

MINISTÉRIO DA SAÚDE

CIANOBACTÉRIAS/CIANOTOXINAS

PROCEDIMENTOS DE COLETA, PRESERVAÇÃO E ANÁLISE



Brasília / DF • 2015

CIANOACTÉRIAS/CIANOOTOXINAS

PROCEDIMENTOS DE COLETA, PRESERVAÇÃO E ANÁLISE



Página intencionalmente em branco

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador

CIANOACTÉRIAS/CIANOTOXINAS

PROCEDIMENTOS DE COLETA, PRESERVAÇÃO E ANÁLISE



Brasília / DF • 2015

2015 Ministério da Saúde.



Esta 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 desta 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: <www.saude.gov.br/bvs>.

Tiragem: 1ª edição – 2015 – Versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador
Setor Comercial Sul, Quadra 4, bloco A, 5º andar
CEP: 70304-000 – Brasília/DF
Site: www.saude.gov.br/svs
E-mail: viagiagua@saude.gov.br

Produção:

Núcleo de Comunicação/SVS

Organização:

Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental

Colaboração:

Giulliani Alan da Silva Tavares de Lira
Renato José Reis Molicia
Cícero Tiago da Silva Gomes

Revisão:

Rodrigo Matias de Sousa Resende

Imagens e Ilustrações:

Giulliani Alan da Silva Tavares de Lira
Ariadne do Nascimento Moura

Capa e diagramação:

Fred Lobo – Núcleo de Comunicação/SVS

Editora responsável:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria-Executiva
Subsecretaria de Assuntos Administrativos
Coordenação-Geral de Documentação e Informação
Coordenação de Gestão Editorial
SIA, Trecho 4, lotes 540/610
CEP: 71200-040 – Brasília/DF
Tels.: (61) 3315-7790 / 3315-7794
Fax: (61) 3233-9558
Site: <http://editora.saude.gov.br>
E-mail: editora.ms@saude.gov.br

Equipe editorial:

Normalização: Francisca Martins Pereira – Editora MS

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador.

Cianobactérias/cianotoxinas : procedimentos de coleta, preservação e análise / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015.

106 p. : il.

Modo de acesso: World Wide Web: <www.saude.gov.br/svs>.

ISBN 978-85-334-2218-6

1. Cianobactérias. 2. Análise da água. 3. Análise bacteriológica. I. Título.

CDU 628.16

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2015/0019

Títulos para indexação:

Em inglês: Cyanobacteria/Cyanotoxins: procedures for collection, preservation and analysis

Em espanhol: Cianobacterias/Cianotoxinas: procedimientos de colecta, preservación y análisis

Sumário

Apresentação	9
1 Coleta de cianobactérias – procedimento de amostragem e reconhecimento de florações	11
1.1 Importância do procedimento de coleta	11
1.2 Finalidade da coleta	12
1.2.1 Avaliar a variabilidade espacial horizontal e/ou vertical das cianobactérias	13
1.2.2 Conhecer a variabilidade temporal das cianobactérias	14
1.2.3 Conhecer a diversidade das cianobactérias	14
1.2.4 Avaliar os efeitos ambientais sobre as cianobactérias	14
1.2.5 Avaliar a presença de cianobactérias em água de hemodiálise	14
1.2.6 Atender as recomendações da Portaria Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011	16
1.3 Instrumento e utensílios para amostragem	17
1.3.1 Rede de plâncton	17
1.3.2 Garrafa de coleta em profundidade	18
1.3.3 Balde ou recipiente de abertura larga (boca larga)	19
1.3.4 Funil de vidro ou metal	20
1.4 Acondicionamento, preservação, transporte e armazenamento de amostras	20
1.4.1 Preservação de amostras	21
1.4.2 Transporte de amostras	22
1.4.3 Armazenamento de amostras	23
1.5 Procedimento de coleta para análise de cianobactérias	24
1.6 Cuidados durante o procedimento de coleta	24
1.6.1 Cuidados para o técnico	25
1.6.2 Cuidados para a coleta	25
1.7 Reconhecimento de florações	27
1.8 Roteiro resumido para amostragem	28
Referências	30
2 Coleta, preservação e transporte das amostras de água para pesquisa de cianotoxinas	31
2.1 Definição do local de coleta em mananciais	31
2.2 Definição da profundidade de coleta em mananciais	33

2.3 Como coletar amostras em mananciais	33
2.3.1 Equipamento para coleta	34
2.3.2 Florações com baixa densidade celular	34
2.4 Preparação das amostras	36
2.5 Coleta: água tratada	38
2.6 Preparação das amostras para análise por ensaio imunoenzimático (ELISA)	38
Referências	39
3 Conceitos básicos para o estudo de cianobactérias – princípios de identificação e quantificação	40
3.1 Entendendo conflitos sobre cianobactérias	41
3.1.1 Semelhanças e diferenças entre cianobactérias e bactérias	42
3.2 Alguns grupos representantes da comunidade fitoplanctônica	43
3.2.1 Chlorophyceae (algas verdes)	45
3.2.2 Zygnematomyceae (desmídeas)	46
3.2.3 Euglenophyceae (euglenas)	47
3.2.4 Bacillariophyceae (diatomáceas)	48
3.2.5 Cryptophyceae	50
3.2.6 Chrysophyceae	50
3.2.7 Dinophyceae (dinoflagelados)	51
3.3 Cianobactérias	51
3.3.1 Chroococcales	52
3.3.2 Oscillatoriales	54
3.3.3 Nostocales	56
3.3.4 Stigonematales	57
3.4 Análise Qualitativa	57
3.5 Laboratório de Análises de Cianobactérias	59
3.5.1 Resumo dos equipamentos e acessórios do laboratório	63
3.5.2 Biossegurança no laboratório	64
3.6 Preliminares da contagem de cianobactérias	64
3.7 Contagem de cianobactérias	67
3.7.1 Método de Utermöhl	67
3.7.2 Aplicação do cálculo de densidade de cianobactérias	73
3.7.3 Método de Sedgwick-Rafter	75

Referências	76
4 Conceitos básicos para o estudo de cianotoxinas – princípios de identificação e quantificação	77
4.1 Toxinas produzidas pelas cianobactérias	78
4.1.1 Neurotoxinas	78
4.1.2 Hepatotoxinas	79
4.2 Análise de cianotoxinas	81
4.2.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-CLAE)	82
4.2.2 Análise de Microcistinas	83
4.2.3 Análise de Saxitoxinas	89
4.2.4 Análise de Cilindropermopsina	100
Referências	102
Glossário	103

Página intencionalmente em branco

Apresentação

As cianobactérias são micro-organismos procariotos, fotossintetizantes e que estão presentes na maioria dos ecossistemas do nosso planeta. Dentre os aproximadamente 150 gêneros descritos, 40 estão relacionados com a produção de algum tipo de toxina. Entretanto, à medida que novas pesquisas são feitas tem sido relativamente comum o fato de gêneros descritos como não produtores de cianotoxinas serem relatados como produtores. Deste modo, a princípio, qualquer cianobactéria pode ser considerada como potencialmente produtora de cianotoxinas.

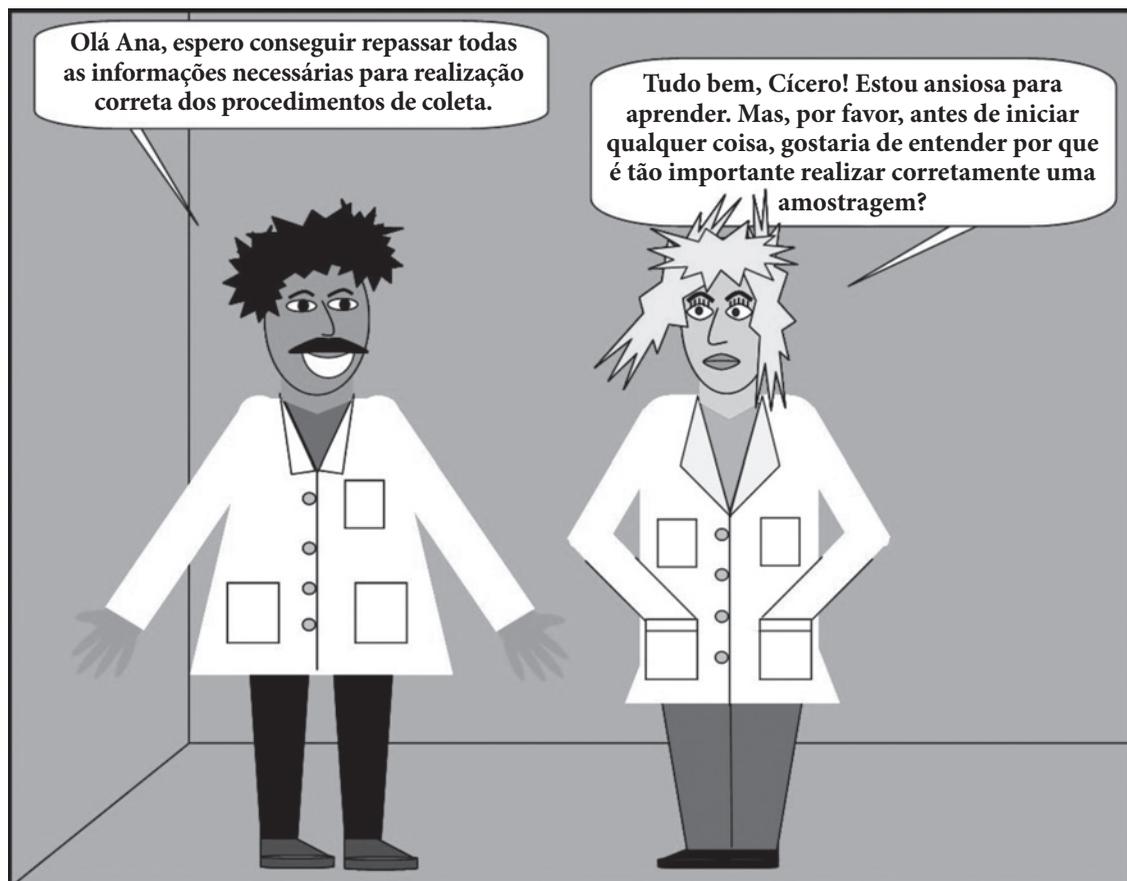
Até 1996, o estudo das cianobactérias abordava assuntos relacionados à “evolução” dos seres vivos, “taxonomia”, “sistemática”, “ecologia”, etc. A partir do referido ano, após o evento dos óbitos de pacientes em uma clínica de hemodiálise no município de Caruaru-PE, em decorrência da contaminação da água por hepatotoxina (Microcystina L-R), um novo olhar foi direcionado ao estudo desses organismos. Pode-se afirmar, sem nenhuma restrição, que a tragédia da hemodiálise, como assim ficou conhecida, configurou-se como um marco nas mudanças de pensamento sobre as cianobactérias. Da mesma forma, no Brasil, a legislação que rege as normas de potabilidade da água foi adequada a essa realidade, estando suas considerações atualmente descritas na Portaria Ministério da Saúde, nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, destacando-se, até o momento, como o único país a realizar tal feito.

A Portaria MS nº. 2.914/2011 estabelece a obrigatoriedade (Microcistinas e Saxitoxinas) ou recomendação (Cilindrospermopsinas e Anatoxina-a(s)) para análise de cianotoxinas. Trata-se de uma etapa crucial, uma vez que a capacidade de detectar essas toxinas na água de consumo humano representa uma garantia de não expor os consumidores a riscos associados à saúde. Atualmente, existem várias metodologias, com diferentes limites de detecção, especificidades e custos, capazes de identificar a presença de cianotoxinas na água de consumo humano. Nesse documento serão discutidas algumas delas, focando principalmente nas mais viáveis de serem implantadas em laboratórios da rede pública de saúde.

Nesse sentido, a elaboração desse documento tem por objetivo abranger plenamente o tema relacionado aos procedimentos de coleta, preservação e análise de cianobactérias/cianotoxinas em mananciais utilizados para o abastecimento público, sendo direcionado, principalmente, para os profissionais de saúde da vigilância da qualidade da água para consumo humano e dos laboratórios de saúde pública, de forma a subsidiar as ações relacionadas ao setor saúde.

O presente instrumento traz consigo, ainda, uma mescla de informações conceituais já preconizadas ao tema e curtos diálogos informais entre dois personagens: o Analista Cícero, especialista em análise de cianobactérias/cianotoxinas e a Técnica iniciante Ana, futura responsável pela coleta e análise desses organismos e de seus metabólitos secundários, que debatem dúvidas sobre os procedimentos relacionados. O referido método didático será utilizado durante todo o conteúdo desse documento. É válido salientar que apesar das informações estarem direcionadas para as cianobactérias, os procedimentos aqui mencionados são também aplicados aos estudos fitoplanctônicos e muitas vezes, ao longo do texto, termos relacionados podem ser utilizados.

1 Coleta de cianobactérias – procedimento de amostragem e reconhecimento de florações



Fonte: SVS/MS.

1.1 Importância do procedimento de coleta

A realização correta de uma amostragem, em qualquer área do conhecimento que requeira tal procedimento, consiste em uma etapa de fundamental importância para representação significativa do ambiente e/ou ecossistema estudado. Nesse sentido, para o estudo das cianobactérias, a adoção de técnicas seguras e convencionais representam o alicerce principal para as análises qualitativa e quantitativa desses organismos. Atualmente, o monitoramento de cianobactérias, além de servir a uma exigência legal, é uma das ferramentas mais eficientes na predição de florações desses organismos e suas conseqüentes complicações, possibilitando alternativas preventivas e amenizando seus efeitos.



Fonte: SVS/MS.

