UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RENATA MARIA CORTEZ BORGES

Identificação e Quantificação de microcistinas por HPLC em
reservatórios de água

LORENA
2008

RENATA MARIA CORTEZ BORGES

Identificação e Quantificação de microcistinas por HPLC em
reservatórios de água

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia Industrial

Área de concentração: Conversão de Biomassa
Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves

LORENA
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Borges, Renata Maria Cortez

Identificação e quantificação de microcistinas por HPLC em reservatórios de água / Renata Maria Cortez Borges ; orientador Adilson Roberto Gonçalves. – Lorena: 2008.

63 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Água (análise) 2. Microcistina-LR 3. HPLC 4. Microcystis 5. Cianobactérias 6. Cianotoxinas. I. Título.

543.3 - CDU

*Aos meus pais Ary e Raimunda pelo
incentivo e confiança depositada, e a
minha irmã Maria Cláudia pelo
carinho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos oferecidos na realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Luciana Retz de Carvalho, pesquisadora da seção de Ficologia do Instituto de Botânica, pelos seus ensinamentos, conselhos e auxílios no decorrer deste trabalho científico, sua atenção foi indispensável nesta conquista.

Ao Prof. Dirceu Gonçalves pelo incentivo e auxílio no decorrer da dissertação.

A AMPRO Laboratório e Engenharia Ltda EPP pela confiança depositada, e por fornecer a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

Ao técnico Bruno, pela ajuda nas análises cromatográficas.

Ao amigo José Henrique pela dedicação e auxílio na preparação das amostras.

Aos meus amigos Gina e Cláudio, companheiros de trabalhos e estudos na madrugada. Vocês fazem parte da minha conquista, serei sempre grata por tudo.

Ao Alessandro, meu eterno agradecimento, pela paciência, compreensão, carinho e amor.

Aos meus pais Ary e Raimunda, pelo incentivo e confiança depositado em mim. Vocês são a razão pela qual batalho todos os dias, os grandes responsáveis por todas as minhas realizações. Obrigada por tudo!

A minha irmã Maria Cláudia pelo companheirismo, paciência, tolerância, e pelo imenso amor que há entre nós.

A todos meus amigos que me incentivaram e me apoiaram ao longo deste trabalho.

A Deus por sempre estar presente na minha vida.

RESUMO

BORGES, R.M.C. **Identificação e quantificação de microcistinas por HPLC em reservatórios de água**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

A oferta de água vem se tornando cada vez mais diminuta à medida que a população, a indústria e a agricultura se expandem. A contaminação dos mananciais gerada pelo descarte de efluentes domésticos e industriais leva a eutrofização, processo pela qual grande aporte de nutrientes, particularmente fosfatos, leva ao crescimento excessivo de algas. As cianobactérias são microrganismos procariontes, que vivem nos ambientes mais adversos. A floração dessas algas quando presente em mananciais destinados ao consumo humano gera sérios problemas à saúde humana, pois algumas dessas algas podem gerar toxinas, conhecidas como hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas, de acordo com sua ação farmacológica. Dentre as hepatotoxinas encontramos a microcistina, um heptapeptídeo cíclico que pode levar à morte em horas ou dias. O objetivo desse estudo foi viabilizar a técnica HPLC, já proposta por outros autores, para quantificar microcistinas-LR em reservatórios de água, em escala empresarial para ser implementada em laboratórios de análise de águas. Para o desenvolvimento da técnica, foram utilizadas amostras de uma lagoa com floração de *Microcystis*. Para determinar a eficiência da técnica cromatográfica, foram realizados estudos com outro método, através do kit ELISA. Nessa etapa do trabalho, verificou-se que a técnica HPLC é mais sensível e viável para a quantificação das microcistinas. Nos experimentos realizados com a cromatografia líquida, observou-se que a coluna C-18 LiChrosorb (25 cm) 7 µm utilizada no método, e o solvente metanol apresentaram grande influência nos resultados. À medida que os experimentos foram executados, verificou-se o decréscimo da sensibilidade da coluna. Os resultados foram satisfatórios apenas após a limpeza realizada na coluna, onde os padrões apresentaram uma curva de correlação igual a 0,92. Este fato leva a concluir que as colunas precisam ser renovadas para análises mais sensíveis, como no caso das microcistinas. As amostras extraídas com metanol apresentaram resultados relevantes, isto é, quanto maior a concentração de metanol utilizado na extração, maior a concentração de microcistina-LR obtida nos resultados, concluindo o metanol ser o solvente apropriado para a extração. Por fim, conclui-se que o método desenvolvido é viável, apresentando algumas dificuldades para sua implantação em escala empresarial.

PALAVRAS-CHAVE: Água (análise). Microcistina-LR. HPLC. *Microcystis*. Cianobactérias. Cianotoxinas.

ABSTRACT

BORGES, R.M.C. **Identification and Quantification of microcystins through HPLC in water reservoirs** . 2008. 63 f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

The water supply has been decreasing more and more as the population, industry and agriculture expand. The contamination of the water sources generated by the domestic and industrial effluents discharges leads to the eutrophization, process where the large presence of nutrients, particularly phosphates, causes excessive increase of algae. The cyanobacteria are procaryote microorganisms which live in the most diverse environments. The florescence of the algae when present in sources directed to human consumption generates serious problems to the human health, for some of them may produce toxins known as hepatotoxins, neurotoxins and dermatotoxins, according to their pharmacological action. Among the hepatotoxins, the microcystin, a cyclic heptapeptide that can lead to death in hours or days, is found. The objective of this study was to make feasible the use of the HPLC technique, already proposed by other authors, to quantify microcystins-LR in water reservoirs, in enterprise scale to be implemented in water analysis laboratories. In order to develop the technique, samples of water from a pond with *Microcystis* florescence were utilized. To evaluate the efficiency of the chromatographic technique, studies were performed with another method, through the ELISA kit. In this phase of the work, it was verified that the HPLC technique is the most sensible and viable for the quantification of the microcystins. It was observed, in the experiments performed with the liquid chromatography, that the column C-18 LiChrosorb (25 cm) 7 µm utilized in the method and the methanol solvent presented great influence in the results. As the experiments were realized, the decrease of the sensibility of the column was verified. The results were satisfactory only after the column being cleaned, when the patterns presented a curve of correlation equal to 0.92. This fact leads to the conclusion that the columns need to be renewed for more sensible analysis, like in the case of the microcystins. The samples extracted with methanol presented relevant results, that is, the greater the concentration of the methanol utilized, the higher the concentration of microcystin-LR obtained in the results, leading to the conclusion that methanol was the solvent adequate to the extraction. Finally, it was concluded that the method developed is feasible, presenting some difficulties concerning its implantation in enterprise scale.

KEYWORDS: Water (analysis). Microcystin-LR. HPLC. *Microcystis*. Cyanobacteria. Cyanotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas	18
Figura 2: Floração de cianobactérias (Lagoa do Instituto de Botânica)	20
Figura 3: Estrutura da microcistina e suas variações.....	24
Figura 4: Estrutura geral das microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas.....	25
Figura 5: Estrutura das neurotoxinas	27
Figura 6: Localização geográfica do município de Porto Real, RJ	35
Figura 7: <i>Microcystis</i>	41
Figura 8: Perfil cromatográfico da amostra AM ₁ 25/25 (Coluna 7 µm – 30 min).....	42
Figura 9: Perfil cromatográfico da amostra AM ₁ 40/10 (Coluna 7 µm – 30 min)	43
Figura 10: Perfil cromatográfico do Padrão 1 (Coluna 7 µm – 30 min)	43
Figura 11: Replicata do Padrão 1 (Coluna 7 µm – 30 min).....	44
Figura 12: Perfil cromatográfico do MeOH (Coluna 7 µm – 30 min)	44
Figura 13: Perfil cromatográfico do MeOH (Coluna 7 µm – 60 min)	45
Figura 14: Perfil cromatográfico do Padrão 1 (Coluna 5 µm – 30 min)	47
Figura 15: Perfil cromatográfico do MeOH (Coluna 5 µm – 30 min)	47
Figura 16: Perfil cromatográfico da amostra AM ₁ 5/45 (Coluna 5 µm – 30 min)	48
Figura 17: Perfil cromatográfico do Padrão 1 (Coluna 5 µm – 60 min)	49
Figura 18: Perfil cromatográfico da amostra AM ₁ 5/45 (Coluna 5 µm – 60 min)	49
Figura 19: Gráfico da relação área x concentração (Padrões 1, 2 e 3)	50
Figura 20: Gráfico da relação área x concentração (Padrões 3, 2 e 1)	51
Figura 21: Perfil cromatográfico do Padrão 2 após limpeza (coluna 7 µm – 60 min)	52
Figura 22: Gráfico da curva-padrão da microcistina-LR.....	53
Figura 23: Efeito metanol nos resultados analíticos	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Área em relação ao tempo de retenção	46
Tabela 2: Área dos padrões 1, 2 e 3 analisados sequencialmente	50
Tabela 3: Área dos padrões 3, 2 e 1 analisados sequencialmente	51
Tabela 4: Área dos padrões 3, 2 e 1 obtidas em análises realizadas em dias distintos.....	53
Tabela 5: Tempo de retenção, área e concentração apresentado pelas amostras.....	53
Tabela 6: Efeito do metanol na extração de microcistinas	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 QUALIDADE DAS ÁGUAS	14
3.2 CIANOBACTÉRIAS	17
3.3 CIANOTOXINAS	21
3.3.1 Hepatotoxinas	22
3.3.2 Citotoxinas	24
3.3.3 Neurotoxinas	25
3.3.4 Dermatotoxinas	27
3.4 EVIDÊNCIAS DE INTOXICAÇÕES HUMANAS POR CIANOBACTÉRIAS	28
3.5 REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS DISSOLVIDAS NO TRATAMENTO DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO	29
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE DE CIANOTOXINAS	31
4 METODOLOGIA	35
4.1 AMOSTRAGEM	35
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA FLORAÇÃO	36
4.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	36
4.3.1 Microcistinas extracelulares	36
4.3.2 Microcistinas intracelulares	37
4.3.3 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	38
4.3.3.1 Preparação da fase móvel	38
4.3.3.2 Preparação do padrão	38
4.3.3.3 Limpeza da coluna	39
4.3.3.4 HPLC	39
4.3.3.5 Kit ELISA	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 ANÁLISE QUALITATIVA	41
5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	42
5.2.1 Resultados obtidos da coluna C-18 LiChrosorb (25 cm) 7 µm	42
5.2.2 Resultados obtidos da coluna C-18 Spherisorb (15 cm) 5 µm	46

