV-12	Jacuném FEV-12
Fluorescência (460 nm)	0	5.003	4.784	4.252	4.162
					
PP1A imobilizada	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
PP1A livre	---	---	nd	nd	nd
ELISA	---	---	nd	nd	nd
CLAE	---	---	nd	nd	nd

Figura III.8 - Sistema simplificado de PP1A imobilizada para detecção de presença (+) / ausência (-) de microcistinas em amostras ambientais de água, coletadas em fevereiro de 2012, comparado com métodos tradicionais de separação e quantificação de cianotoxinas: PP1A livre, ELISA e CLAE.

Os resultados qualitativos e quantitativos obtidos também foram analisados por Tabelas de Contingências. Este tipo de avaliação permite obter uma visão geral sobre o desempenho do método, porém não fornece informações individuais, com relação à probabilidade de erro para cada amostra. A vantagem é que elas podem ser facilmente aplicadas aos vários tipos de bioensaios existentes, inclusive testes bioquímicos. Além disso, as tabelas são frequentemente utilizadas na avaliação da confiabilidade dos testes de triagem, ou seja, testes de caráter qualitativo primário, do tipo presença/ausência, à semelhança da proposta do sistema imobilizado aqui desenvolvido.

O tratamento dos dados obtidos a partir das análises qualitativas das amostras de águas (n = 34) ocorreu com base em dois tipos de resultados possíveis: positivo, maior ou igual a um valor especificado, ou o negativo, menor que o valor

especificado. A partir desta tabela foi possível determinar os parâmetros de desempenho de métodos qualitativos: taxa de confiabilidade (TCF), taxa de falso positivo (TFP), taxa de falso negativo (TFN), taxa de sensibilidade (TS) e taxa de especificidade (TE), segundo metodologias descritas por Trullols *et al.* (2004) e Gondim *et al.* (2011). Considerando o valor de 0,8 µg/L como a concentração mínima de microcistinas na qual se observa visualmente a ausência de fluorescência nas reações com o sistema imobilizado (FIG.4b), amostras com concentrações detectadas, menores que 0,8 µg/L foram classificadas como negativas para a presença da toxina e as amostras com concentrações maiores foram classificadas como positivas.

Os resultados obtidos com o sistema enzimático imobilizado demonstraram taxas de confiabilidade de 79,4% com o método de PP1A livre, 82,4% com o método de ELISA e 88,2% com o método de CLAE (Table 3). A confiabilidade de um método qualitativo é definida como a proporção de resultados corretos (positivos e negativos) de uma bateria de amostras analisadas de forma independente. A confiabilidade é um parâmetro principal dos testes qualitativos, podendo ser relacionada com a exatidão dos métodos quantitativos (Gondim *et al.*, 2011). Sendo assim, o sistema enzimático imobilizado demonstrou ser confiável na determinação da presença de microcistinas em níveis superiores a 0,8 µg/L.

Tabela III.3 - Parâmetros de desempenho qualitativa do método de detecção de microcistinas com o sistema imobilizado, comparados com os métodos tradicionais: PP1A livre, ELISA e CLAE. Taxa de confiabilidade (TCF), taxa de falso positivo (TFP), taxa de falso negativo (TFN), taxa de sensibilidade (TS) e taxa de especificidade (TE).

Método	TCF (%)	TS (%)	TE (%)	TFP (%)	TFN (%)
PP1A livre	79,4	88,9	72,0	28,0	11,1
ELISA	82,4	90,0	75,0	25,0	10,0
CLAE	88,2	91,7	81,8	18,2	8,3

A confiabilidade dos testes qualitativos quando comparados com métodos quantitativos de referência também são avaliados pelas taxas de sensibilidade (TS) e especificidade (TE). Estes parâmetros TS e TE estão associados aos resultados verdadeiros, ou seja, a capacidade do método em responder exatamente igual ao método de referência. A TS é a probabilidade de se obter um resultado negativo quando a amostra for realmente negativa. Já a TE é a probabilidade de se obter um resultado positivo quando a amostra realmente for positiva (Trullols *et al.*, 2004; Gondim *et al.*, 2011).

