



Fundação Nacional de Saúde

MANUAL PARA SISTEMA DE AVALIAÇÃO QUALITATIVA (P/A) DE MICROCISTINA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

Servio Tulio Cassini

Paulo Wagner P. Antunes

Departamento de Engenharia Ambiental

CT UFES

FUNASA

VITÓRIA/ES, 2019

2019. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde.



Essa obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>; e no Site da Fundação Nacional de Saúde: <http://www.funasa.gov.br/site/publicacoes>

Tiragem: 1ª edição – 2019 – versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Fundação Nacional de Saúde

Departamento de Engenharia de Saúde Pública (Densp)

Coordenação Geral de Cooperação

Técnica em Saneamento (Cgcot)

Coordenação de Informação e Tecnologia em Saneamento (Codet)

Edifício PO 700 – Setor de Rádio e

Televisão Norte (SRTVN) – Quadra 701 –

Lote D – 2º andar

CEP: 70.719 - 040, Brasília – DF

Tel: (61) 3314-6233

Home page: <http://www.funasa.gov.br>

UFES

Universidade Federal do Espírito Santo

Departamento de Engenharia Ambiental -

DEA CT UFES

Programa de Pós Graduação em

Engenharia Ambiental - PPGEA

29060-910 Vitória ES

Elaboração de texto

Servio Tulio Cassini

Paulo Wagner P. Antunes

Apoio

Esta publicação é um dos produtos da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA CROMOFLUOROGÊNICO QUALITATIVO (P/A) DE AVALIAÇÃO DE MICROCISTINA VISANDO O SUPORTE AS AÇÕES DE VIGILÂNCIA A QUALIDADE DE ÁGUAS (MICROCIST)”, desenvolvida com recursos do Programa de Pesquisa em Saúde e Saneamento da Funasa.

Capa, projeto gráfico e diagramação

Servio Tulio Cassini

Paulo Wagner P. Antunes

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde.

Manual para sistema de avaliação qualitativa (p/a) de microcistina em amostras de águas / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília : Funasa, 2019. 21 p.

ISBN 978-85-7346-059-9

1. Tratamento da Água. 2. Qualidade da Água. I. Título.

CDU.628.1

Catálogo na fonte – Divisão de Museu e Biblioteca – Funasa

Títulos para indexação

Em inglês: MANUAL FOR QUALITATIVE EVALUATION (P / A) OF MICROCYSTIN IN WATER SAMPLES.

Em espanhol: MANUAL PARA EVALUACIÓN CUALITATIVA (P / A) DE MICROCISTINA EN MUESTRAS DE AGUA.

SUMÁRIO

1. Apresentação	03
2. Introdução	04
3. Desenvolvimento de sistema de detecção de microcistina como ferramenta auxiliar para os programas de monitoramento da qualidade de águas	06
3.1. Florações tóxicas e sua detecção	07
3.2. Procedimentos metodológicos	09
3.2.1. Imobilização em enzimática fosfatase PP1A	09
3.2.2. Determinação da eficiência de imobilização	10
3.2.3. Ensaio fluorogênicos	11
3.2.4. Efeito da matriz de amostras de águas	12
4. Vantagens, limitações e indicativos de custos	14
5. Referências bibliográficas	18

1. APRESENTAÇÃO

O pressuposto básico da saúde ambiental é o contínuo monitoramento da qualidade de águas, solo e ar. No caso de qualidade de águas, há ferramentas de monitoramento que se correlacionam com a presença de patógenos específicos, permitindo uma maior percepção dos riscos para populações humanas e animais em determinados ambientes.

A poluição antrópica de corpos d'água tem uma consequência visível e direta no fenômeno da eutrofização, caracterizado pela presença e crescimento robusto de florações algáceas nesses corpos d'água. A presença de microalgas, e especialmente de cianobactérias, como parte desse processo de eutrofização pode ser visivelmente constatada e tem como consequência direta a possibilidade da presença de toxinas ambientais, denominadas genericamente de cianotoxinas. Estas podem atingir as populações humanas e animais, representando, assim, um elevado risco e perda da qualidade de vida das populações e comunidades em contato direto e dependência desses corpos d'água.