5.2.3 Resultados obtidos da coluna C-18 LiChrosorb (25 cm) 7 µm após limpeza	50
<i>5.2.3.1 Curva Padrão</i>	<i>51</i>
<i>5.2.3.2 Resultado das amostras</i>	<i>53</i>
5.3 MÉTODO ELISA	55
6 CONCLUSÕES	56
7 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A poluição presente nas bacias hidrográficas, decorrente de fontes poluidoras, tem restringindo a qualidade e a utilização da água para o abastecimento da população, causando sérios problemas à saúde humana e ao meio ambiente. A disposição inadequada dos esgotos domésticos e industriais junto com o uso de agroquímicos são fatores que contribuem para a poluição dos corpos d'água. Os agrotóxicos e os adubos utilizados de maneira exagerada acabam sendo transportados para os rios através de chuvas, acarretando o aumento de nutrientes nesses corpos receptores. Fatores como esses contribuem para a eutrofização, que é o enriquecimento do ambiente por nutrientes, como nitrogênio e fósforo, acarretando o aumento da produtividade biológica, permitindo periódicas florações de algas, tornando a água turva e aumentando sua toxicidade. Considera-se floração quando o número total de células passa a ser maior que a média do corpo d'água. Em alguns casos, o número de células de cianobactérias de um reservatório pode passar em poucas semanas, ou até mesmo poucos dias, de mil células por litro para mais de um milhão de células por litro (MOLICA; CASÉ, 2006). A eutrofização produz mudanças na qualidade da água, incluindo a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, a redução da biodiversidade aquática, a perda de qualidades cênicas, ou seja, as características estéticas do ambiente e seu potencial para lazer, além disso, provoca a morte extensiva de peixes e o aumento da incidência de floração de microalgas e cianobactérias. Essas florações podem provocar o aumento no custo do tratamento da água para abastecimento, além de poder causar diversos problemas para saúde humana. As características fisiológicas, como assimilação do nitrogênio e fósforo do meio aquático, são um dos fatores que levam as cianobactérias predominarem sobre outros grupos fitoplanctônicos (microalgas). De maneira geral, as cianobactérias são menos eficientes na assimilação desses nutrientes, comparado com outras algas. As microalgas (algas verdes ou

diatomáceas, por exemplo), em condições normais crescem mais e melhor. Quando ocorre uma descarga excessiva de nutrientes nos reservatórios, proporciona-se uma maior oferta desses nutrientes, facilitando sua assimilação e o crescimento das cianobactérias (FUNASA, 2003).

O crescimento excessivo desses microrganismos na superfície da água geralmente se dá com predomínio de poucas espécies de cianobactérias produtoras de toxinas, ou de outros metabólitos, que inibem a sua predação por microcrustáceos, larvas de peixes, moluscos, etc. Esses consumidores primários vão preferir consumir microalgas não tóxicas e com maior valor nutricional, contribuindo, com isso, para redução das populações dessas microalgas, o que, por sua vez, resultará numa diminuição drástica da comunidade dos consumidores primários, com consequências em toda a cadeia alimentar do ambiente aquático. Com todo esse processo, resultarão no ambiente somente cianobactérias tóxicas como organismos fitoplanctônicos dominantes. Esse meio aquático, apresentando uma diversidade de espécies bastante reduzida e dominância de cianobactérias tóxicas, é, por sua vez, o manancial de abastecimento que temos disponível em muitas regiões brasileiras (FUNASA, 2003).

Quando ocorre a lise celular dessas cianobactérias nos reservatórios, pode ocorrer a liberação de toxinas (cianotoxinas), que causam diversos problemas à saúde humana e animal, tanto pela ingestão de água como por contato em atividades de recreação no ambiente, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. Entretanto, a principal via de intoxicação é pelo consumo oral da água sem um tratamento adequado para remoção dessas cianotoxinas. Dentre as cianotoxinas, encontramos as neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas), que agem no sistema nervoso, as hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina), que causam danos ao fígado, e as dermatotoxinas que causam reações alérgicas.

Devido à proliferação de cianobactérias e os danos que elas podem acarretar à saúde humana, o Ministério da Saúde estabeleceu na Portaria 518/2004 procedimentos e responsabilidades inerentes ao controle e à qualidade da água para consumo humano. Dentre os parâmetros exigidos, encontram-se o monitoramento do número de células de cianobactérias no ponto de captação e a quantidade de cianotoxinas presentes na água de distribuição (BRASIL, 2004).

Sendo assim, demonstra-se, através desses conceitos, a importância do desenvolvimento de uma técnica eficaz para a identificação e quantificação de cianotoxinas. Dentre as técnicas conhecidas, encontramos o ELISA - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, o PPI - Protein Phosphatase Inhibition, e a CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC na sigla em inglês), que permitem a identificação e quantificação de algumas toxinas. O ELISA e o PPI, apesar de serem métodos sensíveis e de fácil manuseio, apresentam a desvantagem por não medirem a quantidade total de microcistinas e nodularinas em amostras de água.

O método físico-químico mais frequentemente utilizado para a identificação e quantificação de cianotoxinas é o HPLC, pois, além de ser um método sensível e específico, permite a identificação e quantificação individual de microcistinas e nodularinas (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999).

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo é analisar a viabilidade da técnica HPLC para identificação e quantificação de microcistinas em reservatórios de água destinados ao consumo humano, verificando a eficiência, sensibilidade, e praticidade desse método, tornando-se possível detectar o limite mínimo de 1µg/L exigido pela Portaria 518/2004, vigente no momento para o controle da qualidade de água destinada ao consumo humano.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUALIDADE DAS ÁGUAS

Nem só da falta de água nasce o problema do abastecimento público. A má qualidade da água é muitas vezes um fator determinante da escassez, principalmente nas grandes cidades onde a poluição compromete mananciais e acarreta inúmeros problemas, dentre eles enchentes e doenças infecciosas.

Hoje, no mundo, a fonte de abastecimento para consumo humano mais utilizada são as águas subterrâneas. Além de serem um bem econômico, as águas subterrâneas são imprescindíveis, especialmente para as populações que não têm acesso à rede pública de abastecimento ou para aqueles que, tendo acesso a uma rede de abastecimento, têm o fornecimento com frequência irregular (FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001). Essa água pode ser obtida de diferentes fontes. Uma dessas fontes, o manancial subterrâneo, é um recurso utilizado por ampla parcela da população brasileira. A água subterrânea pode ser captada no aquífero confinado ou livre, que fica próximo à superfície, e está, portanto, mais suscetível à contaminação. Em função do baixo custo e facilidade de perfuração, a captação de água do aquífero livre, embora mais vulnerável a contaminação, é mais frequentemente utilizada no Brasil (FOSTER, 1993; SILVA, 1999).

As fontes de contaminação das águas subterrâneas são em geral diretamente associadas ao destino final do esgoto doméstico e industrial em fossas e tanques sépticos. As disposições inadequadas de resíduos sólidos urbanos e industriais, postos de combustíveis e de lavagem, a modernização da agricultura e o chorume oriundo de aterros de lixo representam fontes de contaminação das águas subterrâneas por bactérias, vírus patogênicos, parasitas, substâncias orgânicas e inorgânicas (SILVA; ARAÚJO, 2003; FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001).

A tendência é que, conforme a população urbana vai se expandindo em áreas rurais e periféricas, geralmente de forma não planejada, os mananciais sejam contaminados com o despejo de esgoto e de lixo. Essa contaminação também pode atingir os aquíferos através da perfuração de poços sem cuidado específico e através de fossas sépticas que contaminam os lençóis freáticos, colocando em perigo a saúde dos vizinhos que consomem água desse manancial.

Os riscos associados ao consumo de água podem ser coletivos ou individuais, imediatos ou de longo prazo. Os riscos de curto prazo resultam da poluição da água causada por elementos químicos ou microbiológicos e seus efeitos podem se manifestar em poucas horas ou em algumas semanas após a ingestão. Um simples copo d'água imprópria é suficiente para dar origem a sintomas cuja severidade depende da vulnerabilidade do indivíduo, bem como da natureza do agente infeccioso. Um dos graves problemas do Brasil é a descarga de esgotos sem tratamento, que contaminam os corpos hídricos superficiais e subterrâneos. Por isso é tão importante que exista uma política ambiental que resulte na proteção de mananciais, preservando a água que será utilizada para o abastecimento, além da destinação correta do esgoto.

De acordo com a Organización Panamericana de la Salud (2000), estima-se que serão necessários cerca de 40 bilhões de reais até 2010 para que a população urbana mundial tenha total acesso ao abastecimento de água e saneamento. Enquanto a solução não chega é necessária a conscientização da população para o uso racional da água, assim como seu reaproveitamento.

Um dos grandes problemas da contaminação das águas subterrâneas é a água da chuva que dissolve os resíduos acumulados nos depósitos de lixo e em seguida os carrega para o subsolo, poluindo os poços que servem para o abastecimento público. Por isso, a grande

importância de se obter áreas apropriadas para a perfuração de poços, livres de rejeitos e substâncias tóxicas.

Nos sistemas de distribuição de abastecimento, a qualidade da água pode sofrer uma série de mudanças, fazendo com que a qualidade da água presente na torneira do usuário seja diferente da qualidade da água que deixa a estação de tratamento. Essas mudanças podem ser causadas por variações químicas, biológicas ou por uma perda da integridade do sistema (DEININGER *et al.*, 1992). Essas mudanças podem ser influenciadas pela qualidade química e biológica da fonte hídrica; eficácia do processo de tratamento, reservatório (armazenagem) e sistema de distribuição; idade, tipo, projeto e manutenção da rede (CLARK; COYLE, 1989).

A irregularidade do abastecimento pode ser um grande interferente na qualidade da água. Em virtude das condições precárias de saneantes, a água utilizada no abastecimento pode ser uma grande fonte hídrica de veiculação de doenças, além de apresentar substâncias tóxicas, que podem causar efeitos adversos à saúde (GOYER, 1986).

Devido a um incidente ocorrido no Brasil, no qual 50 pacientes de uma clínica de hemodiálise foram a óbito (JOCHIMSEN *et al.*, 1998), a Fundação Nacional da Saúde, em colaboração com a Organização Panamericana da Saúde, revisou a Portaria 36/MS/90, que definia os padrões de potabilidade da água para consumo humano no Brasil, homologando a Portaria 1469/MS/00 (BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003), que foi revisada e substituída pela Portaria 518 (Brasil, 2004), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água o monitoramento da ocorrência de cianobactérias e algumas cianotoxinas, tanto na água bruta, como na água tratada para consumo humano (BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003). De acordo com a Portaria 518 (BRASIL, 2004),

§ 5º Sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação exceder 20.000 células/mL, será exigida a análise semanal de cianotoxinas na água na saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros) das

clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, sendo que essa análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização semanal de bioensaios em camundongos.