Os resultados da comparação com os três métodos de referência demonstraram que o método com o sistema imobilizado foi sempre mais sensível do que específico. Da mesma forma, as taxas de falso negativo (TFN) foram sempre menores que a taxa de falso positivo (TFP). Dependendo do objetivo da análise, é preferível que o método seja mais sensível que específico (Gondim *et al.*, 2011). Nas análises de detecção de microcistinas, por exemplo, métodos mais sensíveis são desejáveis, pois diminuem a probabilidade dos resultados falsos negativos.

Os métodos de referência comparados com o sistema imobilizado são baseados em diferentes princípios de detecção e quantificação de microcistinas. O ensaio de ELISA mede a concentração total da toxina na amostra. A técnica de CLAE permite separar e quantificar as diferentes variantes de microcistinas, porém a falta de padrões para maioria das variantes de microcistinas pode subestimar a quantificação da toxina e assim como os ensaios de ELISA, não indicam seu potencial toxicológico, apenas detectam a forma estrutural, ativa ou inativa (Mountfort *et al.*, 2005). A PP1A imobilizada, além do potencial em detectar a toxicidade da microcistinas, demonstrou-se confiável e sensível, tornando-se,

portanto, um sistema de simples execução com potencial para uso no monitoramento desta toxina em amostras de água.

A característica qualitativa do sistema enzimático imobilizado é semelhante ao processo de presença/ausência de outros testes com bioindicadores ambientais de qualidade de águas. Neste sistema de detecção, esta avaliação funciona com um primeiro alarme para tomada de decisão sobre a necessidade do envio de amostras para laboratórios referenciais de avaliação quantitativa. Adotando-se este critério de dois níveis de tomada de decisão, no qual o primeiro nível é qualitativo e segundo nível quantitativo, os custos com a rotina de monitoramento dos níveis de microcistina reduzem significativamente, uma vez que na maior parte das amostras avaliadas não se detecta a presença da toxina. Sendo assim a triagem e o envio apenas de amostras positivas para presença de microcistinas, reduz o número de análises quantitativas que apresentam onerosos custos.

4. CONCLUSÕES

A otimização do ensaio enzimático utilizando o substrato fluorométrico 4-metil-umbeliferil-fosfato (MUP), desenvolvido na forma de reação com a fosfatase-imobilizada, permitiu o desenvolvimento de um sistema qualitativo (P/A) de fácil execução, baixo custo e alta sensibilidade. Na presença de microcistinas, a inibição da atividade enzimática não foi influenciada pela concentração de MUP. A concentração do substrato nos ensaios permitiu um baixo tempo de reação e a possibilidade de observação visual da inibição da reação, sem a necessidade de equipamentos analíticos. O sistema demonstra uma capacidade de determinação visual direta de concentrações da toxina acima de 0,8 µg/L. Quando comparado com métodos de referência na detecção de Microcistinas, o sistema qualitativo

demonstrou taxas de confiabilidade de 82,4% e 88,2%, respectivamente, com os métodos de ELISA e CLAE. Além disso, as taxas de sensibilidade demonstraram a capacidade do método em determinar a ausência da microcistinas nas amostras verdadeiramente negativas, com eficiência superior a 90%. Mesmo sendo aplicado em amostras superficiais de águas de diferentes origens, nas condições avaliadas, o sistema qualitativo foi utilizado sem a necessidade de nenhum processo de concentração ou limpeza das amostras.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo, com bolsa de pesquisa da FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, e financiamento do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da FAPES.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELL, S.G., CODD, G.A. (1994). **Cyanobacterial toxins and human health**. Review Medical Microbiology, v.5, p.256-264.

BLAHA, L.; BABICA, P.; MARSALEK, B. (2009). **Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks**. Interdisciplinary Toxicology. v. 2, n.2, p.36-41.

BOUAICHA, N.; MAATOUK, I.; VINCENT, G.; LEVI, Y. (2002). **A colorimetric and fluorometric microplate assay form the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration**. Food and Chemical Toxicology, v.40, p.1677-1683.

CASSINI, S.T.A.; ANTUNES, P.W.P; KELLER, R. (2013). **Validação de método analítico livre de acetoneitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência**. Química Nova, v.XY, 1-6, 2013.

CODD, G.A.; MORRISONZ, L.F.; METCALF, J.S. (2005). **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection**. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005; v.203, p.264–272.

GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G., SOUZA, S.V.C. (2011). **Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos**. Revista Instituto Adolfo Lutz, v.70, n.4, p.443-447.