O monitoramento de cianotoxinas em corpos d'águas atualmente é realizado por diversas técnicas analíticas quantitativas, todas elas com elevado custo financeiro e demora nos resultados analíticos. Entretanto na grande maioria dos casos, a análise de amostras de águas reflete um resultado negativo, contribuindo para incremento dos custos. A proposta deste manual é apresentar um sistema analítico-qualitativo (P/A), como uma primeira linha analítica para detecção qualitativa de microcistinas. Posteriormente, pode-se adotar uma segunda linha analítica, ou seja, realizar análises quantitativas apenas para as amostras positivas no caso P/A.

Este Manual é um dos produtos da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA CROMOFLUOROGÊNICO QUALITATIVO (P/A) DE AVALIAÇÃO DE MICROCISTINA VISANDO O SUPORTE AS AÇÕES DE VIGILÂNCIA A QUALIDADE DE ÁGUAS (MICROCIST)”, desenvolvida com recursos do Programa de Pesquisa em Saúde e Saneamento da Funasa.

2. 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. Essa dominância está associada à elevada diversidade metabólica apresentada pelas cianobactérias que favorece o crescimento exuberante de algumas espécies, nos chamados “*blooms*” ou florações de cianobactérias. Essa diversidade também é responsável pela alta resistividade às variações ambientais, fazendo com que esses microrganismos sejam encontrados nos mais diferentes habitats aquáticos: oceanos, estuários, mangues e, principalmente, em ambientes aquáticos continentais, como rios, lagos e reservatórios, em diversas regiões tropicais, subtropicais (Sant’anna *et al.* 2008).

As florações causam grande impacto negativo nos corpos d’água, alterando as características visuais e de qualidade, como odor e sabor. Porém o principal impacto está relacionado com a presença de toxinas específicas produzidas por certas espécies e linhagens de cianobactérias denominadas cianotoxinas, elas podem ser produzidas em todos os estágios do crescimento da célula, sendo liberadas somente quando ocorre o rompimento dessa célula. No meio aquoso, as cianotoxinas podem persistir por dias ou várias semanas (Sivonen e Jones, 1999; Chorus e Bartram, 1999; Chen *et al.*, 2011).

As principais cianotoxinas são classificadas em hepatoxinas e neurotoxinas. As hepatotoxinas foram primeiramente isoladas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e suas toxinas foram, então, denominadas microcistinas. No entanto, a produção desses peptídeos não se restringe exclusivamente a essa espécie, visto que outras cepas tóxicas já foram citadas como produtoras de microcistinas. Dessa 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

(Nobre *et al.*, 1999; Dias *et al.*, 2009). No Brasil, as legislações pertinentes, estabelecem a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias e de microcistinas, sendo a concentração de 1 µg/L, o valor máximo 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 (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Clae), bioquímicas (ensaio de inibição da fosfatase, Elisa, biologia molecular) ou biológicas (bioensaios, testes de toxicidade). A escolha do método mais adequado vai 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 caso de risco em potencial, as decisões cabíveis sejam tomadas rapidamente (Mcelhiney e Lawton, 2005; Gaget *et al.*, 2001). 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 ao desenvolvimento de metodologias simplificadas capazes 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). A proposta deste manual é apresentar uma metodologia de um sistema qualitativo (P/A) para a detecção de microcistinas e sua utilização como indicador primário da presença da toxina em amostras de águas. Além disso, rotinas de análises por CLAE (HPLC) foram estabelecidas pela validação de um método menos tóxico, para serem utilizadas como metodologias de referência na separação e quantificação de microcistinas em

amostras de águas (Cassini *et al.*, 2014). A proposta do sistema qualitativo utilizando a enzima fosfatase alcalina (PP1A) imobilizada e o substrato sintético 4-metil-umbeliferil-fosfato (MUP) mostrou-se uma alternativa de menor custo e de execução facilitada. Nesse sistema, uma avaliação qualitativa da presença ou ausência (P/A) funciona como uma importante ferramenta de avaliação em primeira linha nos programas de monitoramento. Após a sua detecção qualitativa PA, as amostras de água podem ser processadas por sistemas analíticos visando a sua quantificação e determinação de microcistinas presentes nas amostras. Esta estratégia de monitoramento além de diminuir o tempo de análise pode representar uma significativa redução nos custos de análise.