3.2 CIANOBACTÉRIAS

Cianobactérias são microrganismos procariontes, isto é, o núcleo não é delimitado por uma membrana, de origem extremamente remota, que realizam a fotossíntese com liberação de oxigênio, diferente de outras bactérias fotoautotróficas. Devido ao fato de serem fotossintetizantes, aquáticas e possuírem um pigmento azulado (ficocianina), são tradicionalmente conhecidas como algas azuis, apesar da distante relação filogenética com outros grupos de organismos também denominados de algas. Acredita-se que elas foram as responsáveis pelo início da formação da atmosfera atual, rica em oxigênio, e pela evolução de todos os organismos fotossintetizantes, visto que formas relacionadas às atuais cianobactérias provavelmente originaram os cloroplastos através de um evento endossimbiótico. (BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003).

As células procarióticas de cianobactérias podem ser distinguidas das outras algas eucariotas, ao microscópio óptico, pela ausência de plastos. Os pigmentos fotossintéticos e os demais componentes celulares, substâncias de reserva, aerótopos (vesículas gasosas que auxiliam na flutuação), carboxissomos e ribossomos, estão dispersos no protoplasma. A parede celular é semelhante às bactérias Gram-negativas, que possuem uma membrana externa cobrindo uma camada fina de peptideoglicano. Essa camada é encontrada no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e a membrana externa. Essa membrana apresenta fosfolipídeos, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e porinas. Externamente à parede, pode haver ou não um envelope mucilaginoso (cianobactérias cocóides) ou uma bainha mucilaginosa (demais cianobactérias), que são compostos principalmente de polissacarídeos.

O talo pode ser unicelular, colonial ou filamentososo, que neste caso pode ser formado sobre os substratos ou ficar flutuando na água. Os indivíduos unicelulares podem ter formas muito variadas, desde arredondadas, oblongas e elípticas, até cilíndrico-alongadas, fusiformes e piriformes. As colônias podem ser formadas por poucas células ou centenas delas, podendo apresentar morfologia variada, como por exemplo arredondadas, alongadas, tubulares, cúbicas ou irregulares. A mucilagem colonial pode ser opaca, incolor ou amarelada, castanha ou avermelhada. As formas unicelulares e coloniais são chamadas cianobactérias cocóides. Os talos filamentosos podem ser uni- ou multisseriados, apresentar ou não uma bainha mucilaginosa e podem ser ramificados ou não (AZEVEDO; SANT' ANNA, 2006).

Figura 1. Gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas

Fonte: Funasa (2003).

Devido à história evolucionária, as cianobactérias se adaptam a diversos ecossistemas, desde os mais extremos, como geleiras, solos de deserto, fontes termais e em locais com baixa concentração de oxigênio, além de serem tolerantes à luz ultravioleta (UV-B e UV-C). A maior diversidade de cianobactérias, entretanto, é registrada em ambientes marinhos e de água doce com o pH neutroalcalino (pH 6-9) e temperatura entre 15°C a 30°C. Algumas espécies são fixadoras de nitrogênio atmosférico e outras produzem hepatotoxinas ou neurotoxinas. Nos últimos anos, o grupo das cianobactérias tem se destacado, em especial, pelo fato de certas espécies causarem problemas ao abastecimento público, que tem sido agravado devido ao aumento na demanda de água de abastecimento, ao uso inapropriado dos recursos, ou mesmo à necessidade de estocar água com o represamento dos rios (SOUZA, 2006).

A eutrofização é o enriquecimento do ambiente por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, que tem como consequência o aumento da biomassa vegetal e plantas aquáticas. Esse processo é resultado do crescimento incontrolado da população humana e do despejo de efluentes urbanos e industriais ou fertilizantes agrícolas no ecossistema aquático de vários países, incluindo o Brasil (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 1992; VIEIRA *et al.*, 2005). Esse representa o maior problema no controle da água no mundo todo, principalmente em regiões secas, onde a maior consequência da eutrofização é a floração de cianobactérias (COSTA *et al.*, 2006).

Em mananciais utilizados para o abastecimento público, as florações de cianobactérias são definidas em termos de concentração de células, que podem causar danos à saúde devido à produção de cianotoxinas. Essas concentrações podem ser estimadas pelo número de células, pela biomassa ou medidas indiretamente pela concentração de clorofila α . Alguns autores consideram a ocorrência de florações com $\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ de clorofila α , ≥ 20.000 céls. de cianobactérias. mL^{-1} ou $\geq 2 \text{ mm}^3/\text{L}$ de biovolume celular de cianobactéria (SOUZA, 2006).

Figura 2. Floração de cianobactérias (Lagoa do Instituto de Botânica)

A ocorrência de florescências de cianobactérias em águas de superfície utilizadas para consumo indicam, essencialmente, dois problemas do ponto de vista do seu tratamento. Por um lado, sendo organismos de dimensões muito reduzidas e existindo em grande densidade, podem passar pelos filtros usados nas Estações de Tratamento de água (ETA's), atingindo densidades importantes na rede de distribuição. Por outro lado, as suas toxinas não são removidas pelos tratamentos usuais (coagulação, floculação, filtração e desinfecção), pelo que, existindo em grandes quantidades na água bruta, podem manter esses níveis na água de consumo. É, pois, importante, pelo menos na altura de maior densidade de cianobactérias tóxicas, não recorrer à pré-cloração e utilizar filtros de carvão ativo e ozônio, o que remove próximo dos 100% as toxinas existentes na água. Segundo Maatouk *et al.* (2002), o tratamento mais eficiente para combater a floração de cianobactérias como *Aphanizomenon flos-aquae* em reservatórios, é a ação combinada da pré-ozonização por adsorção com carvão em pó ativado.

3.3 CIANOTOXINAS

As florações de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradáveis na água, além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. O maior problema, é que algumas cianobactérias são capazes de liberar toxinas (cianotoxinas), que constituem um grupo quimicamente heterogêneo, apresentando portanto, diversas propriedades toxicológicas. Embora ainda não sejam esclarecidas as causas da produção dessas toxinas, acredita-se que esses compostos tenham função protetora contra herbivoria, como acontecem com alguns metabólitos de plantas vasculares (CARMICHAEL, 1992). Essas toxinas não são eliminadas pelo sistema de tratamento de águas tradicionais e nem pela fervura. São consideradas endotoxinas, pois somente são liberados para o meio externo por rompimento da parede celular, o que acontece por senescência das células ou sob a ação de algicidas, como sulfato de cobre.

Estudos laboratoriais revelaram que as microcistinas e anatoxina-a são largamente retidas dentro das células (intracelulares) quando o ambiente oferece condições favoráveis de crescimento (SIVONEN; JONES, 1999). A quantidade de microcistina numa cultura aumenta durante a fase exponencial, sendo mais elevada na fase exponencial tardia. A liberação para a água, para formar toxinas dissolvidas (extracelulares), parece ocorrer mais, se não na velhice, na morte ou na lise celular, do que por excreção contínua. Até a senescência de bloom a maioria das toxinas mantém-se dentro das células (CAMPINAS *et al.*, 2002).

As cianotoxinas pertencem a três classes químicas distintas: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos e, de acordo com o modo de ação nos órgãos e tecidos, são caracterizadas como hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (SIVONEN; JONES, 1999; MAATOUK *et al.*, 2002; MOHAMED; EL-SHAROUNY; ALI, 2006).

A inalação e o contato com cianobactérias podem ocorrer acidentalmente ou na prática de desportos aquáticos. A inalação pode produzir sintomas do tipo alérgico semelhantes à

“febre dos fenos”, como rinite, conjuntivite e dispnéia ou bronquite aguda. O contato pode desencadear irritação ocular, conjuntivite, dermatite, obstrução nasal, asma, podendo mesmo provocar queimaduras na pele. A ingestão acidental de água com doses elevadas de toxinas pode provocar intoxicações agudas, caracterizadas por um quadro de gastroenterite com diarreias, vômitos, náuseas, cólicas abdominais e febre, ou hepatite com anorexia e vômitos. A ingestão continuada de baixas doses de toxinas pode trazer alterações hepáticas crônicas. Essas situações podem ser também desencadeadas pela ingestão de moluscos, que como filtradores que são, acumulam nos seus tecidos doses letais desses produtos, que são passados ao longo das cadeias alimentares, cujo elo final pode ser o homem (NATURLINK, 2006).

Dentre as espécies potencialmente tóxicas, podemos encontrar os gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (SKULBERG *et al.*, 1993; LAKSHMANA RAO *et al.*, 2002; HAIDER *et al.*, 2003). As cianotoxinas podem ser acumuladas na rede trófica, ocasionando diferentes sintomas de intoxicação e efeitos crônicos, muitas vezes, difíceis de serem diagnosticados. Mortandades de peixes e animais silvestres e domésticos já foram registrados em diversas partes do mundo (COSTA *et al.*, 2006; LUUKKAINEN *et al.*, 1993).

3.3.1 Hepatotoxinas

As hepatoxinas incluem peptídeos cíclicos que compreendem as microcistinas e as nodularinas, e um alcalóide, a cilindrospermopsina. Essa última causa lesões em outros órgãos como rins, coração, pulmões e mucosa gástrica (KUIPER-GOODMAN; FALCONER; FITZGERALD, 1999).

As microcistinas têm sido evidenciadas em espécies do gênero *Microcystis*, especialmente *M.aeruginosa*, *Anabaena*, *Oscillatoria (Planktothrix)*, *Nostoc* e *Anabaenopsis* (McELHINEY; LAWTON, 2005; MATHYS; SURHOLT, 2004; MAATOUK *et al.*, 2002).