HERESZTYN, T.; NICHOLSON, B.C. (2001). **Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay**. Water Research. v.35. n.13. p.3049-3056.

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

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. (1990). **Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants**. FEBS Letters. v.264. p.187-192.

MATSUHIMA, R.; YOSHIZAWA, S.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; FURUSAWA, M.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (1990) ***In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts.** Biochemistry and biophysical Research Communication. v.171. p.867-874.

MCELHINEY, J., LAWTON, L.A. (2005). **Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins.** Toxicology and Applied Pharmacology, v.203, p.219– 230.

MOUNTFORT, D.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. (2005). **Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS.** Toxicon. v.45. p.199-206.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. (2000). **Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil.** Nova Hedwigia, Weinheim, v.71, n.3/4, p.359-385.

RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. (2002). **Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods.** Analytica Chinica Acta. n.466, p.213-231.

SASSOLAS, A.; CATANANTE, G.; FOURNIER, D., MARTY, J.L. (2011). **Development of a colorimetric inhibition assay for microcystin-LR detection: Comparison of the sensitivity of different protein phosphatase.** Talanta. v.85, p.2498-2503.

SIMONS, B.L.; KING, M.C.; CYR, T.; HEFFORD, M.A.; KAPLAN, H. (2002). **Zero-length cross-linking of lyophilized proteins.** Protein Scientific, v.11, p.1558–1564.

SIRQUEIRA, D.B.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. (2007). **Cianobactérias de águas doce e saúde pública: uma revisão.** Universitas Ciência da Saúde. v.3. n.1. p.109-127.

TAYLOR, R.H.; FOURNIER, S.M.; SIMONS, B.L.; KAPLAN, H.; HEFFORD, M.A. (2005). **Covalent protein immobilization on glass surfaces: Application to alkaline phosphatase.** Journal of Biotechnonology. v.118, p.265-269.

TRIANANTIS, T.; TSIMELI, K.; KALOUDIS, T. THANASSOULIAS, N.; LYTRAS, E.; HISKIA, A. (2010). **Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking Waters.** *Toxicon*, v. 55, p. 979–989.

TRULLOLS, E.; RUISANCHEZ, I.; RIUS, F.X. (2004). **Validation of qualitative analytical methods.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, n.2, p.137-145.

YOSHIZAWA, S.; MATSUHIMA, R.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (1990). **Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity.** *Journal Cancer Resarch Clinical Oncology*. v.116. p.609-614.

DISCUSSÃO FINAL

O monitoramento realizado em amostras de água de diferentes mananciais da região metropolitana de Vitória-ES demonstrou a presença de pelo menos uma variante de microcistina em 57% das amostras, e em 20%, a concentração foi superior a 1,0 µg/L, valor máximo permitido pela Legislação Brasileira, para águas de abastecimento público. O elevado número de amostras positivas para a presença da toxina demonstra a necessidade do monitoramento contínuo, visto que alguns mananciais avaliados (reservatório de Duas Bocas e rios Jucu e Santa Maria) são utilizados no abastecimento público de mais de 1.750.000 habitantes, aproximadamente 50 % da população do estado do Espírito Santo (Brasil 2013). Além disso, as lagoas Juara e Jacuném, apresentam usos predominantes para recreação e pesca, necessitando, assim, de estudos relacionados com a distribuição desta toxina nos diversos níveis tróficos, visando assegurar uma completa avaliação dos riscos à saúde humana associada à ocorrência de microcistinas.

A ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas não é um fenômeno local, regional ou específico de um só país, mas de proporções globais. No Brasil, o problema é intensificado, pois sendo a maior parte do território localizado na região tropical e com menos de 50 % dos esgotos tratados, suas águas se encontram em processo potencial de desenvolvimento de florações de cianobactérias tóxicas (Graham, 2007; Sant'anna *et al.*, 2008). Isto porque este fenômeno está relacionado, principalmente, com as alterações na proporção dos nutrientes inorgânicos, nitrogênio e fósforo, e aos fatores físicos e químicos, como temperaturas elevadas e pH alcalino (Sant'anna e Azevedo, 2000; Figueredo *et al.*, 2004). Os resultados de monitoramento dos parâmetros físico-químicos

demonstraram que os mananciais avaliados se enquadram neste perfil com as temperaturas médias acima de 20 °C e pH variando de neutro a levemente alcalino. A lagoa Jacuném com temperaturas médias de 28 ± 2 °C e pH de $8,0 \pm 0,9$ foi o ambiente que apresentou os maiores níveis médios de clorofila-a e em 87 % das amostras foi observada a presença de microcistinas.