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

O principal objetivo deste manual é apresentar uma metodologia alternativa de avaliação qualitativa tipo presença/ausência (P/A) para avaliação de microcistinas em amostras de águas inicialmente descrita por Antunes (2013). Os métodos analíticos quantitativos atuais para a detecção dessa toxina ainda são trabalhosos e de alto custo. Além disso, esses 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 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, 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.

3.1 Florações tóxicas e sua detecção

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 (Sant'anna e Azevedo, 2000; Mcelhiney and Lawton, 2005; Sirqueira e Oliveira-Filho, 2007; Blaha *et al.*, 2009).

A detecção e a 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 imunoenensaio tipo Elisa. A CLAE, além de requerer equipamento caro e pessoal altamente qualificado, ainda envolve análises demoradas e exige trabalhosos métodos de concentração e clarificação de amostras ambientais. Os testes de Elisa de fácil execução e necessidade mínima de amostra possuem baixa especificidade, alto custo e não apresentam correlação entre a reatividade e a toxicidade aguda, uma vez que avaliam a presença da molécula de microcistina, independentemente de estar ativa ou não. Dessa forma, mesmo que essas técnicas já estejam padronizadas, a sua aplicabilidade na rotina de monitoramento ambiental ainda é limitada.

Um dos principais fatores responsáveis pelo alto custo das análises de microcistina é que a grande maioria das amostras apresenta níveis da toxina abaixo de 1 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. Baseado nos estudos sobre o mecanismo de inibição de enzimas fosfatases de células eucarióticas pelas moléculas de microcistinas (Mackintosh *et al.*, 1990), ficou demonstrado nos ensaios enzimáticos que a concentração da toxina é inversamente proporcional à concentração do grupo fosfato liberado pelo substrato sintético. Geralmente, esses 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 (Merel *et al.*, 2013).

Os ensaios enzimáticos caracterizam-se pela rapidez e sensibilidade, detectando a presença da molécula de microcistina ativa, ou seja, aquela 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 esse tipo de ensaio não se encontra disponível na forma de kits de análises. A dificuldade do desenvolvimento desses kits está relacionada, principalmente, à alta instabilidade da enzima e também do substrato em soluções aquosas (Gaget *et al.*, 2017).

Uma maior estabilidade e melhor desempenho da enzima podem ser alcançados com o processo de imobilização de enzimas que possui uma série de aplicações, teóricas e práticas, com objetivo de aumentar sua eficiência. Porém a sua utilização em larga escala ainda apresenta alguns entraves devido, principalmente, ao processo de ativação e imobilização, para os quais são utilizadas elevadas quantidades de reagentes potencialmente redutores da atividade enzimática. Um método de imobilização recentemente desenvolvido por Bouaicha *et al.* (2002), foi especialmente aplicado para enzimas fosfatases alcalinas por permitir ligações cruzadas entre enzimas e o sistema suporte.

Assim, o presente manual tem por objetivo apresentar 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.

3.2. Procedimento Metodológico

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, Estados Unidos). O substrato sintético 4-metil-umbeliferil-fosfato-MUP (cod.44093) utilizado foi da marca Glycosynth (Cheshire, Reino Unido). As soluções estoque de microcistinas foram preparadas com metanol grau Clae da marca Tedia (Fairfield, USA) através de diluições da solução estoque em água ultrapura (MiliQ Plus, Milipore, Belford, Estados Unidos).

3.2.1 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, Alemanha). Para ativação das membranas, tiras retangulares (1x3 cm) foram submersas em solução de ácido clorídrico concentrado e mantidas em agitação por duas horas. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada, secas por 15 minutos em estufa a 100°C e adicionadas em solução de tolueno contendo 2% (v/v) 3-aminopropil-trimetoxisilano. Após serem submetidas a um refluxo a 80°C por 18 horas, 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 ml com tampa, as quais serviram de suporte para os ensaios de imobilização enzimática.

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 $\mu\text{g/L}$. Em seguida, as cubetas foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas por duas horas e armazenadas a 4°C até o momento dos testes. Os diversos passos ou etapas deste procedimento estão ilustrados na figura 1.