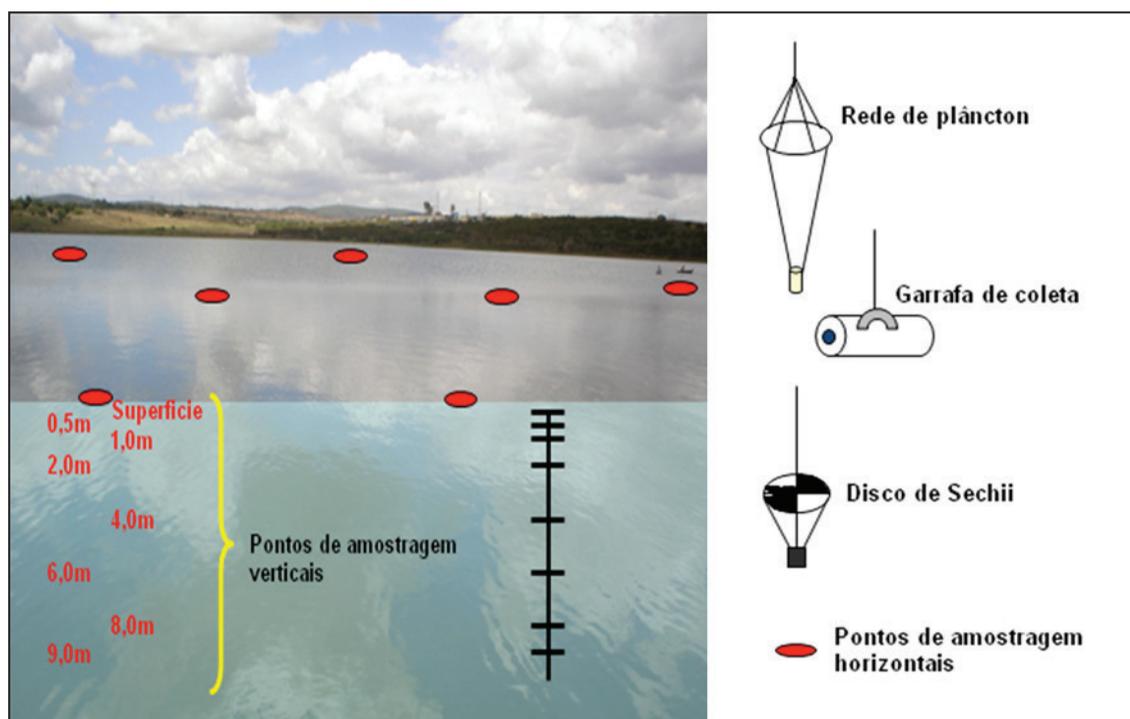
1.2 Finalidade da coleta

A coleta deve ser definida de acordo com a necessidade de sua realização, ou seja, em concordância com sua finalidade. A partir de uma amostragem pode-se definir ou inferir inúmeras suposições sobre a comunidade estudada e/ou o ambiente avaliado. A estratégia de amostragem é fundamental para que as respostas ou objetivos do pesquisador sejam expressados. A estratégia também definirá as ferramentas de coleta (instrumentos de coleta) a serem utilizadas durante a amostragem que, por sua vez, variam de acordo com o objetivo proposto. A seguir, veremos potenciais exemplos de coleta aplicados às cianobactérias ou comunidades fitoplanctônicas, apresentando suas respectivas estratégias e ferramentas de amostragem que podem ser utilizadas para o atendimento dos objetivos.

1.2.1 Avaliar a variabilidade espacial horizontal e/ou vertical das cianobactérias

Estudos de variabilidade espacial demandam maior esforço amostral, podendo ser realizadas coletas em diversos pontos do ambiente (espacial horizontal) ou em várias profundidades (espacial vertical). A maior amplitude amostral nesses casos tem como finalidade contemplar diferentes microhabitats ou compartimentos do ecossistema, gerando indicadores estatisticamente representativos. Em um único ambiente aquático podem haver diversos compartimentos que, por sua vez, dependendo da influência de fatores internos (temperatura da água, profundidade, pH, fluxo de comunicação com o sistema, tipo de solo, etc.) e externos (temperatura ambiente, vento, irradiância, atividades humanas, etc.), apresentam floras algais distintas. A morfometria do ecossistema configura-se como um dos principais fatores de diferenciação para formação de compartimentos em um sistema aquático. Quanto aos instrumentos necessários para realização da amostragem e atendimento do objetivo proposto, deve-se utilizar recipientes de abertura larga como um balde, para coleta direta da água na superfície (estudo quantitativo); rede de plâncton, para concentração dos organismos e ampliação do número de espécies identificadas (estudo qualitativo) e garrafa de coleta em profundidade ou instrumento de função semelhante (estudos quantitativo ou qualitativo), para coletas em profundidades. As profundidades podem ser definidas de acordo com a penetração de luz, utilizando-se disco de Secchi, ou ainda, estabelecidas com alguma outra ferramenta de acordo com a necessidade da pesquisa (Figura 1).

Figura 1 – Esquema representativo da distribuição de pontos de coleta para estudo da variabilidade espacial fitoplanctônica e ilustrações de equipamentos de coleta



Fonte: SVS/MS.

1.2.2 Conhecer a variabilidade temporal das cianobactérias

Em pesquisas que têm como objetivo a variabilidade temporal deve ser estabelecido um único ponto ou poucos pontos de coleta e realizar amostragens com períodos variando em torno das horas (coletas nictimerais, acompanhamento do ritmo circadiano, etc.), dias, semanas, meses ou anos. Tais estratégias de amostragem favorecem a identificação de modelos de comportamento da comunidade fitoplanctônica, como por exemplo: a observação de padrões diários, determinados pela variação da luz; padrões sazonais, identificados pelo estabelecimento dos períodos climáticos e na ocasião de coletas por vários anos seguidos, em um mesmo ambiente, pode-se observar padrões de degradação, sejam estes provenientes de efeitos naturais ou artificiais. Os mesmos instrumentos de coleta necessários para avaliação quantitativa e qualitativa da comunidade são também utilizados para o atendimento do objetivo em questão.

1.2.3 Conhecer a diversidade das cianobactérias

Para o conhecimento da biodiversidade da comunidade ou de um grupo específico, as coletas são mais simples. As amostragens devem ser realizadas em diversos pontos do ambiente, visando maior amplitude amostral e em diferentes períodos climáticos, para contemplar espécies temporais (sazonais). Amostragens que visam apenas a diversidade da comunidade são realizadas com o auxílio de redes de plâncton, recipientes de abertura larga e garrafas de coleta em profundidade.

1.2.4 Avaliar os efeitos ambientais sobre as cianobactérias

A resposta à influência dos efeitos ambientais nas cianobactérias deve ser estabelecida a partir de amostragens em curtos intervalos de tempo e em um menor número de pontos ou estações de coleta. O fator temporal deve ser bem definido evidenciando-se os limites de mudança dos períodos climáticos para a região de estudo. O máximo de variáveis bióticas e abióticas que apresentem relação com a comunidade devem ser abordadas. Para esse tipo de amostragem também utilizam-se redes de plâncton, recipientes de abertura larga e garrafas de coleta em profundidade.

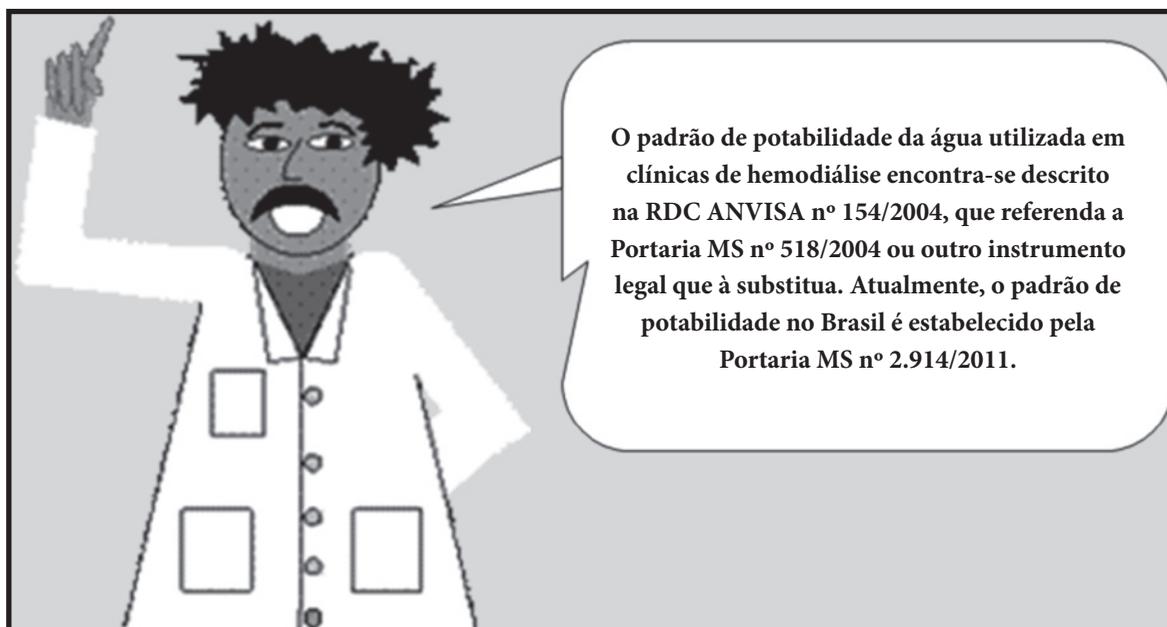
1.2.5 Avaliar a presença de cianobactérias em água de hemodiálise

A análise de cianobactérias em águas utilizadas em clínicas de hemodiálise é uma exigência legal, quando a resolução que dispõe sobre a qualidade da água para ser utilizada em clínicas de diálise, a Resolução da Diretoria Colegiada – ANVISA nº 154, de 15 de junho de 2004, *Capítulo 8 – Qualidade da água*, considera que:

8.2. A água de abastecimento dos serviços de diálise proveniente da rede pública, de poços artesianos ou de outros mananciais deve ter o seu padrão de potabilidade em conformidade com o disposto na Portaria MS n.º 518, de 25 de março de 2004, ou de instrumento legal que venha a substituí-la. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004, p. 14).

Dessa forma, para que a água possa ser utilizada em uma clínica de hemodiálise, deve-se obedecer o padrão de potabilidade vigente (BRASIL, 2011), no qual observa-se referência às cianobactérias e cianotoxinas.

Basicamente, existem dois tratamentos para a água utilizada em clínicas de hemodiálise: Sistema de Deionização (DI) e Sistema de Osmose Reversa (OR). Nesse caso, as coletas devem ser realizadas nas torneiras antes (água da entrada da clínica) e depois (reservatório de água tratada) dos sistemas de tratamento de água da clínica, aproveitando o primeiro jato de água. A amostra é coletada diretamente no recipiente, na presença prévia do fixador ou fixada imediatamente após (o lugol é mais indicado). O coletor deve estar munido de todos os EPIs necessários (luvas, jaleco e máscara). É importante observar a relação da água coletada com a sua procedência (origem): trata-se de água de manancial de abastecimento público, poço ou outra fonte? Sendo de manancial, foi distribuída para clínica via carro pipa ou é fornecida pela concessionária responsável pelo abastecimento? Sendo de poço, é de propriedade da clínica ou de fonte externa? Informações complementares são extremamente úteis na solução de problemas.



Fonte: SVS/MS.



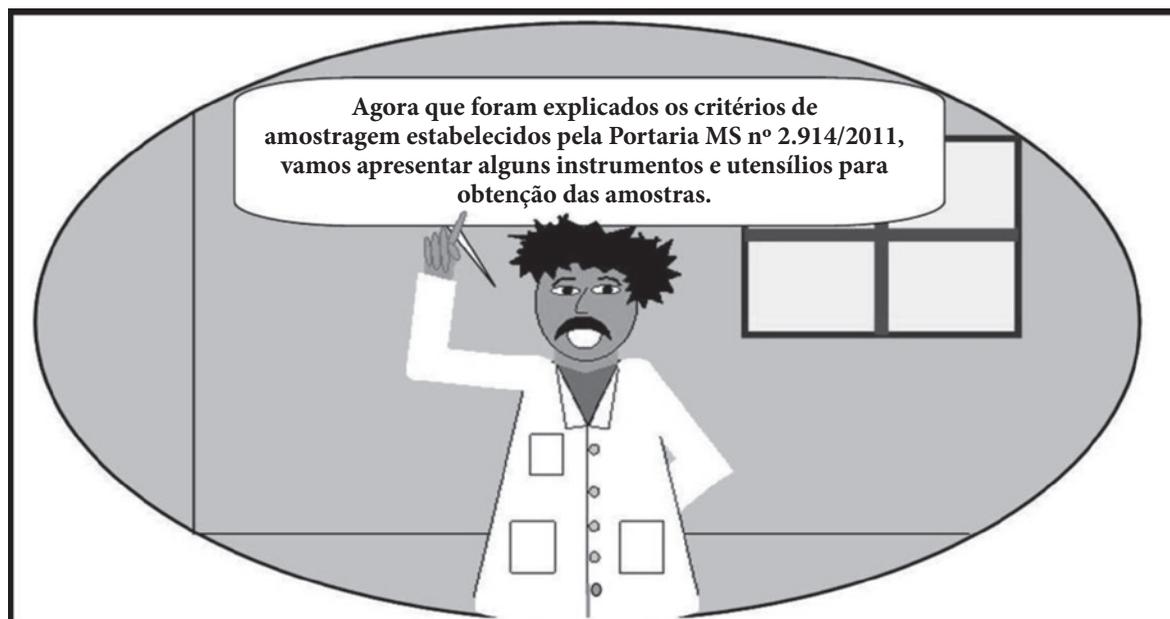
Fonte: SVS/MS.

1.2.6 Atender as recomendações da Portaria Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011

A questão das cianobactérias foi incorporada à legislação brasileira, pela primeira vez, em 29 de dezembro de 2000, a partir da homologação da Portaria Ministério da Saúde nº 1.469. Na ocasião, o Brasil tornava-se o primeiro país do mundo a incorporar tal questão às normas de potabilidade da água para consumo humano regidas em seu território. Atualmente, os critérios relacionados às cianobactérias encontram-se dispostos na Portaria Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que revogou a Portaria Ministério da Saúde nº 518, de 25 de março de 2004. Abaixo encontram-se descritos os respectivos artigos e parágrafos que tratam dos planos de amostragem relacionados à análise de cianobactérias:

§ 1º Para minimizar os riscos de contaminação da água para consumo humano com cianotoxinas, deve ser realizado o monitoramento de cianobactérias, buscando-se identificar os diferentes gêneros, no ponto de captação do manancial superficial, de acordo com a Tabela do Anexo XI a esta Portaria, considerando, para efeito de alteração da frequência de monitoramento, o resultado da última amostragem. (BRASIL, 2011, cap. 6, art. 40, §1).

§ 4º Quanto a densidade de cianobactérias exceder 20.000 células/mL, deve-se realizar a análise de cianotoxinas na água do manancial, no ponto de captação, com frequência semanal. (BRASIL, 2011, cap. 6, art. 40, §40).



Fonte: SVS/MS.