Apesar da preocupação crescente com os efeitos tóxicos das florações de cianobactérias desde os incidentes no interior da Bahia (Teixeira *et al.*, 1993) e em Pernambuco (Azevedo *et al.*, 2002), a maior parte dos trabalhos no país estão relacionados com ecologia e fisiologia destes organismos nos diferentes ecossistemas (Azevedo *et al.*, 1994; Yunes *et al.*, 1996; Sant'anna e Azevedo, 2000; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2003; Dorr *et al.*, 2010), há ainda poucas informações sobre as variações espaciais e temporais dos níveis de microcistinas nos mananciais brasileiros. No estado do Espírito Santo, o panorama não é diferente, mesmo os estudos sobre a dinâmica destes organismos ainda são poucos (Delazari-Barroso *et al.*, 2007; Fernades *et al.*, 2009). Isto porque os laboratórios no estado ou não apresentam infraestrutura para a análise de microcistinas ou não demonstram interesse por se tratar de análises realizadas com métodos quantitativos onerosos e demoradas.

Visando à disponibilização de um método quantitativo referencial para análise de microcistinas com potencial de utilização no sistema de vigilância da qualidade de água no estado do Espírito Santo, foi padronizado e validado um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para detecção e quantificação de microcistinas. Técnicas cromatográficas para análise desta toxina, em geral, utilizam acetonitrila como componente orgânico da fase móvel (Rapala *et al.*,

2002; Mountfort *et al.*, 2005; Albuquerque-Junior *et al.*, 2007), porém a variabilidade do preço e da disponibilidade deste solvente, associada à sua toxicidade, incentiva a utilização de outros métodos, livres de acetonitrila (Purdie *et al.*, 2009). A utilização de metanol como alternativa ao uso da acetonitrila como modificador orgânico deve-se à sua menor toxicidade (Fishbein, 1997) e ao fato deste solvente apresentar seletividade semelhante às técnicas cromatográficas que utilizam acetonitrila (Rafferty *et al.*, 2011). Além disso, nas análises de microcistinas, o metanol é o principal solvente de extração da toxina a partir de células de cianobactérias. A sua utilização, portanto, além de reduzir custos e toxicidade em relação ao uso de acetonitrila, ainda diminui o grau de limpeza necessária para a remoção de possíveis interferentes presentes na amostra (Purdie *et al.*, 2009).

A validação do método utilizando metanol como componente orgânico atendeu diferentes tipologias de água, apresentando limites de detecção entre 0,17 e 0,25 µg/L e de quantificação entre 0,55 e 0,82 µg/L, para as variantes de Mcyst-RR, -YR, -LR e -LA. Sistemas de separação de microcistinas utilizando acetonitrila como modificador orgânico, quando associado ao sistema de detecção por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization-Time of Flight*), apresentaram valores de LOD e LOQ de 0,05 e 0,15 µg/mL, para Mcyst-LR (Abuquerque Junior *et al.*, 2007). Quando o sistema de detecção foi do tipo ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass spectrometry*), a capacidade de detecção foi ainda maior, com o LOD de 0,002 µg/mL (Zhang *et al.*, 2004). O método validado demonstrou seletividade e linearidade para separar e quantificar as variantes de microcistina-RR, -YR, -LR e -LA. A precisão do método foi observada pelos níveis de recuperação entre 98,2 e a 106,1%.

Análises de microcistinas em amostras de água são realizadas por métodos de referência já padronizados e validados, porém as suas aplicações na rotina de monitoramento ambiental ainda é limitada (Triants *et al.*, 2010). A necessidade de equipamento, mão de obra qualificada e trabalhosos métodos de concentração e clarificação de amostras ambientais, elevam os custos operacionais de quantificação de microcistinas. Tais custos não são justificados pelo fato da maior parte das amostras serem negativas para a presença de microcistinas. O sistema qualitativo (P/A) desenvolvido é capaz de reduzir os significativamente os gastos com as análises de microcistinas, devido sua eficiência na triagem das amostras. De fácil execução, baixo custo e alta sensibilidade, o sistema funciona como um pré-análise de presença e ausência da toxina, seguida de procedimentos analíticos de quantificação apenas para as amostras que apresentarem resultados positivos.