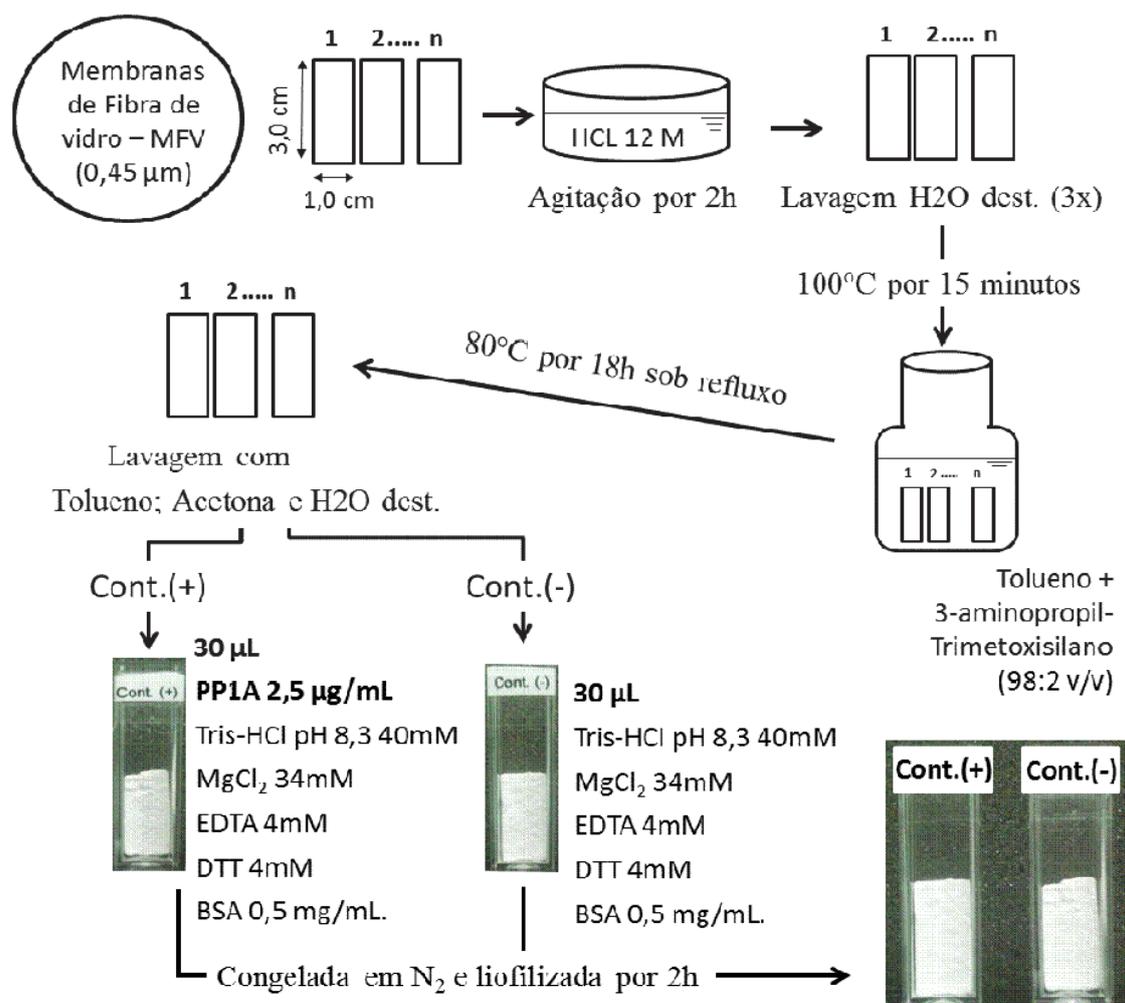


Figura 1 – Principais etapas do processo de imobilização da enzima PP1A em membranas de fibra de vidro

3.2.2 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 mg) da enzima, em triplicata, foram quantificadas e seus valores médios, aplicados na curva analítica, relacionando a atividade enzimática com de PP1A livre. A fração da enzima PP1A imobilizada foi estimada utilizando a equação obtida a partir da curva analítica.

3.2.3 Ensaio 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), com base nos trabalhos de Bouaicha *et al.* (2002) e Sassolas *et al.* (2011). 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 ml, através da adição de 50 µL de PP1A 0,25 µg/ml, 2.000 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. Os principais resultados estão ilustrados na figura 2.