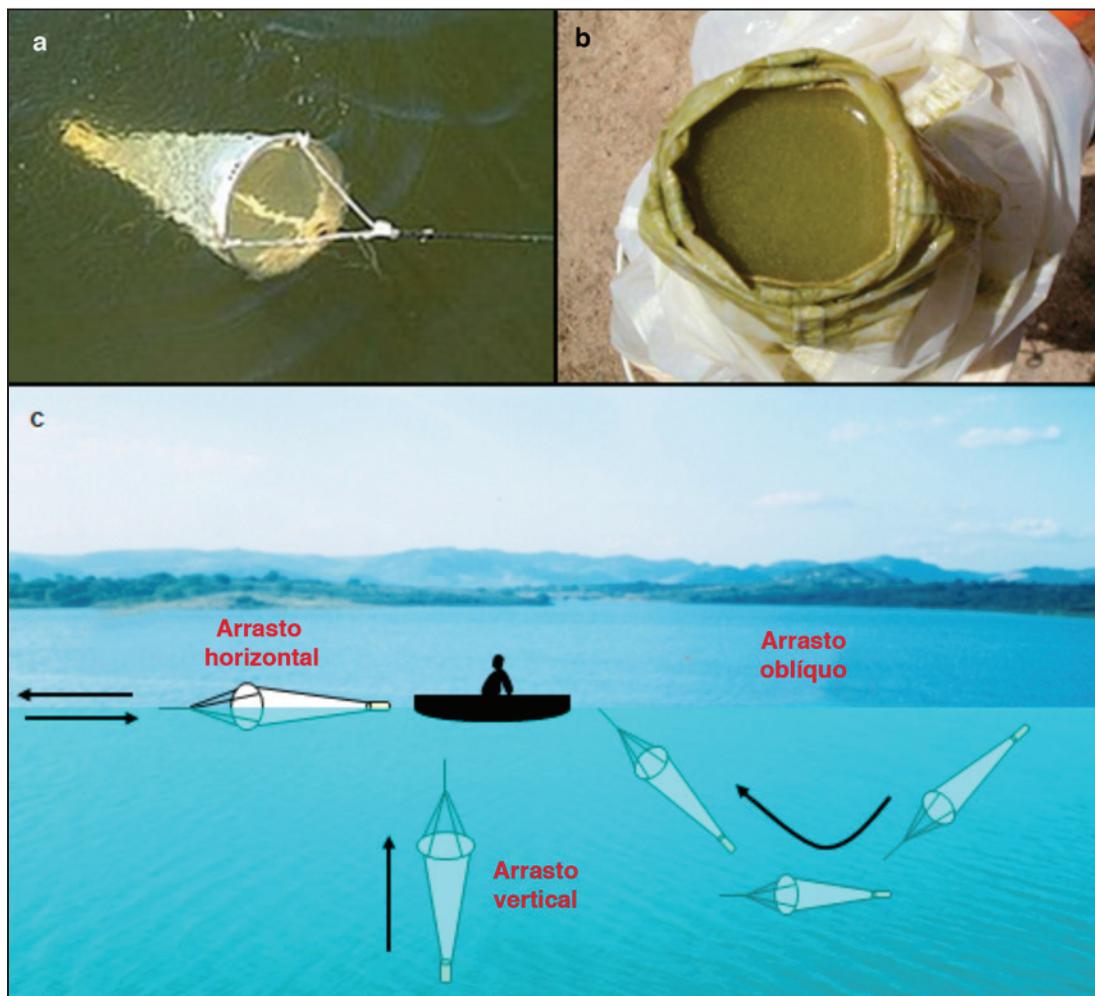
1.3 Instrumento e utensílios para amostragem

Toda coleta de material biológico necessita de equipamentos ou instrumentos adequados para amostragem, e com relação às cianobactérias e/ou fitoplâncton não é diferente. Nesse sentido, apresentaremos a seguir alguns destes equipamentos e utensílios auxiliares, vastamente utilizados em coletas de cianobactérias, os quais são adequados ao atendimento dos planos de amostragem contidos na Portaria MS n.º 2.914/2011.

1.3.1 Rede de plâncton

As redes de plâncton são mais conhecidas na sua forma cônica com abertura circular (Figura 2a), apesar de existirem outras formas, como a cilíndrica-cônica e com aberturas quadrada ou retangular. As redes apresentam um recipiente de coleta terminal (final da rede) que armazena todo o material filtrado (Figura 2b). Podem ser utilizadas para o estudo quantitativo de organismos zooplantônicos, bem como fitoplantônicos, desde que o volume filtrado seja determinado (conhecido). Para o fitoplâncton sua utilização está melhor adequada ao estudo qualitativo. Constituída por um tecido filtrante de nylon com diferentes aberturas de poro (calibração da malha), as redes selecionam e concentram os organismos de acordo com suas dimensões, sendo para o fitoplâncton recomendado malhas de 20 a 25 micrômetros. As amostras são obtidas através de arrastos que podem ocorrer horizontalmente, verticalmente ou de forma oblíqua (diferentes angulações) (Figura 2c). Antes da amostragem deve-se lavar a rede com a água do próprio ambiente de coleta.

Figura 2 – a – Rede de plâncton em arrasto horizontal; b – Detalhe do coletor da rede; c – Representação dos diferentes tipos de arrasto



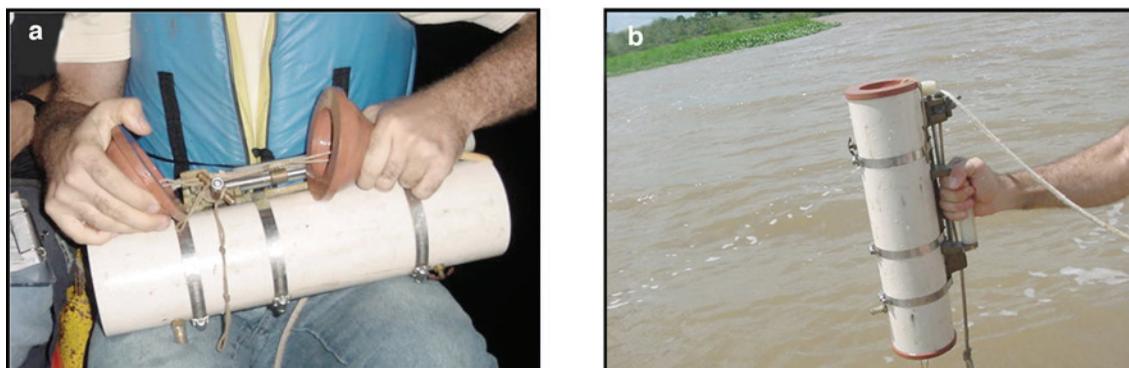
Fonte: SVS/MS.

1.3.2 Garrafa de coleta em profundidade

Existem algumas variedades de garrafas para coleta de água em profundidades, tais como as garrafas de Nansen, Nisken, Van Dorn, etc., ambas desenvolvidas com a mesma finalidade. A garrafa de Van Dorn é bastante utilizada em coletas de fitoplâncton, trata-se de um equipamento de fácil manuseio e eficiência na obtenção de amostras apropriadas para análise quantitativa. Constituída por um tubo cilíndrico, com volume determinado, a garrafa de Van Dorn apresenta um conjunto de tampas ligadas a um sistema mecânico de pressão. No momento do uso, o sistema deve ser ativado abrindo-se as tampas e encaixando-as a um suporte, em seguida a garrafa é submergida até a profundidade desejada através de uma corda graduada (Figura 3a e b). Posteriormente, um instrumento denominado “mensageiro” é lançado através da corda para desativar o sistema e coletar a água.

A garrafa é ideal para utilização em mananciais de abastecimento que apresentam pontos de captação em profundidades.

Figura 3 – a – Preparação da garrafa de Van Dorn; b – Recolhimento da garrafa após coleta

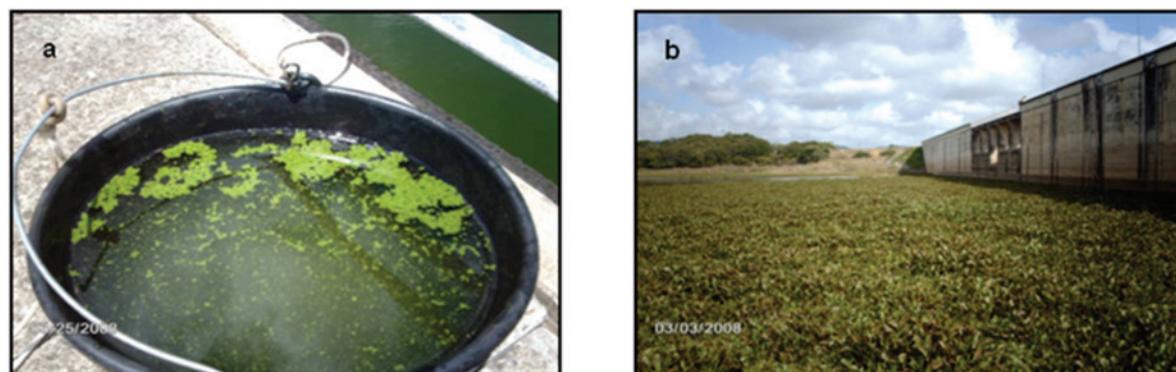


Fonte: SVS/MS.

1.3.3 Balde ou recipiente de abertura larga (boca larga)

Qualquer recipiente que apresente abertura larga pode ser utilizado para coleta de organismos fitoplanctônicos na superfície (lâmina da água até cerca de 25cm de profundidade) de um ambiente aquático. A utilização de um balde é uma boa opção para esse tipo de coleta, na qual a amostra obtida é indicada para análise quantitativa. Antes do procedimento deve-se lavar o balde ou recipiente coletor com a água do próprio ambiente e mergulhá-lo na superfície para obtenção da amostra. Pode-se utilizar uma corda amarrada a alça do balde para alcançar pontos de captação de água próximos aos paredões de reservatórios (Figura 4a e b).

Figura 4 – a – Detalhe do balde de coleta com amostra de floração; b – Vista parcial de paredão de reservatório onde há captação



Fonte: SVS/MS.

1.3.4 Funil de vidro ou metal

Um funil de vidro ou metal representa um importante instrumento auxiliar no momento de coleta, utilizado na ocasião de transposição da amostra do instrumento coletor para o recipiente de acondicionamento (Figura 5a e b). Antes da transferência da amostra também deve-se lavar o funil com a água do próprio ambiente, tal procedimento ajuda a evitar sobreposição da flora de diferentes pontos de coleta.

Figura 5 – a – Funil de metal; b – Demonstração do uso do funil



Fonte: SVS/MS.

1.4 Acondicionamento, preservação, transporte e armazenamento de amostras

Após a coleta com um dos instrumentos auxiliares anteriormente citados, as amostras obtidas devem ser acondicionadas em recipientes com tampa, sendo estes de vidro ou plástico (como os de polietileno) e em seguida, imediatamente fixados. Para melhor conservação das amostras, recipientes opacos (baixa transparência) ou “tipo âmbar” são recomendados. Os recipientes também podem ser envolvidos com algum material opaco, como papel madeira ou alumínio. O volume dos recipientes e, conseqüentemente, das amostras podem variar bastante dependendo do propósito da coleta (realização de análises em duplicata, triplicata, etc.). Para o desenvolvimento de análise de cianobactérias, volumes entre 150mL e 500mL são mais do que suficientes. Os recipientes com as amostras devem apresentar um mínimo de informações para sua identificação (Figura 6). Para amostras não fixadas deve-se deixar um espaço vazio de pelo menos 1/3 do recipiente.

Figura 6 – Ilustração de garrafa de acondicionamento de amostras com informações de identificação no rótulo



Fonte: SVS/MS.

1.4.1 Preservação de amostras

A preservação de organismos fitoplanctônicos pode ser realizada de inúmeras formas e a escolha da solução fixadora dependerá das vantagens e desvantagens inerentes ao seu uso. Veremos a seguir a viabilidade de algumas soluções, ressaltando que o uso do formol e do lugol são largamente aplicados e este último bastante recomendado.

Transeau – Constituída por seis partes de água, três de álcool etílico 95% e uma parte de formalina (6:3:1), a solução de Transeau é vantajosa com relação a preservação das estruturas fitoplanctônicas, sendo inclusive capaz de conservar flagelos. No entanto, devido à proporção de uso na razão de 1:1 (uma parte da solução para uma da amostra), sua utilização torna-se desvantajosa, uma vez que necessita de um volume elevado.

Formaldeído – O formol pode ser utilizado na amostra em sua forma comercial, de 37% ou 40%, ou ainda, a partir de uma solução estoque de 20%, considerando que a concentração final da amostra apresente-se entre 2% e 4%. A neutralização do formol é uma recomendação importante, nesse sentido deve-se usar tetraborato de sódio (bórax $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) – 50 mL por litro de formol - ou bicarbonato de sódio (NaHCO_3) - 50mL por litro de formol. O formaldeído tem como vantagem o longo período de estocagem da amostra e a manutenção da cor original das células. Por outro lado, provoca a perda de flagelos, o que não representa um grande problema para fixação das cianobactérias, no entanto é importante destacar que se trata de uma substância muito tóxica quando ingerida, inalada ou ainda, quando em contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea.

Glutaraldeído – Comercializado a 25% ou 50%, o Glutaraldeído é uma substância altamente tóxica, sendo esta a sua principal desvantagem. Apesar da baixa volatilidade, é irritante para as mucosas e requer muito cuidado no manuseio. Em seu favor ressalta-se a baixa alteração nas células e a possibilidade de uso em epifluorescência. As amostras devem apresentar concentração final de 1%.

Lugol – O preparo do lugol deve ser realizado da seguinte forma:

Dissolver 20g de iodeto de potássio em 200 mL de água destilada (misturar completamente); posteriormente, adicionar 10g do iodo sublimado (puro).

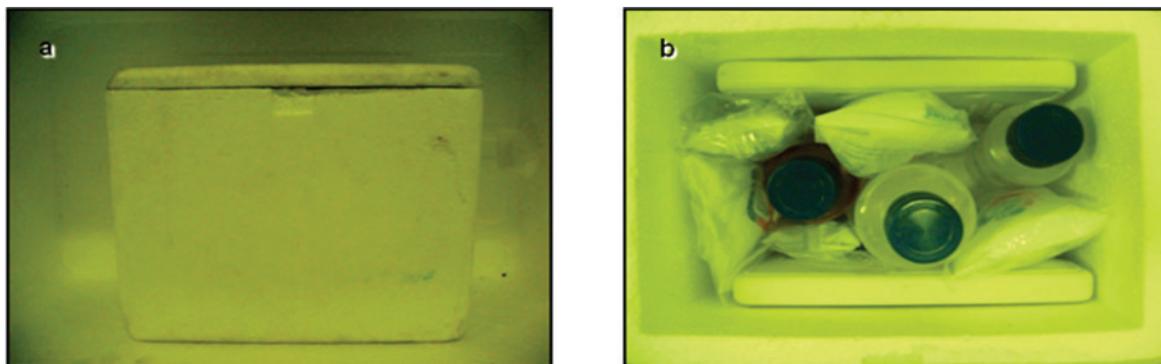
A solução não deve apresentar saturação de iodo, pois possibilita a formação de cristais que interferem na contagem das células. A supersaturação pode ser previamente testada, diluindo 1 mL da solução conservada em estoque, em 100 mL de água destilada. Se for percebido a formação de cristais de iodo, mais iodeto de potássio (aproximadamente 5 g) deve ser adicionado à solução inicial, repetindo-se o teste em seguida. Se não ocorrer formação de cristais, 20 mL de ácido acético glacial devem ser adicionados. A solução necessita de estocagem em recipientes escuros, de preferência do “tipo âmbar”, sendo melhor conservada sob refrigeração (4°C).