Em 2011, a Portaria n.º 2.914/2011, do Ministério da Saúde reafirmou a obrigatoriedade da análise de microcistina, de acordo com a densidade de cianobactérias observada (Brasil, 2011). A legislação brasileira limita a concentração desta toxina em águas para consumo humano em 1,0 µg/L, sendo aceitável a concentração de até 10,0 µg/L, em até 03 amostras, consecutivas ou não, em análises realizadas nos últimos 12 meses (Brasil, 2006). O sistema qualitativo permite a determinação visual direta da presença de microcistinas em concentrações acima de 0,80 µg/L. Além de desnecessária a utilização de equipamentos analíticos para determinar a presença da toxina, a sensibilidade para concentrações maiores que 0,8 µg/L permite a classificação das amostras dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira, evitando riscos à saúde pública.

Técnicas de ELISA ou CLAE são exemplos de métodos analíticos com comprovada eficiência de detecção e quantificação, sendo, portanto, referência nas análises de microcistinas (Trullols *et al.*, 2004). A análise de presença e ausência realizada em 34 amostras de água pelo sistema qualitativo (P/A) demonstrou taxas de confiabilidade de 82,4 % e 88,2 % com os níveis quantificados, respectivamente, pelos métodos de ELISA e CLAE. A confiabilidade é o parâmetro dos testes qualitativos, relacionado com a exatidão dos métodos quantitativos (Gondim *et al.*, 2011). Sendo assim, o sistema demonstra ser confiável na determinação da presença de microcistinas em níveis superiores a 0,8 µg/L.

Mesmo sendo aplicado em amostras superficiais de águas de diferentes origens, nas condições avaliadas, o sistema qualitativo foi utilizado sem a necessidade de nenhum processo de concentração ou limpeza das amostras. Além disso, as taxas de sensibilidade demonstraram a capacidade do sistema em determinar a ausência da microcistinas nas amostras verdadeiramente negativas, com eficiência superior a 90%. Altas taxas de sensibilidade são desejáveis nos métodos de detecção de toxicidade, pois diminuem a probabilidade dos resultados falsos negativos e a liberação de amostras potencialmente tóxicas.

CONCLUSÃO FINAL

- A validação da técnica de CLAE utilizando metanol como componente orgânico atendeu a amostras de águas de diferentes origens, reduziu a toxicidade do método ao substituir a acetonitrila e ainda diminuiu o gasto de solvente com a redução do fluxo. A técnica se mostrou específica, precisa e robusta. Associada ao procedimento de extração apresentou elevados níveis de recuperação, demonstrando toda a capacidade de ser utilizado como método de referência na análise de microcistinas em amostras de água de diferentes origens.
- A avaliação mensal de amostras de água coletadas em mananciais superficiais localizados na da região metropolitana de Vitória-ES indicou presença de pelo menos uma variante de microcistina em 57% das amostras. Além disso, as altas frequências de detecção e fato de 20% das amostras ter apresentado níveis de toxina superior a 1,0 µg/L reforça a necessidade de um monitoramento intensivo, visto que alguns dos mananciais avaliados estão relacionados ao abastecimento público.
- A relação direta apresentada entre os níveis de microcistina total e os parâmetros de clorofila-a, fósforo total, nitrogênio total, temperatura e pH demonstram que a qualidade da água destes mananciais, além de favorecer o desenvolvimento de cianobactérias, estimula a produção de Microcistinas, principalmente nas lagoas Juara e Jacuném. Nestas lagoas, devido à alta concentração e frequência de detecção de microcistina, medidas de controle devem ser aplicadas para garantir que esses corpos d'água não ofereçam riscos por exposição direta via recreação ou por

exposição indireta por consumo de pescado provenientes destes mananciais.