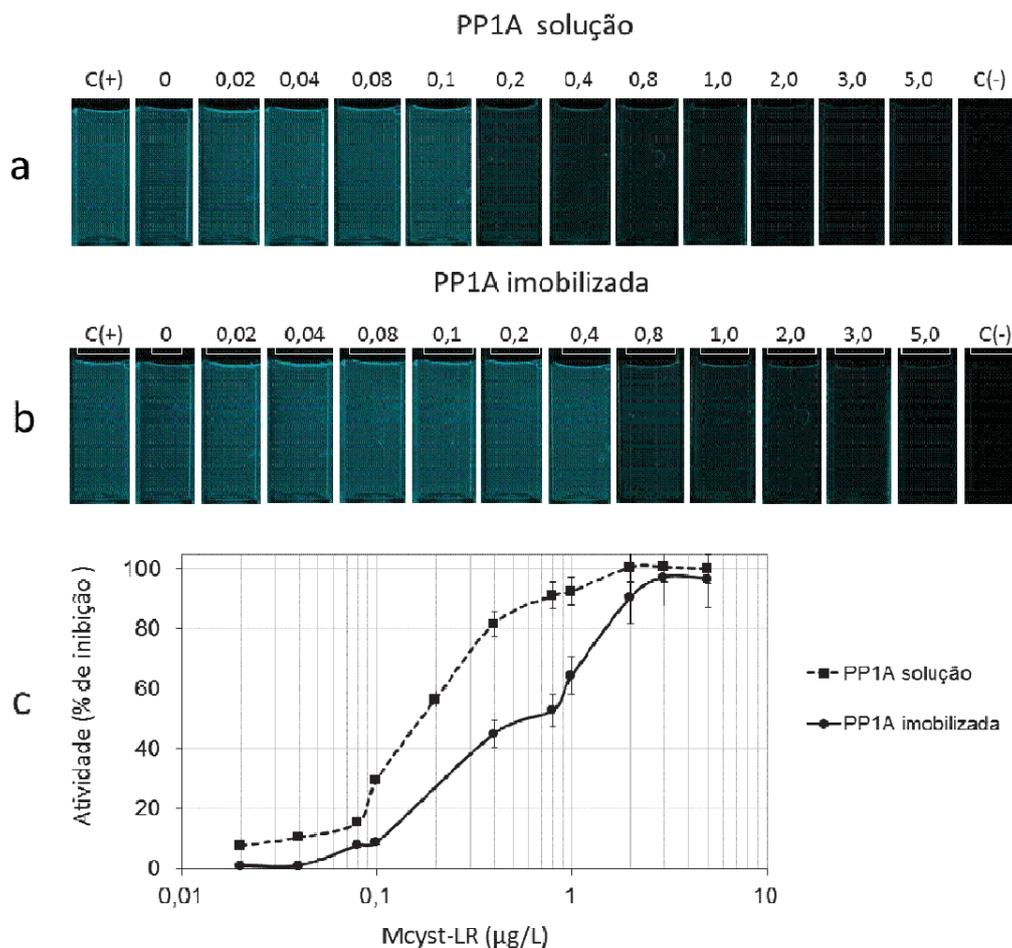


Figura 2 - Reações com a enzima PP1A livre (a) e imobilizada (b), na presença de Mcyst-LR nas concentrações entre 0,02 e 5 µg/L. (c) Gráfico de regressão logística sigmoide de inibição da enzima PP1A

3.2.4 Efeito da matriz de amostras de água

O efeito das diferentes matrizes de água sobre a atividade do sistema simplificado de detecção de microcistina (Mcyst-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 Mcyst-LR na concentração final de 1 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, Espírito Santo, 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 µg/L. A atividade do sistema foi avaliada com amostras de águas não fortificadas das diferentes origens e comparadas com suas respectivas amostras fortificadas e ilustradas na figura 3.