O Lugol tem como vantagem a manutenção de estruturas como flagelos e o aumento do peso específico das células algais, facilitando sua sedimentação, o que o torna ideal para análise quantitativa das cianobactérias. Desvantagens: se utilizado em excesso impregna nas células dificultando a distinção das estruturas; apresenta alta evaporação, necessitando sua reposição em amostras armazenadas por longos períodos e a exposição à luz altera a sua composição. A amostra fixada com lugol acético deve apresentar uma coloração semelhante a Whisky, correspondendo a cerca de 1% de sua concentração final. Recomenda-se a colocação gradativa (gota a gota) do lugol na amostra, observando-se cuidadosamente o ponto de coloração, para que a amostra não apresente excesso do fixador.

1.4.2 Transporte de amostras

Amostras fixadas podem ser transportadas em qualquer caixa ou suporte que lhes conservem ao abrigo da luz, ou até mesmo, em uma caixa térmica, sob refrigeração (Figura 7a e b). Para amostras não fixadas deve-se mantê-las resfriadas. Os recipientes devem estar bem fechados e quando utilizados recipientes de vidro, deve-se ter o cuidado para preencher os espaços entre os mesmos, a fim de evitar impactos e possível perda de amostra.

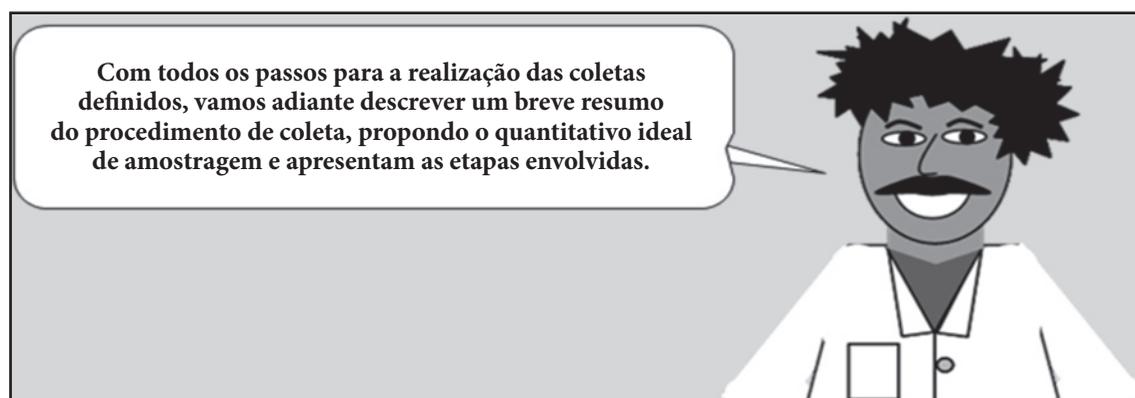
Figura 7 – a – Caixas térmicas para transporte das amostras; b – Detalhe das placas de gelo e acomodação das amostras



Fonte: SVS/MS.

1.4.3 Armazenamento de amostras

Antes ou após a análise de uma amostra, dependendo do tipo de fixador utilizado e dos cuidados durante o manuseio, pode-se armazená-la por longos períodos. No caso de amostras conservadas com formol ou lugol, desde que sejam mantidas em condições de baixa luminosidade (ou totalmente escuro), com periódica renovação dos fixadores (principalmente, no caso do lugol), podem ser preservadas durante anos. Amostras não fixadas mantidas sob refrigeração (4°C) podem conservar os organismos vivos durante 48 à 72h.



Fonte: SVS/MS.

1.5 Procedimento de coleta para análise de cianobactérias

Para cada ponto de coleta é necessário o recolhimento de três (03) amostras:

I – Amostra viva:

Utilizada para a observação de movimentos que algumas cianobactérias apresentam, os quais são importantes para definição da espécie (análise qualitativa). Pode ser coletada de forma direta com o auxílio de um recipiente de boca larga, com rede de plâncton ou com garrafa de profundidade. A amostra deve ser acondicionada em um recipiente de polietileno denso (150 - 300mL), sem a presença de fixador, preenchendo dois terços do volume e mantendo-a sob refrigeração desde o momento pós coleta até o início da análise.

II – Amostra fixada com formol:

Reservada para análise qualitativa, deve ser coletada diretamente com o auxílio de um recipiente de boca larga, garrafa de profundidade, ou ainda, concentrada com rede de plâncton. A amostra deve ser acondicionada em um recipiente de polietileno denso (150 - 300mL), preservada em formol, de forma que a concentração final corresponda a 2 - 4% do volume total.

III – Amostra fixada com lugol:

Destinada à análise quantitativa das cianobactérias, tal amostra deve ser coletada diretamente com o auxílio de um recipiente de boca larga na superfície e com garrafa para as profundidades (para mananciais de abastecimento, no ponto de captação). O acondicionamento deverá ser em recipiente de vidro ou plástico do “tipo âmbar” (150 - 300mL) e fixadas com lugol acético (1%). Também pode ser utilizado um recipiente de plástico denso, envolvido com papel alumínio ou madeira, desde que evite a incidência de luz. Quanto ao transporte, se mantido sob refrigeração, o lugol conserva melhor suas características de preservação.

1.6 Cuidados durante o procedimento de coleta

Algumas precauções devem ser tomadas durante o preparo do material de coleta e procedimento de amostragem, objetivando a integridade do técnico e da coleta.

1.6.1 Cuidados para o técnico

1 – Manipulação de fixadores

Alguns EPIs são imprescindíveis durante a manipulação das soluções fixadoras e devem ser utilizados pelo técnico desde o momento do preparo dos reagentes no laboratório até os procedimentos de coleta, sejam estes no campo, clínicas de hemodiálise, estações de tratamento da água etc., sendo tais equipamentos: capela de exaustão de gases (no momento do preparo das soluções), máscara, jaleco, sapatos fechados e calças de malha grossa (tipo jeans);

2 – Coletas de campo

Para as coletas de campo, como as realizadas em pontos de captação nos mananciais, muitas vezes o coletor se depara com ambientes favoráveis à presença de animais peçonhentos, onde o uso de EPIs, tais como calças de malha grossa e sapatos fechados tornam-se essenciais. Durante o uso de embarcações, deve-se tomar o cuidado em utilizar coletes salva vidas.

1.6.2 Cuidados para a coleta

O ponto de partida para uma coleta segura e de qualidade é a precaução. Nesse sentido alguns cuidados são necessários, a iniciar pela garantia das propriedades das soluções fixadoras. Além da utilização de reagentes de boa qualidade e procedência, o técnico deve testar com antecedência se estes não apresentam nenhum problema que possam comprometer a qualidade da amostra. Sendo assim, para o formol, após o preparo da solução, deve-se confirmar a neutralidade aferindo-se o pH e quanto ao lugol, não deve apresentar saturação de iodo, realizando-se o teste citado anteriormente (item 4.2). O prazo de validade das soluções deve ser respeitado.

Outros imprevistos podem ser evitados preparando-se para a coleta com antecedência. A elaboração de um *check list* no momento de organização do material e/ou equipamentos é de grande utilidade no sentido de evitar esquecimento ou excesso de componentes durante a realização das coletas (Tabela 1). O ideal é não exagerar na bagagem, no entanto alguns itens como recipientes de coleta, por exemplo, devem ser levados a mais.

Tabela 1 – Modelo de *check list* do material de coleta

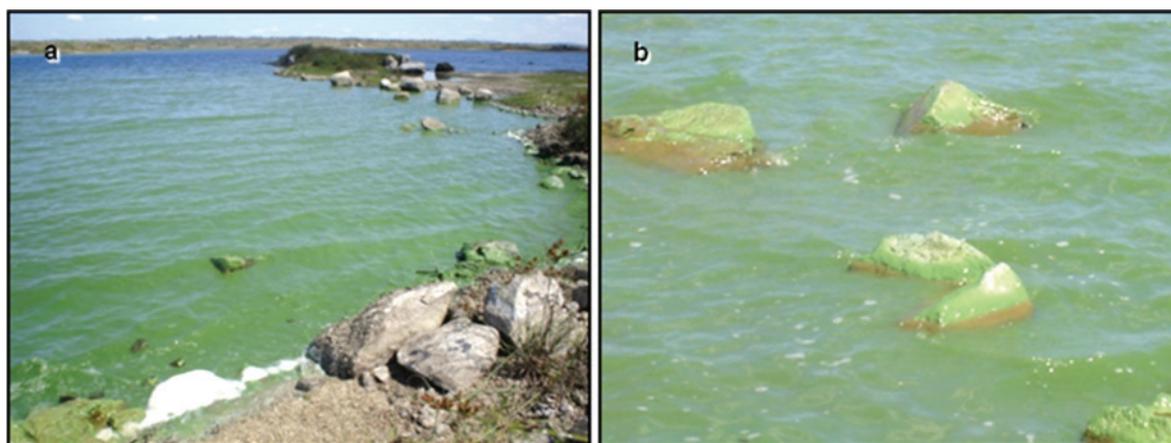
Itens	Material	Quantidade	Visto
1	Caixa para armazenar material de coleta	1	ok
2	Coletes salva-vidas	2	ok
3	Etiquetas e canetas para retroprojeter	*	ok
4	Corda (para o balde)	*	ok
5	Recipientes para qualitativo	2 (300mL)	ok
6	Recipientes para quantitativo	2 (300mL)	ok
7	Recipientes para amostra viva	2 (300mL)	ok
8	Gelox	6	ok
9	Papel alumínio	*	ok
10	Pisseta com água destilada	*	ok
11	Toalha de papel	*	ok
12	Luvas descartáveis	2 (pares)	ok
13	Funil	1	ok
14	Rede de plâncton	*	ok
15	Balde	*	ok
16	Garrafa para coleta	*	ok
17	Caixa térmica para as amostras (isopor)	*	ok
18	Planilha de registro da amostra	*	ok

Fonte: SVS/MS.

1.7 Reconhecimento de florações

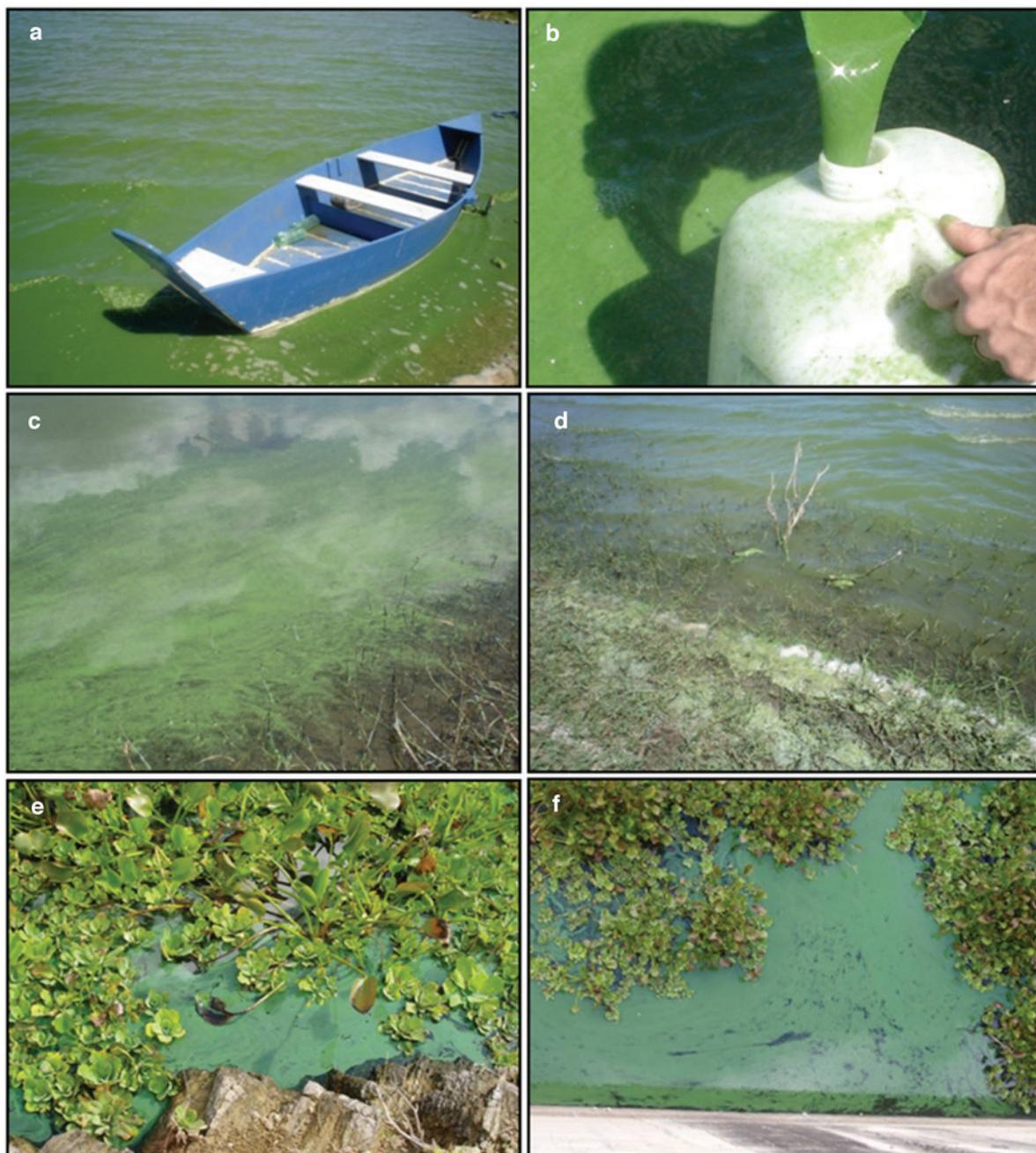
As florações de cianobactérias caracterizam-se pelo crescimento exagerado de uma ou mais espécies em curtos espaços de tempo. Ao contrário do que se imagina as florações não são exclusividade das cianobactérias, sendo um fato comum a outros grupos da comunidade fitoplanctônica. No entanto, não há dúvidas de que em ecossistemas aquáticos continentais o desenvolvimento acelerado de cianobactérias trazem maior inquietação. As florações podem permanecer no ambiente por um breve período ou mesmo perdurar ao longo de todo o ano, dependendo das condições favoráveis encontradas no ambiente. O enriquecimento nutricional do ecossistema aquático é o principal fator de contribuição para ocorrência de florações, estando as atividades humanas relacionadas diretamente à crescente eutrofização desses sistemas. Embora tenha-se a certeza de que o fator mais agravante relacionado às florações diz respeito ao potencial tóxico intrínseco às cianobactérias, há ainda outras consequências danosas relevantes: déficit de oxigênio, degradação das características cênicas do ambiente, liberação de substâncias que produzem odor e sabor desagradáveis na água, quebra do equilíbrio do ecossistema, diminuição de espécies algais, etc. Neste sentido, algumas destas peculiaridades expressam sinais visíveis para o reconhecimento das florações (Figuras 8 e 9). O aspecto esverdeado da água formando muitas vezes massas espessas (escuma) desses organismos podem constituir claras evidências de florações. O odor e sabor característico de geosmina, substância química liberada por algumas espécies de cianobactérias e que proporciona o que popularmente se conhece “por cheiro ou gosto de terra”, também observado em peixes, configura-se como mais uma evidência de que a floração também pode ser de cianobactérias. É válido salientar que apesar desses indícios passíveis de observação, o diagnóstico de uma floração deve sempre ser acompanhado por uma análise laboratorial qualitativa e quantitativa, pois nem toda água verde é sinal de floração de cianobactérias, assim como nem toda água límpida é sinal de pureza.