- O sistema simplificado de avaliação qualitativa (P/A) desenvolvido para as análises de microcistina permitiu a determinação visual direta de concentrações da toxina acima de 0,80 µg/L, em amostras de água de diferentes origens. Comparado com métodos de referência, o sistema demonstrou altas taxas de confiabilidade. Além disso, a sensibilidade apresentada permitiu uma alta eficiência na determinação da ausência da toxina em amostras verdadeiramente negativas. Mesmo sendo aplicado em amostras superficiais de águas de diferentes origens, nas condições avaliadas, o sistema qualitativo foi utilizado sem a necessidade de nenhum processo de concentração ou limpeza das amostras.
- As concentrações e as altas frequências de detecção de microcistina nas amostras de água da região metropolitana de Vitória-ES indicam a necessidade de se estabelecer estratégias de identificação e controle desta toxina. A capacidade do sistema qualitativo de atender aos critérios da legislação de qualidade de águas, sua facilidade operacional e seu baixo custo demonstra o enorme potencial de aplicação do sistema na rotina de monitoramento dos níveis de microcistinas, inclusive em pequenas e médias comunidades. A avaliação qualitativa (P/A) apresentada pelo sistema pode ser utilizada como uma ferramenta mais ágil na avaliação da toxicidade das amostras e na decisão da necessidade do envio de amostras para laboratório referenciais de análise quantitativa.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA FINAL

ALBUQUERQUE JÚNIOR, E.C.; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. (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, p.1-9.

AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. (1994). **First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** Journal of Applied Phycology, v.6, n.3, p.261-265.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. (2002) **Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil.** Toxicology. v.181, p.441-446.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, M. (2003). **Cianobactéria invasora. Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 3, p. 82-90, 2003.

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

Brasil (2011). **Portaria Nº.914/2011, de 12 de dezembro de 2011.** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diário Oficial da União. Brasília, 34p.

BRASIL (2013). **IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** <http://www.ibge.gov.br>, site acessado dia 15-05-2013.

DELAZARI-BARROZO, A., SANT'ANNA, C.L., SENNA, P.A.C. (2007). **Phytoplankton from Duas Bocas Reservoir, Espírito Santo State, Brazil.** Hoehnea, v.34, n.2, p.211-229.

DORR, F.A.; PINTO, E.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (2010). **Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence toxicity and toxicological assays.** Toxicon. v.56. p.1427-1256.

FERNANDES, V.O.; CAVATI, B.; SOUZA, B.A.; MACHADO, R.G.; COSTA, A.G. (2009). **Lagoa Mãe-Bá (Guarapari-Anchieta, ES): Um ecossistema com potencial de floração de cianobactérias?** Oecologia Brasiliensis, v.13, n.2, p.366-381.

FIGUEREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. (2004). **Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v.59. p.151-163.

GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G., SOUZA, S.V.C. (2011). **Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v.70, n.4, p.443-447.

GRAHAM, J.L. (2007). **Harmful Algal Blooms.** Science for a changing world. U.S. Department of the Interior. U.S. Geological Survey.

MOUNTFORT, D.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. (2005). **Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS.** Toxicon. v.45. p.199-206.

PURDIE, E.L.; YOUNG, F.M.; MENZEL, D.; CODD, G.A. (2009). **A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase.** Toxicon. p.1-4.

RAFFERTY, J.L.; SIEPMANN, J.I.; SCHURE, M.R. (2011). **Mobile phase effects in reversed-phase liquid chromatography: A comparison of acetonitrile/water and methanol/water solvents as studied by molecular simulation.** Journal of Chromatography A, v.1218, p.2203–2213.

RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. (2002). **Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods.** Analytica Chinica Acta. n.466, p.213-231.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. (2000). **Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil.** Nova Hedwigia, Weinheim, v.71, n.3/4, p.359-385.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R., DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. (2008). **Review of toxic Cyanobacteria in Brazil**. *Algological Studies*, Stuttgart, v. 126, p. 215-265.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; CARVALHO, V.L.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. (1993). **Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil**. *Bulletin of PAHO*, v.27, n.3, p.244-253.

TRIANIS, T.; TSIMELI, K.; KALOUDIS, T.; THANASSOULIAS, N.; LYTRAS, E.; HISKIA, A. (2010). **Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters**. *Toxicon*, v.55, p.979-989.

TRULLOLS, E.; RUISANCHEZ, I.; RIUS, F.X. (2004). **Validation of qualitative analytical methods**. *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, n.2, p.137-145.

YUNES, J.S., SALOMON, P.S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K.A., RAGGETT, S.L., CODD, G.A. (1996). **Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil**. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, v.5, p.223-229.

ZHANG, L.; PING, X.; YANG, Z. (2004). **Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector**. *Talanta*, v.62, p.193-200.