Essas toxinas podem causar intoxicações agudas e crônicas, e, dependendo da dose ingerida, provocar a morte do animal em horas ou dias. O quadro clínico apresentado por animais experimentalmente contaminados, constitui de ereção de pêlos, anorexia, prostração, vômitos, dor abdominal e diarreia. A morte decorre de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, além do aumento da relação fígado/massa corpórea. A toxicidade das microcistinas ocorre pela sua capacidade de penetrar nos hepatócitos, onde interagem irreversivelmente com enzimas celulares chamadas fosfatases, o que redundará na desestruturação das células do fígado; são também promotoras de tumores hepáticos (CARVALHO, 2006; McELHINEY; LAWTON, 2005). Quase 80 tipos diferentes de microcistinas já foram identificadas, contudo as mais semelhantes são as microcistinas -LR, -RR e -YR (Figura 3). O grupo dessa toxina consiste de heptapeptídeos monocíclicos, contendo três D-aminoácidos (alanina, ácido eritro-β-metilaspártico, e ácido γ-glutâmico), N-metildeidroalanina (Mdha), e o incomum C₂₀ β-aminoácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenildeca-4(E), 6(E)-ácido dienóico (Adda) (Figura 4A). A variação estrutural das microcistinas pode ocorrer em todos os sete aminoácidos, e as variantes mais freqüentemente encontradas são caracterizadas de acordo com a introdução do grupo metila, e duas variáveis L-aminoácidos localizados nas posições 2 e 4 da estrutura (denominado X e Z). Por exemplo, a microcistina-LR contém os aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nessas posições (Figura 4A) (SIVONEM; JONES, 1999). A toxicidade da microcistina está associada com a inibição da proteína serina/treonina fosfatases 1 e 2A (McKINTOSH *et al.*, 1990), podendo levar a necrose e hemorragia das células hepáticas (BHATTACHARYA *et al.*, 1997).

pulmonares, e ainda em mucosa gástrica de camundongos (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1999). A cilindropermopsina tem ações lentas, sendo necessários 5 a 7 dias para atingir seu efeito tóxico máximo.

Figura 4. Estrutura geral das microcistinas, nodularinas e cilindropermopsinas. A) Microcistina é um heptapeptídeo cíclico. X e Z representam os dois L-aminoácidos que podem variar e R^1 e R^2 são H ou CH_3 . B) Nodularina é um peptídeo cíclico. Z representa um L-aminoácido que pode variar e R^1 e R^2 são H ou CH_3 . C) Cilindropermopsina é um alcalóide.

Fonte: Bitencourt-Oliveira e Molica (2003)

3.3.3 Neurotoxinas

As neurotoxinas são alcalóides do tipo carbamato, produzidos por espécies de *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis* e *Trichodesmium* (HAWSER *et al.*, 1991; KAEBERNICK; NEILAN, 2001). Estão agrupadas em anatoxina-a e homoanatoxina-a, anatoxina-a(S) e saxitoxina, de acordo com sua ação toxicológica. Atuam

ao nível da transmissão dos impulsos nervosos e podem provocar morte por parada respiratória, devido a paralisia muscular.

A anatoxina-a e homoanatoxina-a (Figura 5A) são agentes bloqueadores neuromusculares, possuem efeitos semelhantes a acetilcolina, como paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cinose, convulsão e morte, que pode ocorrer em poucos minutos (CARVALHO, 2006). A ação ocorre porque a anatoxina-a se liga irreversivelmente a receptores de acetilcolina, pois não é degradada pela acetilcolinesterase.

A anatoxina-a(S) é um fosfato éster do ciclo N-hidroxiguanina (Figura 5B) (SIVONEN; JONES, 1999), bloqueia a atividade da acetilcolinesterase de modo analógico ao dos inseticidas fosforados, causando fraqueza muscular, dispnéia e convulsões, seguida de morte (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1999). Em virtude da intensa salivação observada em animais intoxicados por essa neurotoxina, ela foi denominada anatoxina-a(S), se apresentando 10 vezes mais potente que a anatoxina-a, porém não há registro de intoxicação humana por essa toxina (FUNASA, 2003).

As saxitoxinas são alcalóides carbamatos neurotóxicos, bloqueadores dos canais de sódio, afetando a permeabilidade ao sódio ou a resistência da membrana, além de serem bloqueadores da propagação dos impulsos entre os neurônios, provocando paralisia, falência respiratória, adormecimento da boca e das extremidades, náusea, vômito, sede e taquicardia (Figura 5C) (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1999; KAO, 1993). As saxitoxinas podem ser divididas em três grupos, de acordo com sua estrutura: as saxitoxinas (STX), de estrutura não sulfatada, as goniautoxinas (G-toxinas-monossulfatadas) – e as C-toxinas – dissulfatadas (CARVALHO, 2006).

Em nosso país, a análise desse grupo de neurotoxinas em amostras de água para consumo humano, está se tornando de extrema importância, visto que tem sido observado em vários mananciais de abastecimento, desde a região Nordeste até a região Sul do país, um

grande aumento da ocorrência de cepas do gênero *Cylindrospermopsis* produtoras desse grupo de neurotoxina. Em muitos reservatórios, inclusive alguns recém-construídos, este gênero já é dominante, atingindo um número de células muito acima dos limites máximos aceitáveis para conferir risco para a saúde humana (CHORUS; BARTRAM,1999).

Figura 5. Estrutura das neurotoxinas. A) anatoxina-a, B) anatoxina-a(s) e C) saxitoxinas. Alterações em R1, R2, R3, R4, R5 geram mais de 20 variantes conhecidas com diferentes toxicidades.

Fonte: Bitencourt-Oliveira e Molica (2003)

3.3.4 Dermatotoxinas

As dermatotoxinas são as responsáveis pelas irritações de pele, reações alérgicas e gastroenterites (SIVONEN, 1996; CARMICHAEL, 2001). As substâncias sintetizadas pelas algas que causam severas dermatites são os lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede celular de todas as bactérias Gram-negativas, incluindo as cianobactérias, que são agentes pirogênicos, capazes de induzir irritação na pele e alergias. As moléculas das LPS são formadas por carboidratos (normalmente hexoses) e lipídeos (ácidos graxos de cadeias C₁₄ a C₁₈), delas existindo muitas variantes (KAYA, 1995). Se ingerida, essas toxinas podem causar tanto em humanos, como em animais experimentais, uma série de efeitos que incluem neutropenia (produz acentuada queda dos leucócitos polimorfonucleares), trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas), níveis anormais de glicose e mudanças metabólicas, como acidose e alcalose.

3.4 EVIDÊNCIAS DE INTOXICAÇÕES HUMANAS POR CIANOBACTÉRIAS

A toxicidade causada pela floração de cianobactérias tem sido reportada no mundo todo. No Brasil, o primeiro caso reportado cientificamente sobre a toxicidade das cianobactérias ocorreu em Caruaru-PE, em 1996, onde 130 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica da cidade, passaram a apresentar sintomas parecidos com uma grave hepatotoxicose. Desses pacientes, 60 vieram falecer até 10 meses após o início dos sintomas. Foram encontradas microcistina e cilindrospermopsina no filtro de carvão utilizado no sistema de tratamento da água da clínica, além de microcistinas nas amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2002). Teixeira *et al.* (1993) correlacionaram a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica (Bahia) com a morte de 88 pessoas, entre elas, 200 intoxicadas após a ingestão da água do reservatório entre março e abril de 1988. Foram evidenciadas florações tóxicas de cianobactérias em um reservatório semi-árido brasileiro nos períodos seco e chuvoso do ano de 2000, apontando um risco permanente de cianotoxinas em águas de abastecimento, e indicando a necessidade da implementação de medidas de controle das florações, visando a melhoria da qualidade da água (COSTA *et al.*, 2006). De acordo com Vieira *et al.* (2005) altas concentrações de microcistinas foram evidenciadas num reservatório brasileiro, representando o primeiro caso de floração de cianobactérias tóxicas em reservatório da região Amazônia.

Com todos esses dados, observa-se que esses danos acontecem como consequência de acidentes, desconhecimento ou deficiência na operação dos sistemas de tratamento da água.

Em muitos casos, as cianobactérias causadores dos danos desaparecem do reservatório antes que as autoridades públicas considerem como um possível risco, pois são desconhecedoras dos danos possíveis resultante das florações de cianobactérias, e portanto

assumem que os processos de tratamento de água usuais são capazes de remover qualquer problema potencial. Entretanto, as toxinas solúveis das cianobactérias são dificilmente removidas em um tratamento convencional, sendo resistente até mesmo à fervura. Um dos tratamentos utilizados por autoridades de meio ambiente é a utilização de sulfato de cobre ou outros algicidas. Esse método provoca a lise celular desses organismos, liberando as toxinas presentes nessas células para a água bruta do manancial. A exposição prolongada por essas toxinas deve ser considerada como um sério risco à saúde, uma vez que, estas provocam a liberação de cianotoxinas, como as microcistinas, que são potentes promotoras de tumores, e esse consumo continuado em pequenas doses de hepatotoxinas pode levar a uma maior incidência de câncer hepático na população exposta (FUNASA, 2003).

3.5 REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS DISSOLVIDAS NO TRATAMENTO DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO

Os processos de coagulação associados à separação sólido-líquido e/ou à pré-oxidação, podem remover de forma eficaz as células de cianobactérias. Entretanto, de acordo com Hart, Fawell e Croll (1998), vários processos convencionais de tratamento (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) não são eficientes para eliminação de cianotoxinas dissolvidas na água.

Segundo Himberg *et al.* (1989), baseados em experimentos realizados em laboratório, relataram que o tratamento envolvendo a coagulação/floculação, filtração rápida e cloração também não foram eficientes para a eliminação de hepatotoxinas, oriundas de *Mycrocystis* e *Oscillatoria*. Destacaram ainda que em alguns experimentos, a remoção de toxina foi igual a zero, sugerindo que as toxinas podem ser liberadas durante a coagulação/floculação.

Falconer *et al.* (1989), por meio de bioensaios em camundongos, encontraram redução de apenas 20% das toxinas em uma água rica em neurotoxinas oriundas de uma floração de

Anabaena circinalis, utilizando para coagular sulfato de alumínio em doses elevadas (120 mg/L). Para altas concentrações de toxinas (~200 µg/L) o uso de cloreto férrico como coagulante se mostrou mais eficaz que o sulfato de alumínio, porém para uma concentração de toxinas cerca de dez vezes menor, os dois coagulantes não apresentaram remoção.

Os trabalhos de Falconer *et al.* (1989) e de Himberg *et al.* (1989) citados anteriormente avaliam também a remoção de toxinas por carvão ativado, em pó e granular. Os resultados obtidos sugerem que o carvão ativado é capaz de remover cianotoxinas sozinho ou de forma combinada com o tratamento convencional. A competição da matéria orgânica com as cianotoxinas reflete na eficiência de adsorção quando o carvão é usado na sequência do tratamento.

A oxidação química vem sendo apresentada como uma técnica eficiente no tratamento da remoção de cianotoxinas, como o carvão ativo. Porém necessita de uma maior atenção devido à aplicação direta de oxidantes na água bruta, ou seja, onde não houve a remoção das células viáveis de cianobactérias (FUNASA, 2003).