Figura 8 – a e b – Vistas parciais de floração no reservatório de Carpina – PE, novembro de 2005



Fonte: SVS/MS.

Figura 9 – a, b – Vistas parciais de floração no reservatório de Carpina - PE, novembro de 2005; c, d – Vistas parciais de floração no reservatório de Mundaú – PE, novembro de 2005; e, f – Vistas parciais de floração no reservatório de Tapacurá - PE, março de 2008



Fonte: SVS/MS.

1.8 Roteiro resumido para amostragem

- 1) **Conhecer a finalidade da coleta** a ser executada, suas intenções e objetivos; entender o porquê da realização da coleta. Este item é muito importante na eventualidade de aplicação do bom senso;
- 2) Considerando que é um diagnóstico de alta complexidade, **entrar sempre em contato com o LACEN** para definirem as coletas, necessidade de aferição de parâmetros abióticos, quantitativo de amostras, dia e horário de entrega;
- 3) **Elaborar em conjunto com o LACEN um cronograma de monitoramento** dos ecossistemas;
- 4) **Conhecer todos os procedimentos para execução da coleta:** equipamento utilizado, condições de biossegurança (EPIs), recipientes para amostragem, quantitativo de amostras, preservação (fixadores), transporte, acondicionamento, identificação da amostra, etc.;
- 5) **Preparar listagem prévia** de todo o material que será utilizado durante as coletas;
- 6) Se possível, deixar a **ficha de coleta previamente preenchida**, faltando apenas às observações de campo;
- 7) Durante as coletas, **identificar corretamente os recipientes de amostragem**, com o cuidado de utilizar lápis apropriado para anotação dos dados;
- 8) No campo utilizar **rascunho para anotação** dos dados e ao final transcrevê-los para planilha definitiva;
- 9) Para coletas realizadas em mananciais de abastecimento, **ter percepção para observar dados relacionados ao ecossistema e ao tempo** durante as coletas, como: cor da água, presença de massas algais (floração), condições climáticas, condições da mata ciliar, presença de comunidades ribeirinhas, etc.;
- 10) Ao executar as coletas **proceder corretamente quanto ao acondicionamento e transporte das amostras**, ter cuidado com o tempo para entrega das amostras vivas (sem fixadores);

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 154, de 15 de junho de 2004**. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancadopaciente/documentos/rdcs/RDC%20N%C2%BA%20154-2004.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, 2006. Disponível em: <www.standardmethods.org>. Acesso em: 15 jan. 2013.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. São Paulo: RIMA, 2006. 502 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 25 jan. 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. 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. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 5 dez. 2012.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. Brasília: CNPq, 2006. 109p.

HÖTZEL, G.; CROOME, R. **Phytoplankton methods manual for australian freshwaters**. Canberra: Land & Waters Resources; Research & Development Corporation, 1999. 58 p.

LAWTON, L. et al. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, 1999. p. 334-361.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. 10. ed. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: SBFic., 2006.

SÃO PAULO (Estado). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Fitoplâncton de água doce: métodos qualitativo e quantitativo**. São Paulo: CETESB, 2005. 23 p.

2 Coleta, preservação e transporte das amostras de água para pesquisa de cianotoxinas



Fonte: SVS/MS.

2.1 Definição do local de coleta em mananciais

A definição do local da coleta será em função do objetivo da análise: quanto maior o reservatório, mais complicado será definir o local.

Caso o objetivo seja determinar se em um determinado reservatório há ocorrência de florações de cianobactérias e, portanto, uma possível produção de cianotoxinas, será necessário fazer a coleta em diferentes locais. Quanto maior o reservatório, maior será o número de locais de coleta. Reservatórios grandes podem ter áreas mais sujeitas a eutrofização, em razão do recebimento de efluentes ricos em nutrientes e, portanto, mais propícias ao aparecimento de florações. Por outro lado, no mesmo reservatório podem existir áreas mais protegidas, com uma menor disponibilidade de nutrientes na água, em que a probabilidade de ocorrência de florações seja mínima.

Em reservatórios pequenos, três pontos de coleta podem ser bastante representativos para se saber se há ocorrência de florações de cianobactérias naquele ambiente.

Independente do tamanho do reservatório, um local obrigatório para a realização de coletas situa-se na região próxima à parede da barragem (no caso de ambientes artificiais). Afinal, é para lá que todas as águas da bacia de drenagem fluem e esses locais acabam funcionando como uma espécie de indicador da qualidade da água de toda a bacia.

Se o objetivo da coleta for saber se há ocorrência de floração de cianobactérias produtoras de cianotoxinas na água que está sendo captada de um manancial e, que após tratamento, será distribuída para a população, o local de coleta deve ser na área onde é feita a captação de água (Figura 10).

Figura 10 – Paredão do reservatório de Tapacurá-PE, com indicação do ponto de captação



Fonte: SVS/MS.

2.2 Definição da profundidade de coleta em mananciais

Após a definição do local da coleta, resta agora definir o ponto de coleta, que deve ser visualizado verticalmente e não horizontalmente. Ou seja, em que profundidade a amostra de água será coletada.

Muitas espécies de cianobactérias formadoras de florações, em razão da presença de aerótopos, que são vesículas contendo gás resultante do metabolismo e que as permite flutuar, tendem a se concentrar na superfície, especialmente em dias em que a velocidade do vento é baixa. Por outro lado, algumas espécies podem formar extensas florações a vários metros de profundidade, longe da visão do coletor. Ademais, em dias de ventos mais intensos, as cianobactérias tendem a ter uma distribuição mais homogênea na coluna d'água, ou seja, a densidade (células por mL) na superfície não é muito diferente da densidade a 6 metros de profundidade.

Diante de tantas variáveis, em que profundidade coletar? Bem, vejamos as possibilidades e seus prós e contras:

- Coletar amostras de água em diferentes profundidades e misturá-las, criando uma amostra composta. A desvantagem desse procedimento é que se há uma maior densidade de cianobactérias em uma profundidade, esta pode ser diluída com a água em que há uma menor densidade de cianobactérias, o que dificultará a análise de cianotoxinas, já que também haverá uma diluição destas. Por outro lado trata-se de uma amostra mais representativa do ponto de coleta;
- Coletar apenas na profundidade em que está sendo feita a captação da água. Em alguns reservatórios a captação de água pode estar a mais de 20 metros de profundidade, onde, muito provavelmente a densidade de cianobactérias será muito baixa. Muitas companhias adotam este procedimento para evitar as florações, o que é correto. Entretanto, afim de se conhecer os riscos, ou seja, presença de cianotoxinas, deve-se coletar água também nas profundidades com maior densidade de cianobactérias, geralmente, próximas a superfície. Visto que, em razão da ação de ventos mais intensos, a massa de cianobactérias que está próxima a superfície, em questão de horas, pode ser levada a vários metros de profundidade;

Coletar amostras de água nas profundidades em que as densidades de cianobactérias sejam maiores. Este procedimento é o mais acertado, pois irá mostrar mais facilmente se trata-se de uma floração de cianobactérias produtoras de toxinas.

2.3 Como coletar amostras em mananciais

As florações de cianobactérias, em razão da espécie dominante e das condições ambientais, podem ocorrer de diferentes maneiras, o que irá influenciar na metodologia de coleta. Como estamos tratando da coleta de amostra para a análise de cianotoxinas, deve-se sempre objetivar a coleta de uma maior quantidade de biomassa e menor de água.

Florações de espécies que possuem uma extensa bainha de mucilagem, como *Anabaena* spp. e *Microcystis* spp., tendem formar grandes agregados de células, possíveis de ser vistos a olho nu, facilitando a coleta. Situações em que o vento é forte o suficiente para levar esses agregados para as margens e fraco para não rompê-los, há, muitas vezes, a formação de uma massa verde, bem compactada, capaz de ser coletada com a mão (usando luvas).

Já espécies como *Cylindrospermopsis raciborskii*, que não possuem uma bainha mucilaginosa proeminente, não formam aqueles agregados e a floração tem um aspecto mais homogêneo. Neste caso, é necessário empregar outros recursos para concentrar a biomassa.

2.3.1 Equipamento para coleta

Para a coleta de amostras em diferentes profundidades são utilizadas garrafas coletoras, cuja utilização está explicada no capítulo 1 – Coleta de cianobactérias – procedimentos de amostragem e reconhecimento de florações.

Caso a coleta seja feita subsuperficialmente, pode-se empregar um balde de 5 a 10 litros ou a coleta diretamente em frascos plásticos.

2.3.2 Florações com baixa densidade celular

Neste caso, são utilizados procedimentos para aumentar a densidade de células por unidade de volume, objetivando a obtenção de uma maior biomassa em uma menor quantidade de água.

1) Redes de plâncton

O capítulo 1 – *Coleta de cianobactérias – procedimentos de amostragem e reconhecimento de florações* explica todos os procedimentos para a utilização de redes de plâncton.

Para o cálculo da concentração de cianotoxinas, é necessário conhecer o volume de água que foi passado pela rede. Neste caso, o procedimento mais fácil é a coleta de água com o auxílio de um balde, onde se deve marcar previamente diferentes volumes (1, 2, 3, 4, 5 litros, etc.), e transferir a água diretamente para a rede. Este procedimento deve ser repetido até que o copo coletor tenha uma alta densidade de células, ou seja, deve ficar bem verde.

Contudo, o balde só pode ser utilizado para coletas subsuperficiais. Para a concentração de amostras de diferentes profundidades, será necessário coletá-las com uma garrafa de coleta em profundidade (consultar o capítulo 1 – *Coleta de cianobactérias – procedimentos de amostragem e reconhecimento de florações*).

A amostra concentrada no copo coletor da rede deve ser transferida para um frasco de vidro ou plástico e armazenada em temperatura ambiente, preferencialmente dentro de um isopor. Não é recomendado resfriá-las ou congelá-las, pois algumas cianobactérias são bastante sensíveis a baixa temperatura e, ao morrerem, liberam as toxinas para o meio aquoso. Esta recomendação deve ser seguida caso a amostra seja posteriormente filtrada (ver Filtração), todavia pode ser ignorada caso a amostra seja liofilizada (ver liofilização), ou seja, as amostras poderão ser resfriadas e congeladas.

2) Filtração

Amostras com baixa densidade também podem ser concentradas por filtração. As membranas mais utilizadas neste procedimento são as de fibra de vidro (borossilicato) com porosidade inferior a $1,2 \mu\text{m}$ e diâmetro mínimo de 47 mm. Para o processo de filtração será necessário um suporte de filtração de tamanho apropriado ao tamanho da membrana filtrante e uma bomba de vácuo (Figura 11).

Figura 11 – Suporte de filtração para membranas de 47 mm de diâmetro conectado a uma bomba de vácuo



Fonte: SVS/MS.

2.4 Preparação das amostras

1) Filtração

Algumas vezes, em razão da baixa densidade de cianobactérias, é necessário coletar no mínimo 5 litros de água. Caso as amostras não possam ser filtradas no campo, a mesma deve ser enviada ao laboratório em temperatura ambiente, ou seja, mantida em caixa de isopor. Não é recomendado resfriá-las, pois algumas cianobactérias são bastante sensíveis a baixa temperatura, conforme descrito anteriormente.

A filtração deve ocorrer preferencialmente até 24 horas após a coleta. Uma desvantagem do processo de filtração é que caso haja cianotoxinas dissolvidas na água, estas serão perdidas durante este processo. Normalmente, a maior parcela das cianotoxinas são intracelulares, entretanto, em algumas condições, a concentração extracelular, ou seja, no meio aquoso, pode representar a principal parcela de cianotoxinas de uma floração.

Procedimento de filtração:

- Filtrar em sistema de filtração a vácuo todo o volume da amostra ou volume suficiente para saturar 8 membranas de borossilicato de 47 mm de diâmetro. Tomar o cuidado para que o vácuo não seja superior a 40 mm Hg, o que pode provocar a lise das células;
- Anotar o volume filtrado por membrana e o total;
- Retirar a membrana do suporte do sistema de filtração com auxílio de uma pinça, dobrá-la cuidadosamente ao meio e envolvê-la com papel absorvente para retirar o excesso de líquido;
- Transferir as membranas, dobradas a metade, para um béquer;
- Caso a extração de cianotoxinas não seja feita imediatamente (consultar a cartilha Cianotoxinas: conceitos básicos para análise), guardar os filtros a pelo menos -18°C;
- O material está pronto para as etapas de extração e análise;

Obs.: Existem bombas à vácuo manuais com as quais pode-se filtrar as amostras ainda no campo, o que facilita o transporte das amostras, neste caso, apenas das membranas.

2) Liofilização

No processo de liofilização, a água da amostra, que deve estar congelada, é retirada por sublimação, ou seja, passa do estado sólido (gelo) para o de vapor, o que garante uma maior preservação das cianotoxinas. Entretanto, é um processo bastante demorado, chegando a durar alguns dias. A liofilização é mais aconselhada em amostras com uma menor quantidade de água, ou seja, naquelas concentradas por rede de fitoplâncton ou em amostras de floração muito densas.

Além da preservação das cianotoxinas, uma outra vantagem da liofilização é que ele permite a quantificação das cianotoxinas intra e extracelulares (Figura 12).

Figura 12 – Sistema de liofilização composto por torre e câmara de liofilização acoplados à bomba de alto vácuo



Fonte: SVS/MS.

Procedimento de liofilização:

- Após coletar a amostra, a mesma deve ser congelada a no mínimo -18°C para posterior liofilização. Deve-se realizar os procedimentos descritos pelo fabricante do equipamento;
- Ao final do processo, restará apenas um material seco que deve ser guardado a pelo menos -18°C e estará pronto para as etapas de extração e análise. Como se trata de um material que facilmente se dispersa no ar, tomar cuidado para não inalá-lo (utilizar capela e/ou máscaras apropriadas), pois pode conter cianotoxinas.