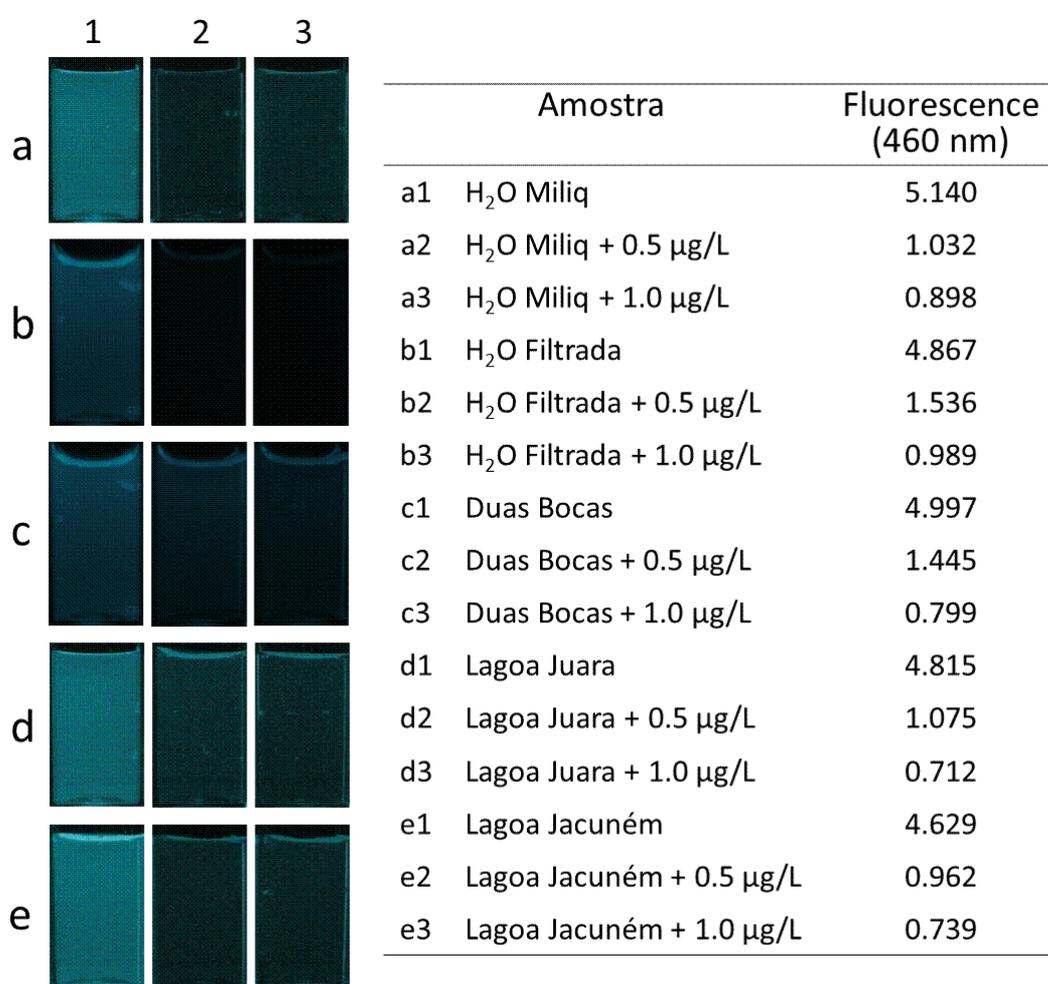


Figura 3 - Atividade do sistema imobilizado de detecção aplicado em amostras de águas de diferentes origens (ultrapura, filtrada, Duas Bocas, Juara e Jacuném) não fortificadas e fortificadas com 0,5 e 1 µg/L de Mcyst-LR

4. VANTAGENS, LIMITAÇÕES E INDICATIVOS DE CUSTOS

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 a 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. 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 dessa 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. Nesse sistema de detecção, a 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 esse critério de dois níveis de tomada de decisão, no qual o primeiro nível é qualitativo e o segundo 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 reduzem o número de análises quantitativas que apresentam onerosos custos.

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 (HPLC). 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.

Em relação as outras metodologias de detecção de microcistinas (cianotoxinas) podemos apresentar o seguinte quadro (quadro 1).