Keijola *et al.* (1988) e Himberg *et al.* (1989) analisando a cloração dentro dos processos usuais de tratamento sugerem que essa etapa não foi eficaz na remoção de toxinas. Nicholson e Rositano (1994), por sua vez, reportam que microcistinas e nodularinas foram rapidamente destruídas pelo cloro, hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, sendo que esse último exigiu dosagem superior à dos dois primeiros. O cloro e o hipoclorito de cálcio removeram 95% das toxinas em doses de 1 mg/L (cloro ativo) após um tempo de contato de 30 min, enquanto que o hipoclorito de sódio removeu 80% no mesmo tempo de contato. Um fato importante observado pelos autores foi a influência do pH na efetividade das espécies de cloro testadas. Já o uso de cloraminas e de dióxido de cloro não se mostrou eficaz na remoção de cianotoxinas (NICHOLSON *et al.*, 1994; HART *et al.*, 1998).

A pré-cloração também tem sido utilizada no tratamento de microcistinas intracelulares. Hart, Fawell e Croll *et al.* (1998) reportam que a efetiva remoção de microcistina só foi possível com doses de cloro superiores a 2 mg/L, entretanto os autores relataram que as concentrações de toxinas na água era baixa, cerca de 2 µg/L. Por outro lado Lam *et al.* (1995) relataram que cloração da água contendo elevadas concentrações de células de *Microcystis aeruginosa* provocou a imediata liberação das toxinas intracelulares para o meio líquido. A microcistina liberada só foi totalmente oxidada após 4 dias de contato, apesar de uma elevada dosagem de hipoclorito de sódio (44 mg/L) ter sido utilizada no experimento. Todos esses resultados apresentaram aspectos críticos em relação a tratamento de água com elevadas concentrações de células de cianobactérias.

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE DE CIANOTOXINAS

Para a análise de cianotoxinas na água, são utilizados métodos imunológicos e físico-químicos. O método imunológico utilizado é o ELISA (Enzima-Linked Imumuno Sorbent Assay), cuja sensibilidade permite a detecção dessas hepatotoxinas a partir de 0,2 µg/L e que as amostras sejam processadas diretamente, sem necessidade de concentração ou de “clean-up”. Apesar de ser um método de fácil manuseio, apresenta desvantagem para medir a quantidade total de microcistinas e nodularinas na amostra, não possibilitando distinções entre diferentes microcistinas e mesmo entre nodularinas e microcistinas (HARADA; KONDOR; LAWTON, 1999). O ELISA utiliza anticorpos policlonais ou monoclonais de microcistinas, é um método altamente específico, sensível e de rápida detecção. Comercialmente encontram-se kits rápidos, de operação simples baseados no método imunológico para a detecção de microcistinas, mas o maior problema encontrado é a reatividade cruzada dos anticorpos, devido às diferentes estruturas de microcistinas (RAPALA *et al.*, 2002).

Outro método utilizado para a detecção de microcistinas é o PPI, que consiste da inibição da proteína fosfatase. Essa técnica foi desenvolvida com base na habilidade das microcistinas e nodularinas inibirem as enzimas serina-treonina da proteína fosfatase. Os primeiros métodos descritos com inibição das proteínas fosfatases são baseados nas técnicas com radioisótopos. As aplicações colorimétricas são mais baratas e mais convenientes que os radioisótopos, porém nem todas as variantes de microcistinas reagem com as enzimas das proteínas fosfatases. Em adição, as amostras contendo cianobactérias podem conter atividades de fosfatase que mascara a presença de toxinas (SIM; MUDGE, 1994).

O método físico-químico mais frequentemente recomendado para análise dessas toxinas é o que combina a CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – e detectores de UV ou de sequência de fotodiodos, sendo o limite mínimo de detecção desse sistema de 1 µg/L. A cromatografia é um método físico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo, sendo uma a fase estacionária, enquanto a outra move-se através dela (fase móvel). Durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os componentes são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos analitos. Conseguem-se separações realizadas em poucos minutos até horas, devido a alta eficiência da coluna e vazão rápida da fase móvel através da coluna. Apresenta uma boa sensibilidade, grande versatilidade, sendo possível a identificação e quantificação de compostos variados, tanto orgânicos como para inorgânicos (COLLINS *et al.*, 1997). O mecanismo de separação da cromatografia líquido-sólido se baseia na competição que existe entre as moléculas da amostra e a fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária). Para que a molécula possa ser adsorvida na fase estacionária, uma molécula da fase móvel deverá ser deslocada da superfície. Se o adsorvente possuir uma superfície polar

(por exemplo sílica), grupos apolares terão pouca afinidade por esta superfície e não irão deslocar a molécula da fase móvel; por isso não serão retidos. Grupos funcionais polares capazes de formar ligações de hidrogênio terão fortes afinidades pela superfície e serão fortemente retidos. Moléculas polarizáveis irão apresentar interação dipolo com a superfície do adsorvente e, portanto, serão retidas; o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional (COLLINS *et al.*, 1997). A utilização da cromatografia líquida requer um preparo prévio da amostra, por extração em fase sólida (SPE) ou cromatografia em solventes adequados, porém permite a identificação e quantificação individual de microcistinas e nodularinas (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999). Os métodos para análise de saxitoxinas e cilindrospermopsina em amostras de água ainda não estão definidos, sendo, porém, possível identificá-las a partir de florações e de culturas, combinando processos de extração de alcalóides com as mais sofisticadas técnicas cromatográficas e de identificação de substâncias (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999).

A World Health Organization (WHO) propõe o valor de 1 µg/L da microcistina-LR em amostras de água para consumo humano (WHO). Essa é uma das razões porque a sensibilidade, rapidez e simplicidade dos testes são importantes para o monitoramento dessas toxinas. A padronização internacional para análise de microcistina em HPLC está atualmente em progresso (RAPALA *et al.*, 2002).

Rapala *et al.* (2002) comparou os métodos ELISA, PPI e HPLC para a detecção de microcistinas em amostras de água. Todos os métodos comparados foram baseados em princípios diferentes. Com o teste ELISA avaliou-se a concentração total de microcistina da amostra, enquanto que com o método PPI avaliou-se o potencial de toxicidade da amostra. Já com a técnica HPLC foi possível separar e reconhecer as microcistinas com base nos tempos de retenção e característica do espectro de absorção UV. Com esse trabalho, Rapala *et al.* (2002) concluiu que ELISA e PPI são métodos fáceis tanto para a execução quanto

identificação das concentrações de microcistina em águas naturais, porém para a pesquisa e monitoramento de microcistinas em águas de recreação e de distribuição, o método HPLC é mais apropriado para a confirmação e identificação das diferentes toxinas presentes em amostras de água.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

As amostragens foram realizadas em uma lagoa localizada no município de Porto Real, Rio de Janeiro, latitude 22° 25'21.26" S e longitude 44°16'53.23" O, no mês de março de 2008 (figura 6). As amostras foram coletadas em frascos de poliestileno (5 L cada) através da passagem do frasco aberto na superfície da água. As amostras foram preservadas em gelo a aproximadamente 4°C antes do início das análises, a fim de diminuir o metabolismo dos organismos e o consumo de oxigênio na ausência de luz. Para as análises qualitativas, 100 mL da floração foi coletada e preservada com 1 mL de lugol.

Figura 6. Localização Geográfica do município de Porto Real, RJ.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA FLORAÇÃO

As cianobactérias em geral podem ser diferenciadas das algas planctônicas por sua morfologia, coloração verde-azulada e conteúdo celular mais uniforme. As análises qualitativas foram realizadas em um microscópio binocular. Pequenas alíquotas de amostras foram depositadas em lâminas de vidro e cobertas com uma lamínula, observadas nos aumentos de (10x10), (10x40) e (10x100), utilizando-se neste último óleo de imersão. O material foi sempre analisado *in vivo*. A identificação do fitoplâncton consiste em agrupá-los em categorias taxonômicas específicas, e nomeá-las com o auxílio da literatura especializada e chave de identificação. Para tanto, este trabalho foi baseado em Sant'Anna e Azevedo (2006).

4.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

4.3.1 Microcistinas extracelulares

Após a confirmação da presença de *Microcystis* na amostra através da análise qualitativa, o material coletado foi filtrado em microfiltro de fibra de vidro GF-6 diâmetro 125 mm (Macherey-Nagel, Alemanha). O filtrado foi purificado em cartucho de octadecilsilano Chromabond (ODS-C18), com partículas de 45 µm. Segundo Chen *et al.* (2006), a utilização da sílica gel funcionalizada na extração em fase sólida, permite não somente remover o material hidrofóbico que possam ser adsorvidos pela coluna, como remover interferentes que possam influenciar na detecção das microcistinas por HPLC-UVD.

Após a extração em fase sólida, o material retido foi eluído sucessivamente de acordo com esquema apresentado abaixo:

- 3 frações distintas (5 mL cada) de H₂O 100% (AM₁ H₂O, AM₂ H₂O, AM₃ H₂O)

- 3 frações distintas (5 mL cada) de H₂O/MeOH 40/10 v/v (AM₁40/10, AM₂40/10, AM₃40/10)
- 3 frações distintas (5 mL cada) de H₂O/MeOH 25/25 v/v (AM₁25/25, AM₂25/25, AM₃25/25)
- 3 frações distintas (5 mL cada) de H₂O/MeOH 5/45 v/v (AM₁ 5/45, AM₂ 5/45, AM₃ 5/45)
- 1 fração de MeOH 100% (AM₁ MeOH)

Após esse processo, o material filtrado foi novamente purificado em filtro Millipore 13 mm de 0,45 µm (Millipore, USA) para a retirada de outras organelas presentes no filtrado, impedindo a contaminação da coluna.

4.3.2 Microcistinas intracelulares

Para a quantificação das microcistinas intracelulares, foi necessária a lise das células de *Microcystis*. Os filtros contendo o material particulado retido foram imersos em uma solução metanol:água (75:25 v/v); esses filtros foram então macerados, e submetidos à extração por exposição a ultrassom (Thornton 90 w, 60 Hz) para lise celular por 50 min. Segundo Barco *et al.* (2005), o metanol é o solvente mais apropriado para extrair todas as variedades de microcistinas hidrofóbicas e hidrofílicas.

Após a extração, o material ficou em repouso para a decantação do particulado. Após esse processo, o sobrenadante foi retirado e levado à evaporação a 30°C, durante a noite até a secura. O extrato concentrado foi parcialmente purificado em cartucho de octadecilsilano Chromabond (ODS-C18), com partículas de 45 µm. O material retido foi eluído com 3 frações distintas (5mL cada) de H₂O/MeOH 5:45 v/v (MS₁ 5/45, MS₂ 5/45, MS₃ 5/45).