2.5 Coleta: água tratada

De acordo com a Portaria MS nº 2.914/2011, sempre que a densidade de cianobactérias exceder 20.00 células/mL é exigida a análise de cianotoxinas na saída do tratamento, com frequência semanal.

Nesse sentido, deve-se coletar uma amostra de água de 10 mL, que poderá ser congelada até o momento da análise, e verificar a presença de cianotoxinas através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os procedimentos para análise por ELISA estão descritos no capítulo 4 – *Conceitos básicos para o estudo de cianotoxinas – princípios de identificação e quantificação*.

Conforme estabelecido pela Portaria MS nº 2.914/2011, quando detectada a presença de cianotoxinas na água tratada, na saída do tratamento, será obrigatória a comunicação imediata às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis.

Salienta-se que, de acordo com o Art. 40, § 5º, da referida norma, quando as concentrações de cianotoxinas no manancial forem menores que seus respectivos Valores Máximos Permitidos (VMP's) para água tratada, será dispensada a análise de cianotoxinas na saída das estações de tratamento.

2.6 Preparação das amostras para análise por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os *kits* para análise de cianotoxinas foram validados para água e, somente podem ser usados com esta matriz. A concentração de amostras de água por extração em fase sólida ou análise de tecidos de animais não é recomendada.

Como a grande vantagem do método ELISA é o seu baixo limite de detecção, e a desvantagem o seu custo, ele é mais apropriado para a análise da presença de cianotoxinas na água tratada, porém, somente após aquelas terem sido identificadas na água bruta do reservatório (ver capítulo 4 – *Conceitos básicos para o estudo de cianotoxinas – princípios de identificação e quantificação*).

A água tratada deve ser coletada e submetida ao aparelho de ultrassom para o rompimento de possíveis células de cianobactérias, que após a morte liberam as cianotoxinas para o meio aquoso. Na falta de aparelho de ultrassom, alternativamente, pode-se congelar e descongelar a amostra duas vezes. Alguns fabricantes também recomendam filtrar ou centrifugar a amostra antes da análise. O volume de água a ser coletado é muito pequeno, 10 mL é mais que suficiente, pois os *kits* trabalham com volumes de amostra entre 20 e 100 µL. Para desenvolvimento da análise deve-se seguir o protocolo do fabricante dos Kits, enfatizando que há diferenças entre os procedimentos disponibilizados.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 154, de 15 de junho de 2004**. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancadopaciente/documentos/rdcs/RDC%20N%C2%BA%20154-2004.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, 2006. Disponível em: <www.standardmethods.org>. Acesso em: 15 jan. 2013.

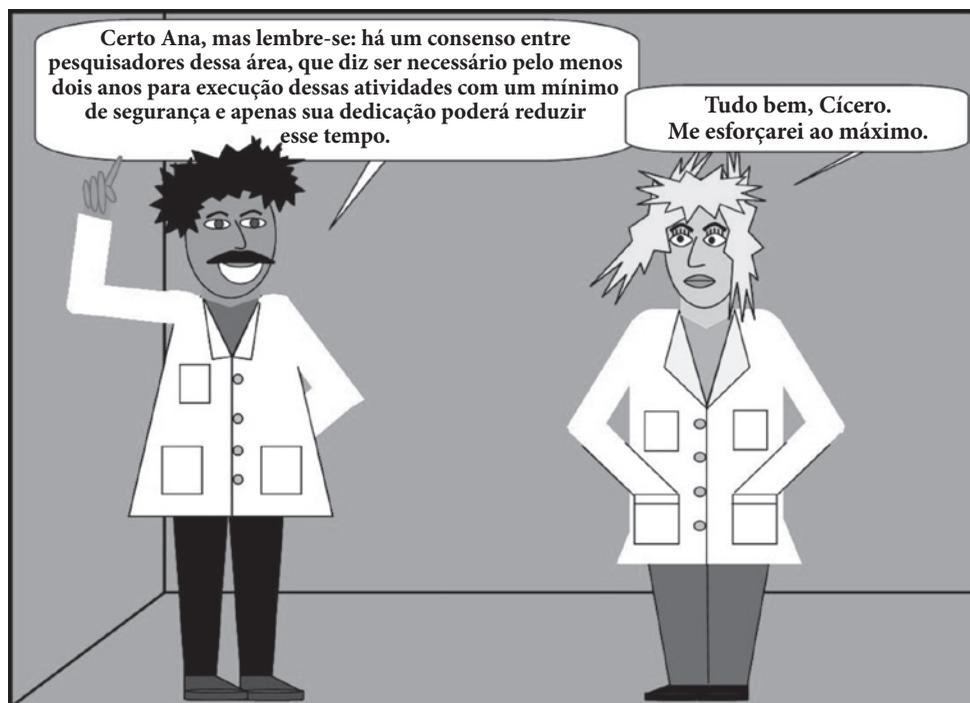
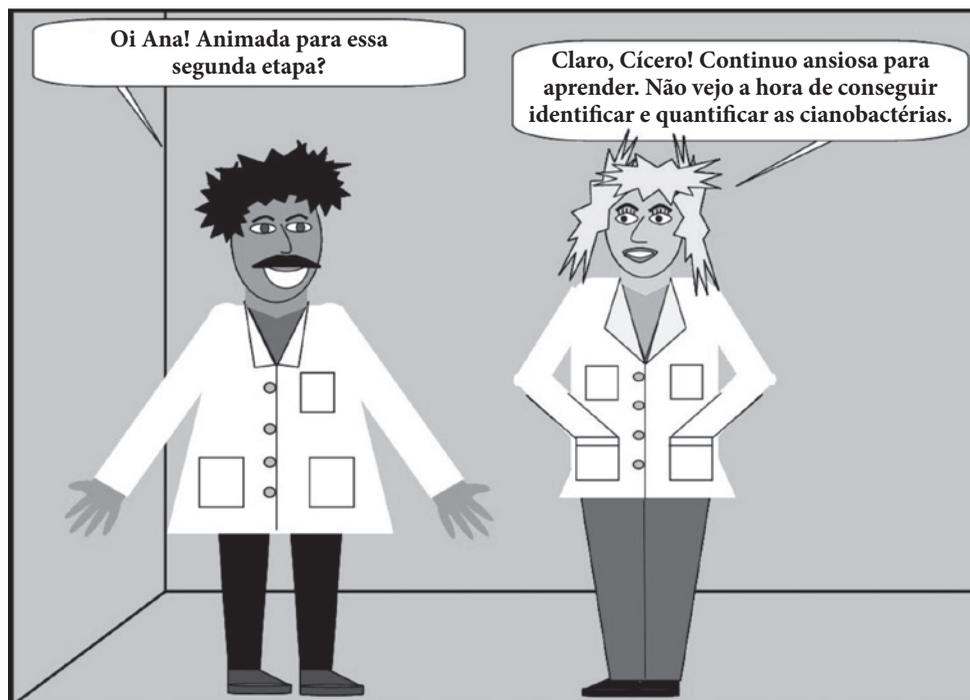
BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 25 jan. 2013.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. Brasília: CNPq, 2006. 109 p.

HÖTZEL, G.; CROOME, R. **Phytoplankton methods manual for australian freswaters**. Canberra: Land & Waters Resources; Research & Development Corporation, 1999. 58 p.

LAWTON, L. et al. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, 1999. p. 334-361.

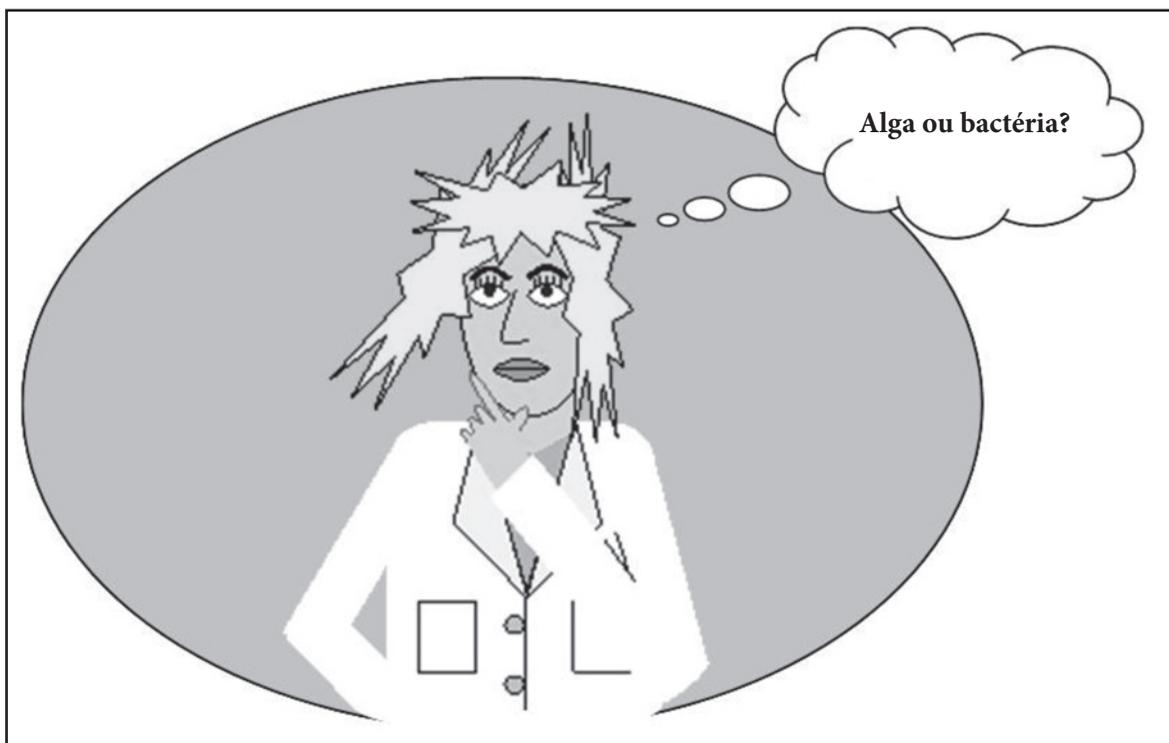
3 Conceitos básicos para o estudo de cianobactérias – princípios de identificação e quantificação



Fonte: SVS/MS.

3.1 Entendendo conflitos sobre cianobactérias

Cyanophyta, Cianofíceas, Cyanophyceae, algas azuis, entre outras denominações, as cianobactérias dentro de uma conceituação bastante generalizada são organismos geralmente microscópicos, uni ou pluricelulares, procariontes e fotossintetizantes (com “clorofila a”). Diante de suas características pode-se dizer que estruturalmente e fisiologicamente as cianobactérias assemelham-se as bactérias e, funcionalmente, estão mais próximas das plantas dos sistemas aquáticos. Devido a essas constatações tais organismos são sistematicamente classificados em dois importantes grupos:



Fonte: SVS/MS.

1 – Botânica: São considerados **vegetais procariontes**, pertencem à Divisão Cyanophyta de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica – ICBN.

- **Reino:** Metaphyta
- **Divisão:** Cyanophyta
- **Classe:** Cyanophyceae
- **Ordens:** Chroococcales; Oscillatoriales; Nostocales e Stigonematales.

2 – Bacteriologia: São considerados **bactérias fotossintetizantes**, com clorofila *a* e produção de O₂, pertencentes à Divisão Cyanobacteria, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana – ICNB.

- **Reino:** Bacteria
- **Divisão:** Cyanobacteria
- **Classe:** Gloeobacteria; Chroobacteria; Hormogoneae
- **Ordens:** Gloeobacterales; Chroococcales; Pleurocapsales; Oscillatoriales; Nostocales e Stigonematales.

Importante

1. Uma vez sabendo deste conflito, adote os termos apropriados para cada sistema, a sua escolha, e mantenha a uniformidade da nomenclatura;
2. Quando o enfoque do trabalho é na área de saúde, existe uma tendência na adoção do sistema de classificação da Bacteriologia, não sendo esta uma orientação ou regra geral;
3. Uma forma dos autores harmonizarem tal questão em trabalhos científicos é utilizar o termo “algas e cianobactérias” ao destacarem informações sobre floras onde cianobactérias ocorram junto a outros grupos;
4. Alga é um termo que não expressa categoria taxonômica tendo sido utilizado para evidenciar genericamente os grupos como algas pardas, algas verdes, algas vermelhas, algas cianofíceas, diatomáceas, dentre outras.

3.1.1 Semelhanças e diferenças entre cianobactérias e bactérias

Semelhanças

1. São seres procariontes, ou seja, não possuem núcleo organizado;
2. Possuem parede celular constituída por substâncias quimicamente idênticas (glicopeptídeos, ác. murâmico, ác. aspártico, etc.);
3. Não apresentam cloroplastos;
4. Habilidade na fixação de nitrogênio atmosférico.