Quadro 1 – Principais metodologias de avaliação de cianotoxinas e suas desvantagens

Metodologia	Vantagens	Desvantagens	Observações
Microscopia (contagem de células <i>Microcystis</i> sp)	Facilidade de avaliação por observação microscópica.	Baixa correlação com presença de toxina	Tempo de análise e exigência de pessoal treinado
HPLC (CLAE)	Elevada sensibilidade	Elevado custo e tempo de processamento amostral	Necessita de etapa de concentração amostral e equipamentos com pessoal treinado
ELISA (imunológico)	Elevada sensibilidade e rapidez	Custo elevado e pessoal qualificado	Processamento de amostras em conjunto (90 amostras)
Inibição da fosfatase (PP1)	Rapidez pela detecção visual da reação de inibição	Baixa resolução para modo quantitativo	Pode ser avaliado de modo qualitativo (P/A)
Reação de PCR	Rapidez e elevada correlação com toxicidade	Necessidade de laboratório com pessoal altamente treinado	Pode ser acoplado com detecção genética de linhagens

Com relação ao procedimento proposto de Ensaio Qualitativo (P/A) de detecção de microcistinas por inibição enzimática (fosfatase), podemos estimar os custos laboratoriais (quadro 2).

Quadro 2: Estimativas de custos para o procedimento de avaliação PA de microcistinas em amostras de águas, considerando a confecção de 100 Kits analíticos, (sem considerar instalações e equipamentos)

Item	Quant (Unid)	Custo por 100 análises (R\$)
Substratos e reagentes ⁽¹⁾	Div	252,60
Enzimas (Pase PP1) ⁽²⁾	U/imobilização	343,30
Cubetas e material de imobilização	100	245,00
Mão de obra e estocagem ⁽³⁾	kit	160,00
Total		1000,90

(1) Considerando-se substrato MUP (25 µg/kit) e agente imobilizante com drogas importadas.

(2) Enzima recombinante PASE PP1 (Sigma)

(3) Considerando-se 2 técnicos em processamento contínuo para produção de 400 kits/mês.

Podemos estimar, assim, que o custo unitário para a produção do kit de detecção qualitativa de microcistina situa-se em torno de R\$10,0 (dez reais) por unidade de avaliação (kit). Devemos ressaltar que estes custos foram estimados com base em compra de produtos de laboratório em pequena escala. Podemos inferir que, no caso de produção em escalas superiores, o custo tende a reduzir significativamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, PWP. Otimização e desenvolvimento de sistemas de detecção de Microcistinas em amostras de águas. Tese Doutorado Programa de Pós graduação em engenharia ambiental UFES. 165 pp 201. (2013). Acesso em 21.10.2018
http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_6736_Antunes%2C%20P.W.A.%20-%20Tese%20Doutorado%20Final.pdf
- 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. **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. 2002.
- 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.
- CHEN, H.; BURKE, J.M.; PREPAS, E.E.). **Cyanobacterial toxins in fresh Waters**. *Encyclopedia of Environmental Health*, p.860-871. 2011
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon. p.369-405. 1999.
- DIAS, E.; ANDRADEA, M.; ALVERCA, E.; PEREIRA, P.; BATOREU, M.C.C.; JORDANB, P.; SILVA, M.J. **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. (2009).
- FALCONER I.R. **Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs** I.R. Falconer (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, London pp. 165-175. 1993.
- GAGET V., LAU M., SENDALL B., FROSCIO S., HUMPAGE A.R. Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Research* 118: 227-238. 2017.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. **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. 1990.
- McELHINEY, J., LAWTON, L.A. **Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.219– 230. 2005.
- MEREL S., WALKER D., CHICANA R., SNYDER S., BAURES E., THOMAS O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms. *Environment International* 59 (2013) 303–327. 2013.
- NOBRE, M.M.Z.A. **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. 1997.
- RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. **Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods**. *Analytica Clinica Acta*. n.466, p.213-231. 2002.
- RIVASSEAU, C., RACAUD, P., DEGUIN, A., HENNION, M-C. **Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples**. *Analytica Chimica Acta*, v.394, p.243-257. 1999.
- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. **Review of toxic Cyanobacteria in Brazil**. *Algological Studies*, Stuttgart, v. 126, p. 215-265. 2008.
- SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. **Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil**. *Nova Hedwigia*, Weinheim, v.71, n.3/4, p.359-385. 2000.

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

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

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

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