Antes do início das análises cromatográficas, o material foi purificado em filtros 13 mm de 0,45 µm de porosidade (Millipore, USA).

4.3.3 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.3.3.1 Preparação da fase móvel

A fase móvel deve ter alta pureza como um solvente de grau cromatográfico, permitindo realizar análises de alta sensibilidade com detectores por fluorescência ou por absorvância no ultravioleta, onde as impurezas da fase móvel podem absorver e diminuir a sensibilidade do detector para os componentes da amostra (COLLINS *et al.*, 1997).

Os solventes utilizados na fase móvel foram baseados em Lombardo *et al.* (2006), Dogo (2006), Rodríguez, *et al.* (2007):

Solvente A: Água Deionizada/Ácido Trifluoracético 0,1% (TFA)

Solvente B: Acetonitrila/Ácido Trifluoracético 0,1% (TFA)

Para a preparação de 500 mL do solvente A, 500 µL de TFA foram diluídos em 500 mL de Água Deionizada. Para a preparação do solvente B, 500 µL de TFA foram diluídos em 500 mL de Acetonitrila. Cada solvente passou por um processo de purificação para eliminar possíveis contaminantes particulados, a fim de proteger os componentes do equipamento. Para tanto, os solventes foram filtrados utilizando um kit de filtração a vácuo com membrana de 0,45 µm (Millipore, Brasil), e submetidos ao banho ultrassônico durante 20 min.

4.3.3.2 Preparação do padrão

Para a construção da curva padrão de 3 pontos, foi utilizada uma solução mãe, cuja concentração era de 100 µg.mL⁻¹, preparada a partir do padrão de microcistina-LR, com 90% de pureza (MPBio). Os padrões foram preparados em diferentes concentrações (1,0, 0,1 e 0,01 µg/mL).

- 100 µL da solução mãe diluído em 1 mL de metanol (Padrão 1)

- 100 μL do padrão 1 diluído em 1 mL de metanol (Padrão 2)
- 100 μL do padrão 1 diluído em 10 mL de metanol (Padrão 3)

Concentração: Padrão 1: 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Padrão 2: 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Padrão 3: 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

4.3.3.3 Limpeza da coluna

Antes do início de algumas análises, foi realizada a limpeza da coluna a fim de diminuir a ocorrência de picos fantasmas nos resultados. O procedimento foi realizado com a eluição de solventes e água pela coluna. Iniciou-se com água deionizada, seguido do metanol, e por fim a passagem do tetraidrofurano (THF). A limpeza foi realizada num fluxo de 0,2 mL.min^{-1} , com duração de 5 h para cada eluente.

4.3.3.4 HPLC

Para as análises cromatográficas foi utilizado HPLC Agilent 1100, equipado com um detector UV (ultravioleta HP 1100), operando a 238 nm. A detecção foi feita através da injeção de 20 μL da amostra em duas colunas distintas: uma coluna de fase reversa C-18 LiChrosorb ODS (Merck) de 4,6 mm x 250 mm com partículas de 7 μm , pertencente à AMPRO Laboratório e Engenharia, e outra coluna de fase reversa C-18 Spherisorb ODS de 4,6 mm x 150 mm com partículas de 5 μm , gentilmente cedida pelo Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal da Escola de Engenharia de Lorena – EEL USP. A fase móvel consistiu de solvente A: $\text{H}_2\text{O/TFA}$ 0,1%, e solvente B: acetonitrila/ TFA 0,1%, utilizando gradiente de 5 a 95% de B em 30 min e 60 min, com o fluxo de 2 mL.min^{-1} , a 40°C. Para todas as análises foram utilizados solventes grau HPLC.

4.3.3.5 Kit *ELISA*

Em paralelo ao trabalho executado, foram realizados testes imunológicos para quantificação de microcistinas em água. O kit utilizado foi o ELISA - Beacon microcistina – utilizando anticorpos policlonais que se ligam às microcistinas e ao conjugado microcistina-enzima. A microcistina na amostra compete com o conjugado microcistina-enzima por um número limitado de anticorpos. Os tubos estão revestidos com anticorpos anti-IgG de coelho, sendo estes últimos os anticorpos anti-microcistina em solução que são adicionados (INCONEX, 2008).

Os padrões utilizados foram: 0, 0.3, 0.8, 1.0, 2.0 e 5.0, todos expressos em ppb (kit Beacon).

Inicialmente foi preparada água de lavagem diluída, adicionando 5 mL da solução de lavagem concentrada em 495 mL de água. Após esse processo, 500 µL do conjugado Microcistina-Enzima foram adicionados a cada tubo, seguidos de 500 µL de cada padrão e cada amostra em tubos distintos. Foram pipetados 500 µL da solução anticorpo em cada tubo, agitando-os rapidamente por 30 s. Esses tubos foram incubados à temperatura ambiente por 20 min. Após percorrido o tempo, o conteúdo dos tubos foi desprezado, sendo cada tubo lavado com a solução de lavagem preparada inicialmente, totalizando 4 lavagens. Após a secagem dos tubos, 500 µL de substrato foram adicionados em cada tubo, que foram incubados a temperatura ambiente por 20 min. A leitura dos resultados foi realizada visualmente através da tonalidade azul, quanto maior a concentração de microcistina, menor a tonalidade da amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA

Foi identificado apenas um gênero de cianobactéria na amostra analisada. Na microscopia, foi evidenciada a presença de células cocóides coloniais, característica da Ordem Chroococcales. As colônias apresentaram formatos arredondados, podendo ser visualizada a presença de aerótopos no interior das células, além de apresentar divisão celular em 3 planos (Figura 7), definindo essas células como sendo da família Microcystaceae, do gênero *Microcystis* (SANT'ANNA; AZEVEDO, 2006).

Figura 7. *Microcystis* .(A) Células cocóides de *Microcystis* (400x). (B) Colônias de *Microcystis* (100x)

5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

5.2.1 Resultados obtidos da coluna C-18 LiChrosorb (25 cm) 7 μ m

Em uma primeira etapa do trabalho, as amostras AM₁ 25/25 e AM₁ 40/10 passaram por uma análise cromatográfica com corrida de 30 min, utilizando a coluna C-18 LiChrosorb 7 μ m. Foram observados picos característicos da toxina nos tempos de 22 e 23 min para a amostra AM₁ 25/25 (Figura 8); e 22, 23 e 24 min para a amostra AM₁ 40/10 (Figura 9). Para confirmar o tempo de retenção verificado nos cromatogramas, o padrão 1 foi analisado em duplicata nas mesmas condições anteriores utilizadas para as amostras, obtendo picos nos tempos 22, 23 e 24 min para as duas injeções (Figura 10), mas apresentando áreas menores nas replicatas (Figura 11), levando ao questionamento dos resultados anteriores.

Figura 8. Perfil cromatográfico da amostra AM₁ 25/25 (Coluna 7 μ m – 30 min)

Figura 9. Perfil cromatográfico da amostra AM₁ 40/10 (Coluna 7 μ m – 30 min).

Figura 10. Perfil Cromatográfico do Padrão 1 (Coluna 7 μ m – 30 min)

Figura 11. Replicata do Padrão 1 (Coluna 7 μ m – 30 min)

Como as amostras e os padrões foram preparados utilizando o metanol, o mesmo solvente foi injetado para verificar uma possível interferência, e o resultado encontrado foram três picos característicos nos tempos 22, 23 e 24 min (Figura 12).

Figura 12. Perfil Cromatográfico do MeOH (Coluna 7 μ m - 30 min).

Como o método desenvolvido foi para o tempo de análise de 30 min, a toxina poderia estar sendo acumulada na coluna. Por esta razão, as análises cromatográficas foram

modificadas para 60 min, repetindo a injeção do metanol. O resultado encontrado não foi diferente do exposto anteriormente. O cromatograma apresentou a mesma característica, com uma variação sutil no tamanho dos picos, e modificação no tempo de retenção para 38, 40 e 43 min (Figura 13).

Figura 13. Perfil Cromatográfico do MeOH (Coluna 7 μ m - 60 min).

Os valores das áreas dos 3 picos na eluição do metanol com 60 min foram 200,7, 223,1 e 122,8 respectivamente, e os picos correspondentes na análise com 30 min foram 228,6, 316,2 e 141,3 (Tabela 1). Isso mostra uma relação coerente entre os picos que pode ser devido a contaminação do metanol, apesar de se usar solvente de grau cromatográfico. No entanto, ao se comparar essa relação com o conjunto de picos obtidos nas amostras (Figuras 8 e 9) a relação não se mantém, com predominância do pico a 23,7 min na eluição com 30 min. Assim, a hipótese de que esse tempo de retenção está relacionado à saída da toxina é pertinente, mas que de um lado sofre interferência do próprio solvente e de outro que se acumula na coluna, levando a diminuição do sinal, evidenciado ao se fazer a replicata (Figuras 10 e 11).

A tabela 1 mostra as áreas relativas e em valores absolutos desses 3 picos para esse conjunto de cromatogramas. As áreas foram calculadas levando-se em consideração a variação crescente da linha base e não como mostrado nas figuras apresentadas.

Tabela 1 – Área em relação ao tempo de retenção.

Amostra	Área mAU	Tr (min)	Padrão	Área mAU	Tr (min)	MeOH	Área mAU	Tr (min)
AM ₁ 40/10	118,2	22,4	Padrão 1	286,2	22,4	MeOH - 30 min	228,6	22,4
	110	23,7		359,2	23,7		316,2	23,7
	52	24,9		178,4	24,9		141,3	24,9
			Replicata Padrão 1	60,9	22,3	MeOH - 60 min	200,7	38,1
				70,3	23,6		223,1	40,7
				30,8	24,8		122,8	43

5.2.2 Resultados obtidos da coluna C-18 Spherisorb (15 cm) 5 µm

Diante dos resultados apresentados anteriormente, questionou-se a eficiência da coluna C-18 LiChrosorb 7 µm, por ser mais antiga e ter sido utilizada para análises rotineiras de agrotóxicos há alguns anos. Para avaliar se a coluna era a responsável pelos resultados contraditórios, foi desenvolvido outro método com a coluna C-18 Spherisorb de 15 cm com partículas 5 µm, utilizando as mesmas condições de análise descritas anteriormente, em corridas de 30 min.

Inicialmente foram avaliadas as respostas da coluna para os padrões 3, 2 e 1. Para o padrão 3, verificou-se um pico característico da toxina no tempo de retenção de 27 min, e um pico menos acentuado em 25,9 min. Para os padrões 1 e 2, o tempo de retenção supostamente da microcistina-LR foi de 25,6 min (Figura 14). Em uma etapa seguinte, o metanol foi novamente analisado, encontrando-se os mesmos 3 picos característicos em 24,2, 24,8 e 26 min (Figura 15), levando a se questionar novamente a interferência do metanol nos resultados. A amostra AM₁ 5/45 foi avaliada nessas condições, apresentando um perfil cromatográfico com picos nos tempos de 23,6, 24,2, 25,4 e 26,8 min (Figura 16).