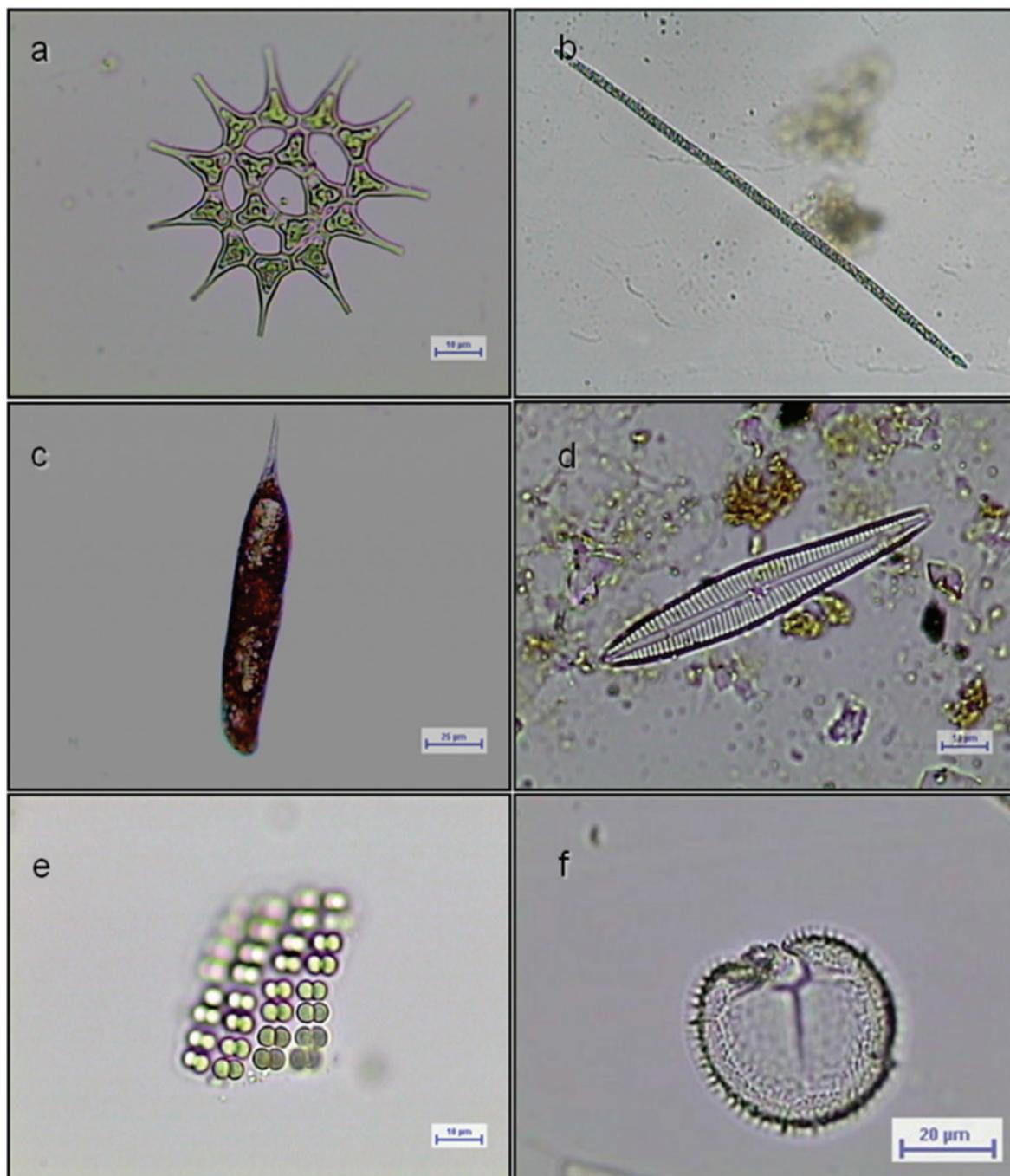
Diferenças

1. As cianobactérias utilizam autotrofia como via de regra;
2. Não possuem flagelos;
3. Não se reproduzem sexuadamente;
4. Possuem maior complexidade morfológica;
5. As cianobactérias produzem O₂ na fotossíntese;
6. Apresentam fotossistemas I e II (ao contrário das bactérias fotossintéticas);
7. Apresentam diferentes pigmentos:
 - Cianobactérias - clorofila *a*
 - Bactérias - bacteriofila

3.2 Alguns grupos representantes da comunidade fitoplanctônica

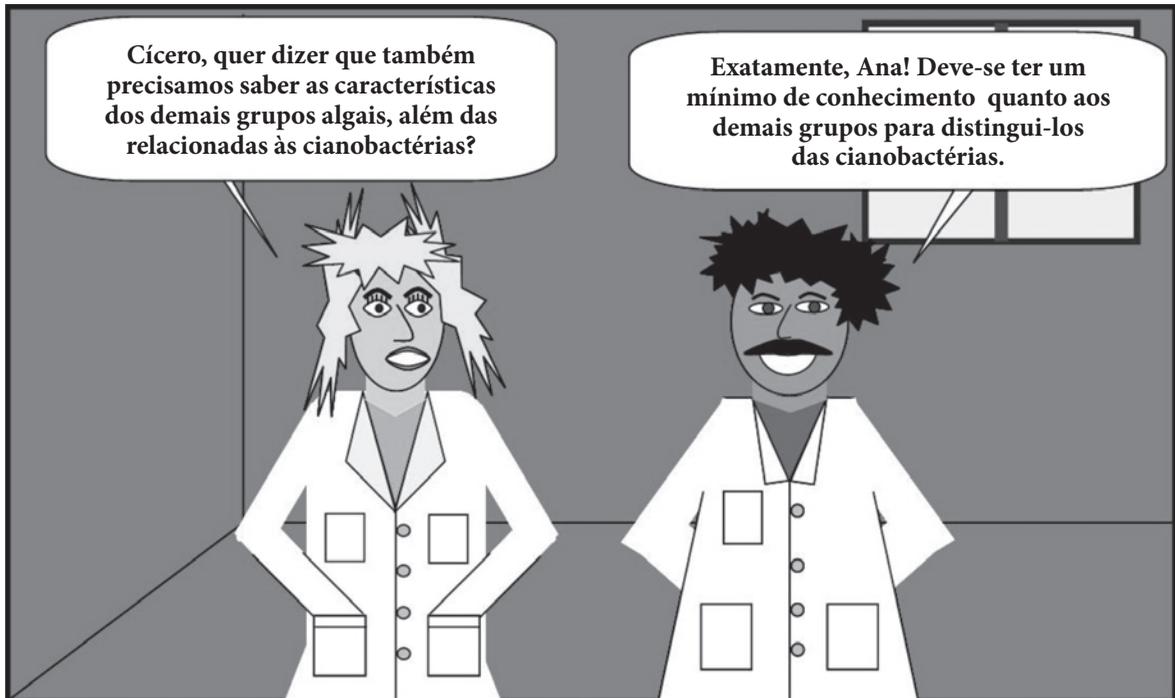
Para iniciar os estudos com cianobactérias, o pesquisador deve sempre levar em consideração que estes organismos serão encontrados na água juntamente com outros grupos fitoplanctônicos como, clorófitas, diatomáceas, euglenas, dinoflagelados, entre outros. Denominamos esse conjunto algal de “comunidade fitoplanctônica” (Figura 13). O termo fitoplâncton designa organismos fotossintetizantes que não possuem movimentos de locomoção capazes de superar as ondulações da água nos ambientes onde situam-se, ficando ali flutuando “ao sabor das ondas” .

Figura 13 – a – *Pediastrum simplex* Meyen; b – *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju; c – *Euglena* sp.; d – *Gomphonema gracile* Ehrenberg; e – *Merismopedia glauca* (Ehrenberg) Kützing; f – *Gymnodinium* sp



Fonte: SVS/MS.

O pesquisador deve ter conhecimento das principais características dos grupos que representam a comunidade fitoplanctônica, com o objetivo de saber distingui-los das cianobactérias.



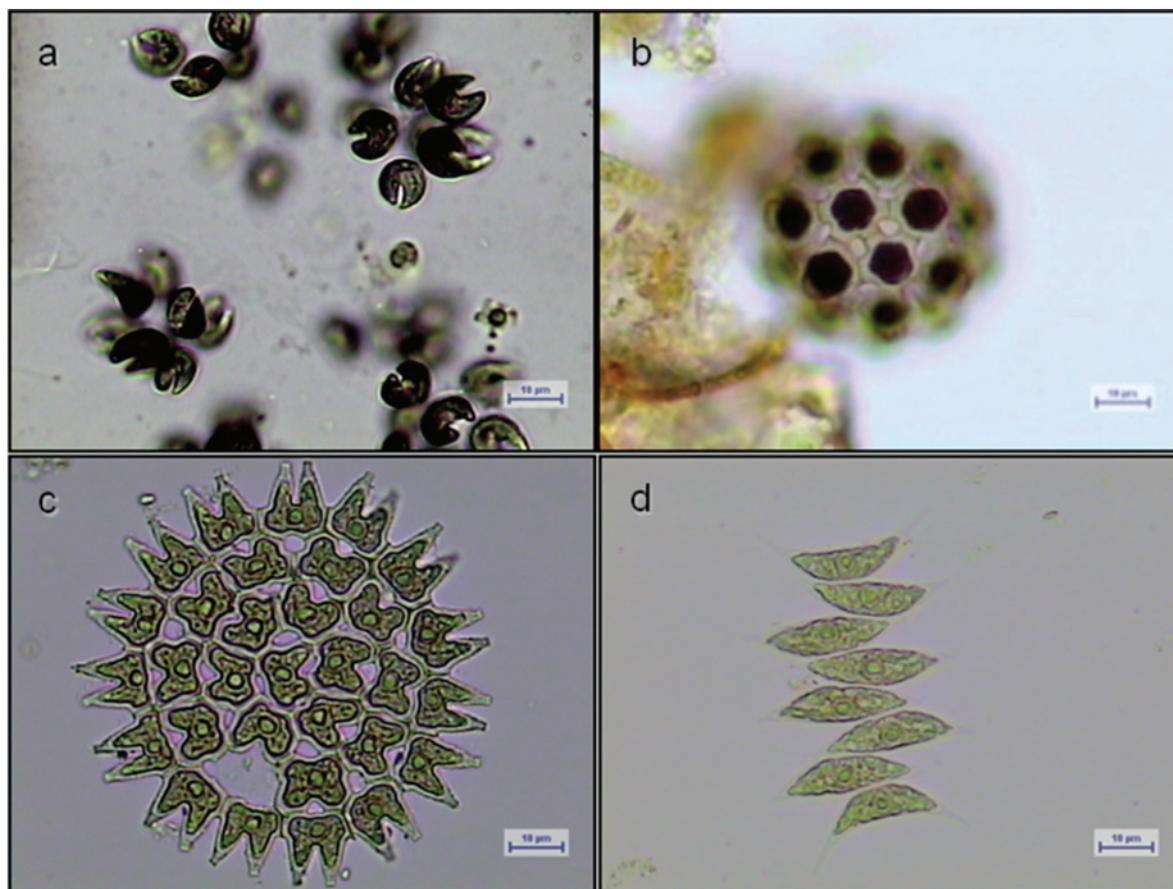
Fonte: SVS/MS.

Nesse sentido, apresentaremos a seguir algumas características básicas das classes fitoplanctônicas mais comuns observadas em ecossistemas aquáticos brasileiros, com imagens de alguns dos seus representantes e destacando as principais evidências observáveis ao microscópio que podem ajudar na definição dos táxons.

3.2.1 Chlorophyceae (algas verdes)

São organismos eucariontes, parede celular às vezes ausente, celulósica ou ainda glicoprotéica, cloroplastos com forma e número variados (Figura 14). Quanto à organização celular são unicelulares isolados ou coloniais, filamentosos ou parenquimatosos. A grande maioria dos representantes são dulciaquícolas, mas existem espécies marinhas e também terrestres (ambientes úmidos). Podem apresentar dimensões macroscópicas ou microscópicas. A ordem Chlorococcales é a mais representativa na comunidade fitoplanctônica. Possuem estruturas como estigma, pirenóides e alguns grupos podem ter flagelos. Apresentam algumas espécies que podem ser confundidas com cianobactérias quando não identificados corretamente.

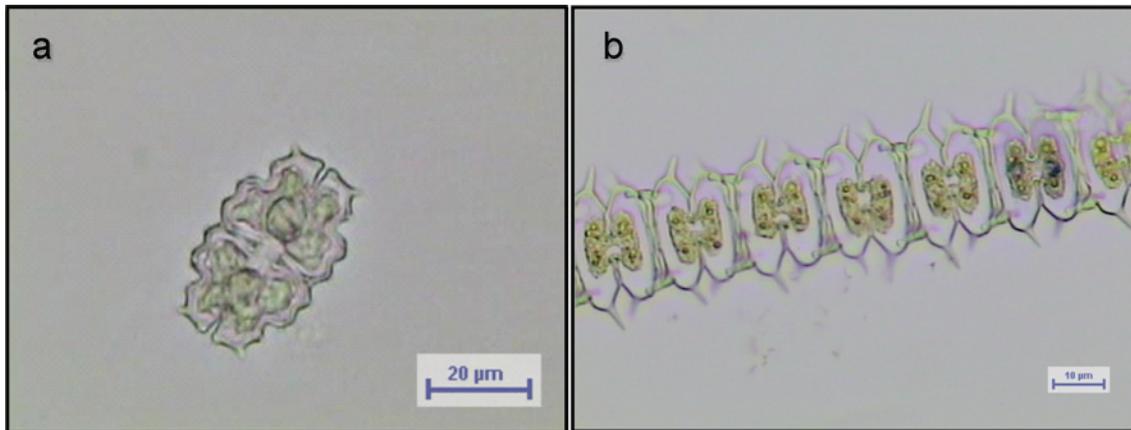
Figura 14 – a – *Kirchneriella lunaris* (Kirchner) K. Möbius; b – *Coelastrum cambricum* W. Archer; c – *Pediastrum duplex* Meyen; d – *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat



Fonte: SVS/MS.

3.2.2 Zygnematophyceae (desmídeas)

Organismos eucariontes, unicelulares ou coloniais, multicelulares filamentosos não ramificados, com total ausência de flagelos e células divididas em duas semicélulas, muitas vezes com estruturas de ornamentação (Figura 15).

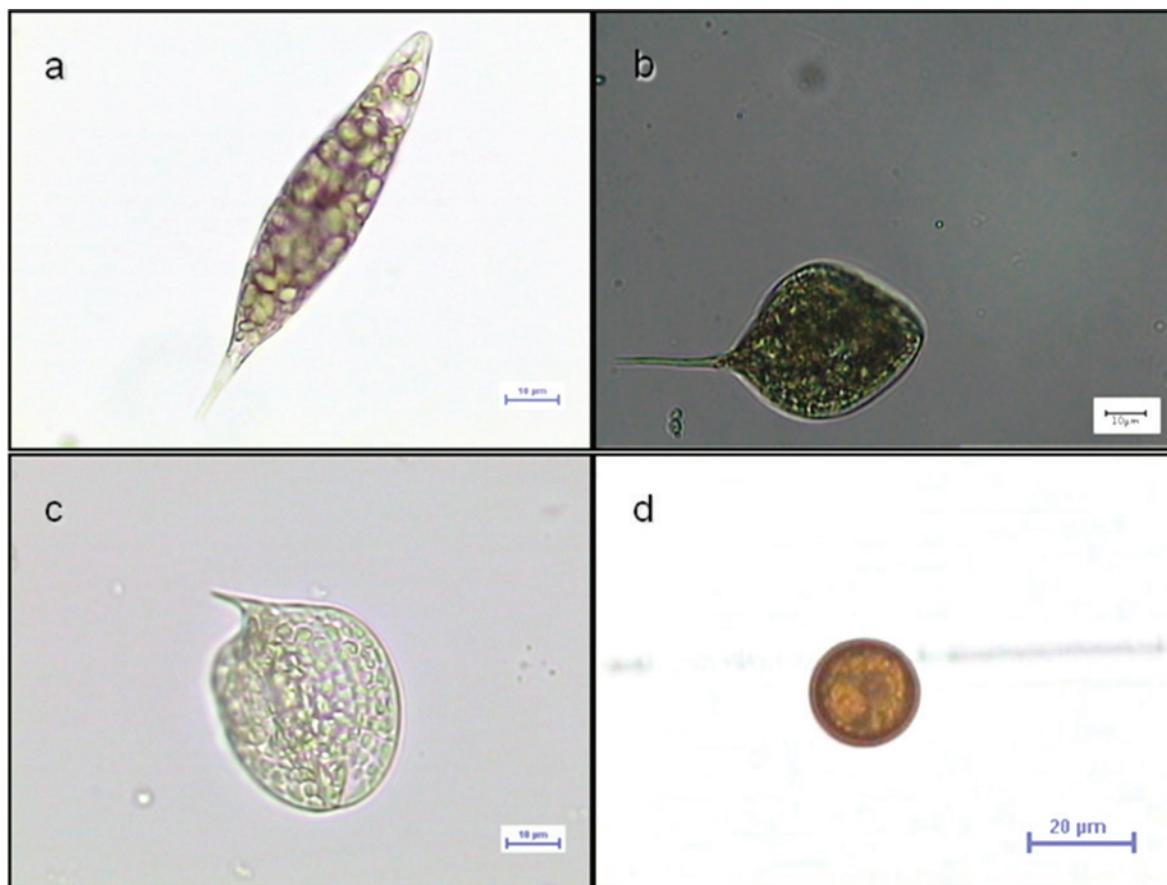
Figura 15 – a – *Euastrum bidentatum* Nägeli; b – *Onychonema laevis* Nordstedt

Fonte: SVS/MS.