Figura 14. Perfil Cromatográfico do Padrão1 (Coluna 5 μ m – 30 min).

Figura 15. Perfil Cromatográfico do MeOH (Coluna 5 μ m – 30 min)

Figura 16. Perfil Cromatográfico da amostra AM₁ 5/45 (Coluna 5 μ m – 30 min)

No entanto, se os picos presentes nos cromatogramas eram devido ao acúmulo da toxina na coluna, o perfil cromatográfico deveria apresentar alguma indicação desse fato ao longo das análises realizadas. Desta forma, o padrão 1 e a amostra AM₁ 5/45 foram analisadas novamente em um tempo de corrida de 60 min, como observado nas figuras 17 e 18. Ambos cromatogramas apresentaram picos nos tempos de 34, 36 e 37 min. Nesse caso, observa-se que o padrão inicialmente apresentava apenas um pico no tempo de 25 min, para a corrida de 30 min, e com o uso rotineiro da coluna, o mesmo padrão injetado passa a transcrever três picos, diferente do perfil cromatográfico anterior. E esse pico tem uma redução de 28,6% em sua área, coerente com o estabelecido na discussão anterior sobre o acúmulo da toxina na coluna cromatográfica. Evidencia-se, portanto, que tal acúmulo independe do tamanho da coluna e do tamanho das partículas do recheio, sendo um fenômeno de interação acentuada com a fase ativa de octadecilsilano. Aqui deve ser considerada também a natureza macromolecular da microcistina frente a substâncias de baixa massa molar comumente separadas por esse tipo de coluna.

Figura 17. Perfil Cromatográfico do Padrão 1 (Coluna 5µm – 60 min)

Figura 18. Perfil Cromatográfico da amostra AM₁ 5/45 (Coluna 5µm – 60 min)

5.2.3 Resultados obtidos da coluna C-18 LiChrosorb (25 cm) 7 µm após limpeza

A fim de melhorar a eficiência da coluna, foram realizadas consecutivas limpezas na C-18 LiChrosorb 7 µm durante o processo analítico. Após essa etapa, foram injetados padrões de maior concentração para menor concentração (Padrão 1, 2 e 3 sequencialmente), todos com 60 min de corrida. Como demonstrado na tabela 2, os resultados foram satisfatórios com relação a área observada. O tempo de retenção dos padrões para a microcistina-LR foi de 44,5 e 45 min, e a correlação apresentada na equação linear foi de 0,99 (Figura 19).

Tabela 2 – Área dos padrões 1, 2 e 3 analisados sequencialmente

Padrão	Área (mAU)	Tr (min)	Concentração (µg/mL)
1	27338	45,5	1
2	1228	45,7	0,1
3	389	44,5	0,01

Figura 19. Gráfico da relação área x concentração (Padrões 1, 2 e 3)

Para confirmar os resultados apresentados anteriormente, foram injetados os mesmos padrões, em concentrações invertidas, portanto, padrões de menor concentração para maior

concentração (Padrão 3, 2 e 1), todos com corridas de 60 min. A tabela 3 expressa os resultados obtidos nesse procedimento, verificando que a coluna perde sua eficiência a partir da sequência de amostras analisadas. O tempo de retenção foi de 44 min para todos os padrões, e a correlação apresentada na equação linear foi de 0,41 (Figura 20), totalmente inapropriada para uma análise.

Tabela 3 – Área dos padrões 3, 2 e 1 analisados sequencialmente

Padrão	Área (mAU)	Tr (min)	Concentração (µg/mL)
3	22400	43,9	0,01
2	2955	44,1	0,1
1	812	43,9	1

Figura 20. Gráfico da relação área x concentração (Padrões 3, 2 e 1)

5.2.3.1 Curva Padrão

Com a avaliação dos resultados, notou-se que a coluna perdia a eficiência com a realização das amostras em sequência, consequentemente, os resultados tornaram-se questionáveis. Sendo assim, apenas uma análise foi realizada por dia, com tempo de corrida de 60 min, todas após a limpeza da coluna.

Os padrões analisados para a construção da curva padrão foram: padrão 1, cuja concentração é de $1\mu\text{g/mL}$, padrão 2, de $0,1\mu\text{g/mL}$ e padrão 3 de $0,01\mu\text{g/mL}$. Nessa etapa os resultados foram relevantes, quando comparado com os anteriores. O tempo de retenção observado no cromatograma do padrão de microcistina-LR foi de 43,9 min, acreditando ser esse o tempo de retenção real para a detecção dessas toxinas nas condições de análise conduzidas neste trabalho (Figura 21). As áreas apresentaram resultados efetivos com relação à concentração dos padrões (Tabela 4). Na figura 22 observa-se a curva-padrão definida pelas concentrações citadas anteriormente, obtendo uma correlação de 0,92.

Figura 21. Perfil cromatográfico do padrão 2 após limpeza (Coluna $7\mu\text{m}$ – 60 min)

Tabela 4 - Área dos padrões 3, 2 e 1 obtidas em análises realizadas em dias distintos.

Padrão	Área (mAU)	Tr (min)	Concentração (ug/mL)
3	22400	43,9	0,01
2	24179	43,7	0,1
1	27338	45,5	1

Figura 22. Gráfico da curva-padrão da microcistina-LR

5.2.3.2 Resultado das amostras

As amostras AM₁ 5/45, AM₁ 40/10, AM₁ 25/25 e MS 5/45 foram avaliadas individualmente após a limpeza da coluna. Todas foram analisadas em um tempo de 60 min, apresentando tempo de retenção, área e concentração como exposto na tabela 5. As concentrações das amostras foram calculadas segundo a equação linear $y=4389x+23015$, obtida da curva-padrão (Figura 22).

Tabela 5 – Tempo de retenção, área e concentração apresentado pelas amostras.

Amostra	Tr (min)	Área mAU	Concentração µg/mL
AM ₁ 5/45	43,4	27185	0,95
AM ₁ 40/10	43,7	15979	< 0,01
AM ₁ 25/25	43,3	23265	0,05
MS 5/45	43,3	24902	0,43

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se maior concentração de microcistina na amostra AM₁ 5/45, extraída com 45 mL de metanol e 5 mL de água, valendo ressaltar que no momento da extração com metanol, a amostra estava com uma coloração esverdeada mais evidente que a observada nas outras extrações. Acompanhando os resultados na tabela 6, observa-se que as amostras extraídas com maior concentração de metanol apresentaram resultados mais significativos com relação à concentração da toxina, afirmando o metanol ser o solvente viável para a extração de microcistina-LR em amostras de água. Segundo Rapala *et al.* (2002), a concentração de metanol nas amostras interfere na quantificação das microcistinas quando analisadas por HPLC. Na medida em que se aumenta a concentração de metanol, ocorre decréscimo na sensibilidade dos métodos de cromatografia líquida. Plotando gráficos com os resultados obtidos, verificou-se uma correlação significativa tanto para a porcentagem, como para a concentração em massa de metanol em relação a extração da toxina. Quanto maior a concentração de metanol, maior a área observada no cromatograma (Figura 23).

Tabela 6 – Efeito do Metanol na extração de microcistinas.

Área (mAU)	Conc. MC-LR (ug/mL)	% Metanol	Conc. Metanol (g/cm ²)
15979	<0,01	20%	16,66
23265	0,05	50%	44,44
27185	0,95	90%	87,8

Figura 23. Efeito Metanol nos resultados analíticos (A) Volume (B) Massa

Nos experimentos realizados após a limpeza da coluna, verificou-se nos resultados, tanto das amostras como para os padrões, picos relativamente altos, com áreas bastante significativas. Segundo a Portaria 518 MS, o valor máximo permitido para a concentração de microcistinas em reservatórios destinados ao consumo humano é de 1 µg/L, e diante dos resultados obtidos, encontramos na amostra AM₁ 5/45, onde as toxinas poderiam estar dissolvidas na água, concentração igual a 0,95 µg/mL, isto é 950 µg/L, e para as toxinas intracelulares, expresso na amostra MS 5/45, a concentração foi de 0,43 µg/mL, isto é 430 µg/L. Levando em consideração que a amostra analisada apresentava floração de *Microcystis*, a lagoa amostrada apresentava elevada concentração de microcistina-LR.

5.3 MÉTODO ELISA

Outro método utilizado para análise de microcistina é o ELISA, disponível comercialmente sob a forma de kit. Testes com o kit tubos ELISA (Beacon) para análise de microcistina foram realizados com amostras de água em paralelo ao trabalho executado. Os resultados foram bastante contraditórios. A interpretação dos resultados é feita através de leituras no espectrofotômetro, mas as primeiras interpretações podem ser obtidas através da leitura visual, através do qual quanto maior a concentração de microcistina, maior a coloração azul observada. Nos resultados avaliados, o padrão de 1 ppb apresentou uma coloração azul mais forte que a observada no controle negativo (0 ppb). Essas análises foram novamente realizadas, obtendo resultados bastante distintos, afirmando ser este um método muito suscetível a variações, o que impossibilitou sua comparação com os resultados por CLAE deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

Em comparação ao outro método analítico, realizado através do kit ELISA, disponível no mercado para a detecção de microcistinas em água, verificou-se que a técnica por HPLC mantém-se a mais viável. Mesmo apresentando custos elevados, principalmente na compra do padrão analítico, a cromatografia líquida apresenta resultados mais precisos. Isto pode ser claramente evidenciado nos ensaios realizados paralelamente a este trabalho, onde o kit apresentou grande variação, sendo difícil seu uso em laboratórios que tenham essa análise como rotina.

Diante de todos os experimentos realizados ao longo deste trabalho com HPLC, podemos observar que o fator responsável pela interferência nos resultados analíticos foi a sensibilidade das colunas. Tanto C-18 LiChrosorb 7 μm , como a C-18 Spherisorb 5 μm , são colunas de laboratórios antigos que desempenham atividades analíticas rotineiras, onde a coluna é raramente renovada. A partir do momento em que houve a troca da coluna, inicialmente os resultados apresentaram-se satisfatórios, perdendo sua eficiência com o passar das análises, isto é, picos “fantasmas” passaram a ser evidenciados no perfil cromatográfico do padrão em replicata. Outro fator que ajudou a concluir sobre a perda de eficiência da coluna foi quando realizada a limpeza. Após esse processo, a coluna passou a apresentar resultados bastante satisfatórios, o pico tornou-se mais evidente, variando com a área de acordo com a concentração do padrão em análise.

Outro fator que poderia estar interferindo nos resultados analíticos de detecção de microcistina é o detector UV utilizado nas análises. O detector UV-PDA apresenta uma maior sensibilidade quando comparado com UV-VIS. Para a confirmação dessa hipótese, seria necessária a realização da análise cromatográfica nas mesmas condições apresentadas no trabalho, variando apenas o detector.

Diante de todos os problemas enfrentados no desenvolvimento da metodologia analítica, não foi possível realizar a reprodutividade e repetibilidade, impedindo a verificação da robustez do método, não se tornando possível a implantação dessa metodologia como oficial.

Sendo assim, conclui-se que a metodologia poderá ser empregada para a detecção da microcistina-LR, porém não se tornando possível em escala empresarial, pois para a realização de apenas uma análise, e obtenção de resultados mais precisos, o tempo estimado para a entrega do resultado, e o custo analítico devido a realização diária de limpeza da coluna, não se torna viável em escala empresarial. Para que esse procedimento possa ser implantado é preciso salientar a importância de renovação da coluna, pois se trata de um método bastante sensível, e se possível evitar o uso de outros agentes potencialmente prejudiciais à eficiência da coluna.

7 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

Mesmo com todas as dificuldades apresentadas ao longo do trabalho, acreditamos na necessidade de desenvolver o método para detecção de microcistinas-LR através da cromatografia líquida de alta eficiência, pois permite resultados mais precisos com limite de detecção aceitável pela Legislação Portaria 518/04, vigente no momento, diferente do kit Elisa presente no mercado que permite a análise das microcistinas, porém não sendo possível a identificação e quantificação de apenas um tipo de microcistina.

O trabalho mesmo apresentando vários obstáculos, está sendo submetido para apresentação de congresso de cromatografia (COLACRO), e eventual publicação em revista especializada da área.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L. Morfologia e reprodução. In: SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUIARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. **Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. cap.2, p.5-8.
- AZEVEDO, S.M.F.O *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, p.181-182, 441-446, 2002.
- BANKER, R. *et al.* Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, v.33, p. 613-616, 1997.
- BARCO, M. *et al.* Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 23-30, 2005.
- BHATTACHARYA, R. *et al.* Toxicity evaluation of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806: Nephrotoxicity in rats. **Biomed. Environ. Sci.**, v.10, p.93-101, 1997.
- BITENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. Cianobactéria Invasora: Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Rev Biotec. Ciência e Desenv.**, v.30, p.82-90, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria nº 518, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, p. 266-270, 2004.
- CAMPINAS, M. *et al.* Previsão da capacidade de remoção de cianobactérias e cianotoxinas na ETA de Alcantarilha. In: ENCONTRO NACIONAL DE SANEAMENTO BÁSICO, 10., 2002, p.1-14.
- CARMICHAEL W.W. Cyanobacteria secondary metabolites- The Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W.W. Health effects of toxin producing cyanobacteria: the cyano HABs. **Human Ecol. Risk Assess.**, v.7, p.1393-1407, 2001.
- CARVALHO, L.R. Cianotoxinas. In: SANT'ANNA, C.L. *et al.* **Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2006. cap. 3, p.9-19.
- CHEN, Y.M., *et al.* Potencial of a simple solid-phase extracion method coupled to analytical and bioanalytical methods for an improved determination of microcystins in algal samples. **Journal of Chromatography B**, v.844, p. 134-141, 2006.

CHORUS, I; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water**. A Guide to the their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon, 1999.

CLARK, R.M.; COYLE, J. A. Measuring and modeling variations in distributions systems water quality. **Journal of the American Water Works Association**, v.82, p. 46-52, 1989.

COLLINS, C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1997. cap.1, p.11-26.

COSTA, I. A.S. *et al.* Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a brazilian semiarid reservoir. **Bras. J. Biol.**, v. 66, n.1B, p. 211-219, 2006.

DEININGER, R. A. *et al.* Animation and visualization of water quality in distribution systems. **Journal of the American Water Works Association**, v.84, p.48-52, 1992.

DOGO, C. R. **Estudo Químico Quantitativo de Microcistina-LR produzida por *Radiocystis fernandoi*, em diferentes condições de cultivo**. São Paulo. 2006. 23p. Relatório apresentado ao Instituto de Botânica.

FALCONER, I.R. *et al.* Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing Cyanobacterial blooms. **Jornal of The American Water Works Association**, v. 81, n.2, p. 102-105, 1989.

FOSTER, S. **Determinação do risco de contaminação de águas subterrâneas: um método baseado em dados existentes**. São Paulo: Instituto Geológico, 1993.

FREITAS, M.B.; BRILHANTE, O.M.; ALMEIDA, L.M. Importância da análise da água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cad. de Saúde Pública**, v.3, n.17, p.651-660, 2001.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano**. Brasília. 56p. 2003.

GOYER, R. A. Toxic effects of metais. In: CASARETT; DOULL'S. **Toxicology: The basic Science of Poisons**. New York, 1986. p. 582-635.

GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1997. cap.9, p. 183-238.

HAIDER, S. *et al.* Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. **Chemosphere**, v.52, p.1-21, 2003.

HARADA, K.I. *et al.* Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, v.32, p. 73-84, 1994.

HARADA, K.I; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health. Consequences, monitoring and management**. Londres, 1999. p.370-404.

HART, J; FAWELL J.K.; CROLL, B. The fate of both intra- and extracellular toxins during drinking water treatment. **Water Suppl**, v.16, p. 611-616, 1998.

HAWSER, S.P. *et al.* A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. **Toxicon**, v.29, p. 277-278, 1991.

HIMBERG, K. *et al.* The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. **Water Research**, v.23, n.8, p.979-984, 1989.

INCONEX. **Procedimento Kit Beacon Microcistina Tubo**. Disponível em: <www.inconex.com.br/site/Beacon_07.html> Acesso em: 18 jun. 2008.

JOCHIMSEN, E.M. *et al.* Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New Eng J Med**, v.338, p. 873-878, 1998.

KAEBERNICK, M; NEILAN, B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production-Mini Review. **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, p.1-9, 2001.

KAU, C.Y. Paralytic shellfish poisoning. In: FALCONER, I.R. **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**. London: Academic Press, 1993. p.75-86.

KAYA, K. Toxicology of microcystins. In: WATANABE, M.F. *et al.* **Toxic Microcystis**. Boca Raton: CRC Press, 1995, p.175-202.

KEIJOLA, A.M. *et al.* Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot scale experiments. **Toxicity Assessment International Journal**, v.3, p.643-656, 1988.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I; FITZGERALD, J. Human health aspects. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health. Consequences, monitoring and management**. Londres, 1999. p.114-153.

LAKSHMANA RAO, P.V. *et al.* Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and vero cells. **Arch. Toxicol**, v.76, p. 227-235, 2002.

LAM, A.K.Y. *et al.* Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. **Water Research**, v.29, n.8, p.1845-1854, 1995.

LOMBARDO, M. *et al.* Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteriae): A Brazilian toxic cyanobacterium. **Toxicon**, v. 47, p.560-566, 2006.

LUUKKAINEN, R. *et al.* Isolation and identification of eight Microcystins from Thirteen *Oscillatoria a gardhii* Strains and Struture of a New Microcystin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.7, p. 2204-2209, 1993.

MAATOUK, I. *et al.* Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant. **Water Research**, v. 36, p. 2891-2897, 2002.

MAcKINTOSH, C. *et al.* Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **Febs Lett**, v. 264, p. 187-192, 1990.

MATHYS, W; SURHOLT, B. Analysis of microcystins in freshwater samples using higt performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Hyg. Environ. Health**, v.207, p. 601-605, 2004.

McELHINEY, J.; LAWTON, L.A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Appl. Pharmacology**, v. 203, p. 219-230, 2005.

MOHAMED, Z. A.; EL-SHAROUNY, H.M.; ALI, W. S. M. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. **Toxicon**, v.47, p. 584-590, 2006.

MOLICA, R.; CASÉ, M. **Cianobactérias produtoras de toxinas**. ITEP - Instituto de Tecnologia de Pernambuco. Disponível em: <www.sbpcnet.org.br/eventos/recife/textos/MC10_Cianobactérias.pdf> Acesso em: 10 out. 2006.

NATURLINK - **Natureza e Ambiente – Sistemas Aquáticos: Blooms de cianobactérias**. Disponível em: <<http://www.naturlink.pt>> Acesso em: 26 de out. 2006.

NICHOLSON, B.C., ROSITANO, J., BURCH, M.D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Research**, v.28, n.8, p.1297-1303, 1994.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). La salud y el ambiente en el desarrollo sostenible. OPS. Washington, D.C. 2000. Publicación Científica. n. 572.

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

RODRÍGUEZ, E. *et al.* Oxidation of microcystins by permanganate: Reaction kinetics and implications for water treatment. **Water Research**, v. 41, p.102-110. 2007.

SAITO, K. *et al.* Nodularin-Har: a new nodularin from Nodularia. **Journal of Natural Products**, v.64, p. 139-141, 2001.

SANT' ANNA C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Identificação e ilustração dos principais gêneros. In: SANT'ANNA, C.L. *et al.* **Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. cap. 6, p.35-41.

SILVA, R.C.A. **Abrindo mão do direito ao consumidor da água tratada: Feira de Santana – BA**. 1999. Monografia apresentada ao curso de especialização em Direito Sanitário. Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana – Feira de Santana.

SILVA, R.C.A.; ARAÚJO, T.M. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). **Cad.Saúde Pública**, v.4, n.4, p.1019-1028, 2003.

SIM, A.T.; MUDGE, L.M. In: CODD, G.A. *et al.* **Detection Methods for Cyanobacterial Toxins**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, p. 100.

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

SIVONEN, K; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health. Consequences, monitoring and management**. Londres, 1999, p.41-111.

SKULBERG, O.M. *et al.* R. Taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria). In: I. R. Falconer (ed.). **Algal toxins in seafood and drinking water**. London: Academic Press, 1993, p. 145-164.

SOUZA, R.C.R. Introdução. In: SANT'ANNA, C.L. *et al.* **Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006, cap.1, p.1-4.

TEIXEIRA, M.G.L.C. *et al.* Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. **Bol.Sant.Panam.**, v.114, n.6, p. 502-511, 1993.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: CORDEIRO, M. **Algae and Environment: A general Approach**. Brazilian Phycological Society. 1992.

VIEIRA, J.M.S. *et al.* Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v.45, p. 901-909, 2005.