3.2.3 Euglenophyceae (euglenas)

São organismos eucariontes, unicelulares (maioria), flagelados e raramente coloniais, com formas elípticas, globosas ou fusiformes, circulares em cortes ópticos transversais (Figura 16). Os flagelos, geralmente em número de dois, raramente quatro, estão inseridos em uma invaginação e frequentemente, apenas um flagelo emerge. Não possuem parede celular ou qualquer estrutura rígida envolvendo-as, com exceção dos gêneros *Trachelomonas* e *Strombomonas*, que apresentam o que se conhece por teca ou lórica, envoltório resistente constituído por mucilagem impregnada por sais minerais. As lóricas apresentam forma e ornamentação específica para cada táxon. A maioria é incolor e pequena parte possui cloroplastos. Apresentam externamente listras ou estrias helicoidais e no seu interior podem ser vistos muitos grânulos de polissacarídeos (paramilo). Apresentam também uma mancha ocelar (estigma) que faz parte do seu sistema fotossensível.

Figura 16 – a – *Euglena oxyuris* Schmarda; b – *Phacus longicauda* (Ehrenberg) Dujardin c – *Phacus curvicauda* Svirenko; d – *Trachelomonas volvocina* Ehrenberg

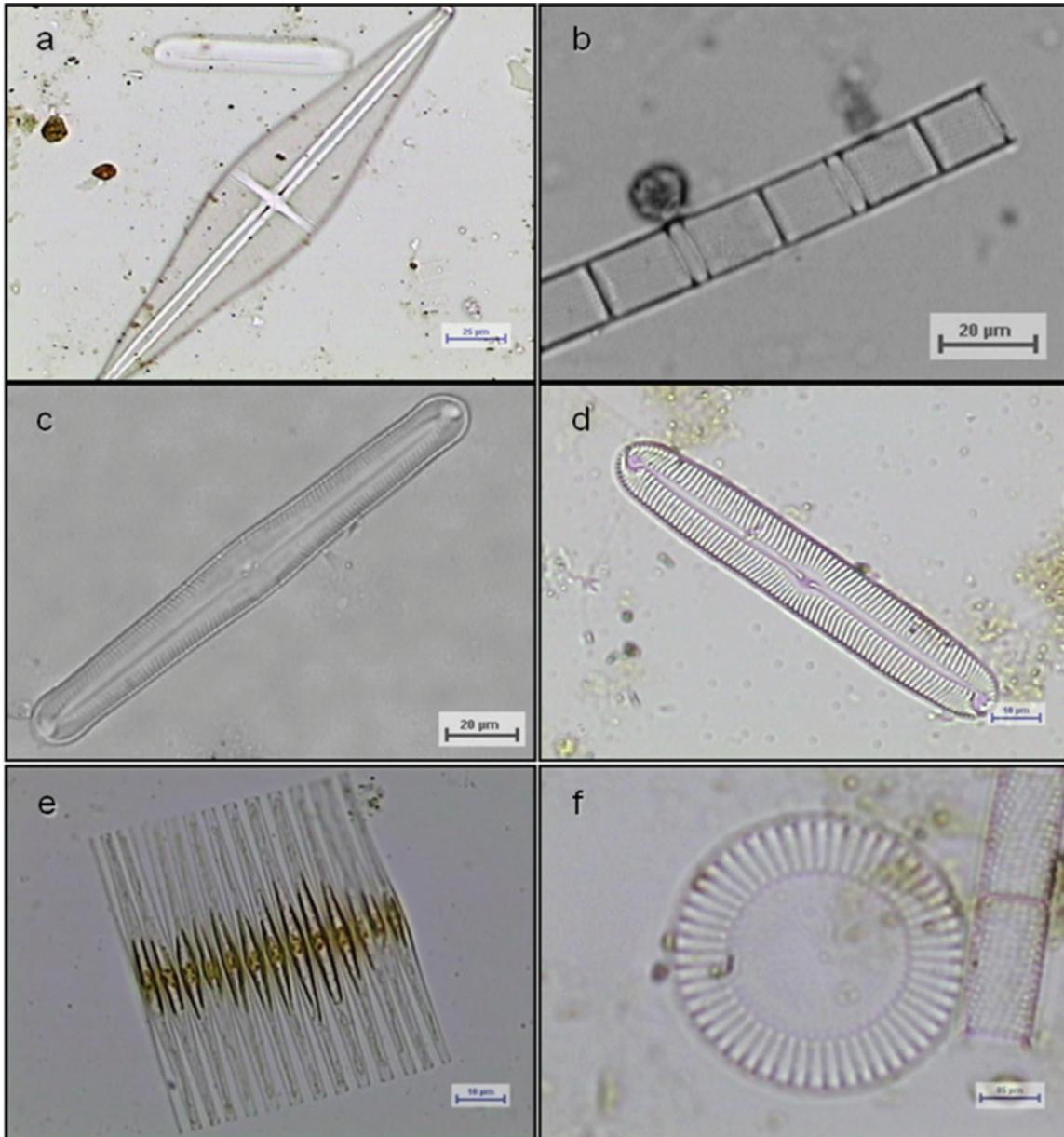


Fonte: SVS/MS.

3.2.4 Bacillariophyceae (diatomáceas)

São organismos unicelulares ou colônias, não possuem flagelos (exceto alguns gametas masculinos), cloroplasto geralmente de cor marrom dourada, apresentam parede celular (frústula) constituída por sílica, dividida em duas metades denominadas valvas ou tecas (Figura 17). As frústulas são ornamentadas por finas estrias, importantes na identificação dos táxons. Dividem-se basicamente em duas ordens: Pennales (simetria bilateral) e Centrales (simetria radial).

Figura 17 – a – *Stauroneis phoenicenteron* Ehrenberg; b – *Aulacoseira ambigua* (Grunow) Simonsen; c – *Pinnularia maior* (Kützing) Cleve; d – *Pinnularia viridis* (Nitzsch) Ehrenberg; e – *Fragilaria crotonensis* Kitton; f – *Cyclotella meneghiniana* Kützing

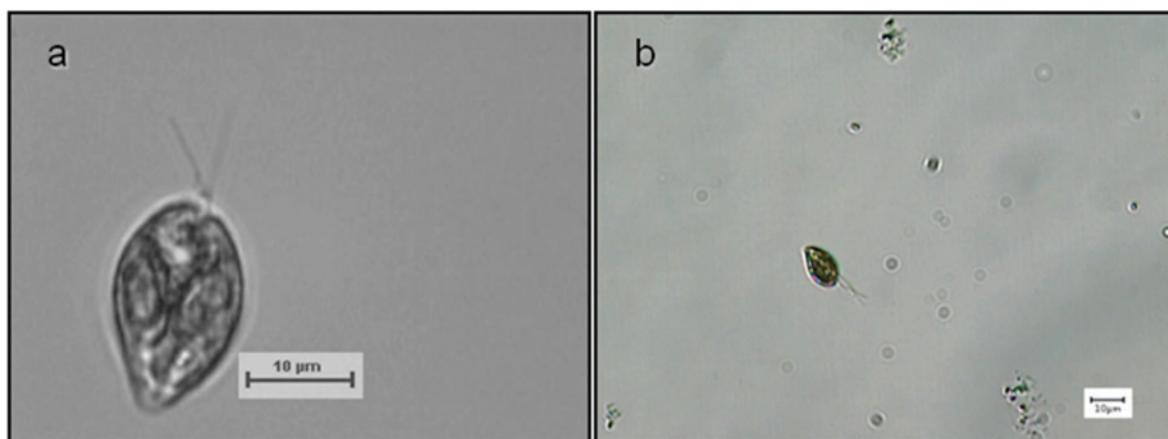


Fonte: SVS/MS.

3.2.5 Cryptophyceae

Organismos eucariontes, unicelulares flagelados, com dois flagelos desiguais, células assimétricas com face dorsal convexa e ventral achatada, cloroplasto com coloração distinta (azul, castanho, vermelha, verde etc.) (Figura 18).

Figura 18 – a – *Cryptomonas* sp.; b – *Cryptomonas ovata* Ehrenberg

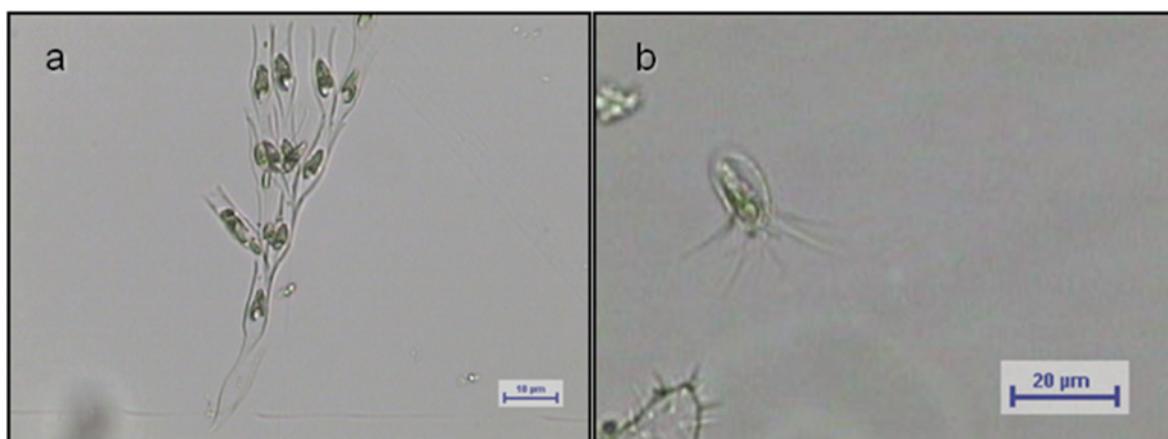


Fonte: SVS/MS.

3.2.6 Chrysophyceae

São organismos eucariontes unicelulares (maioria) ou coloniais, flagelados ou não (dois flagelos desiguais), alguns representantes são filamentosos. Cloroplasto apresenta-se com cor verde dourado (Figura 19).

Figura 19 – a – *Dinobryon sertularia* Ehrenberg; b – *Mallomonas caudata* Ivanov



Fonte: SVS/MS.

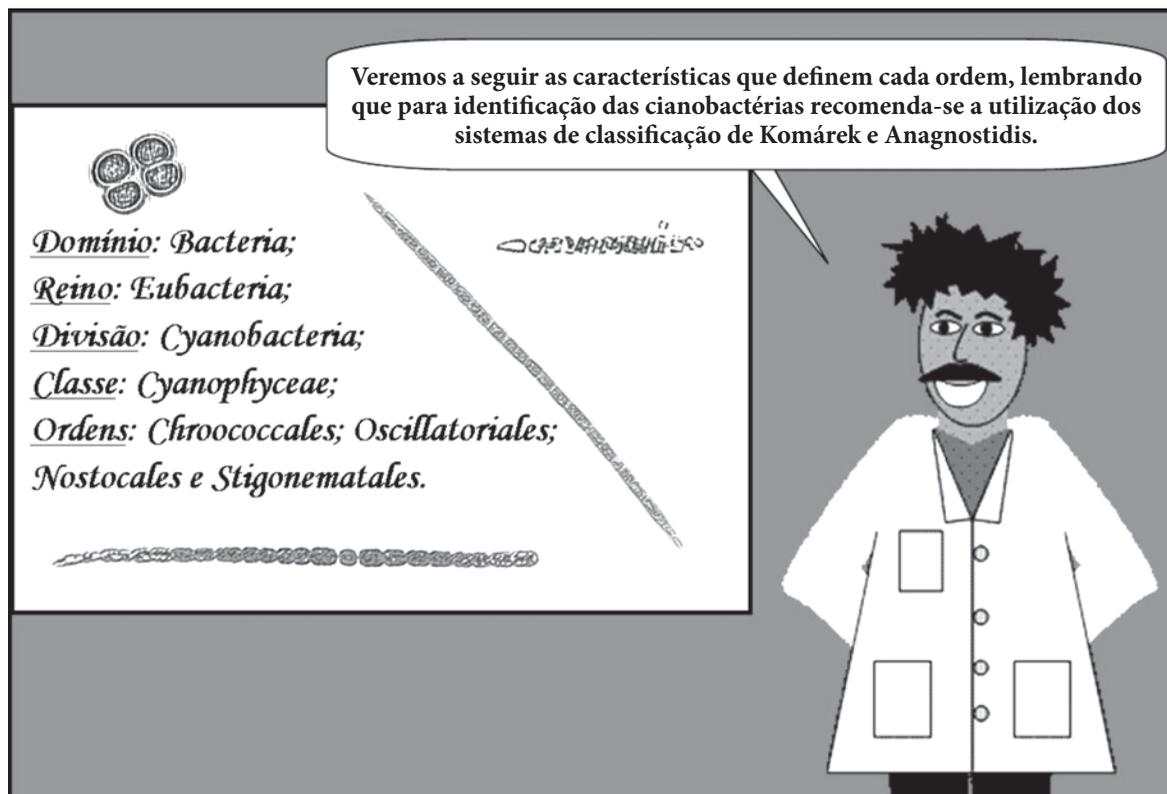
3.2.7 Dinophyceae (dinoflagelados)

São organismos eucariontes na maioria unicelulares, com algumas formas raras filamentosas, apresentam dois flagelos desiguais situados em diferentes regiões da célula (sulcos equatorial e longitudinal). Apresentam placas celulósicas, também denominadas “couraça” ou “armadura”, cujo número e disposição são importantes para definição do táxon.

3.3 Cianobactérias

Características gerais

- As cianobactérias não apresentam núcleo definido e organelas, o que as constituem como seres procariontes; não apresentam flagelos e não se reproduzem sexualmente. Fazem fotossíntese utilizando a “clorofila a” e produzem oxigênio no final do processo, de forma semelhante às plantas. Algumas ordens apresentam células especializadas (heterócito e acineto) diferente das vegetativas;
- Acredita-se que as cianobactérias tiveram origem há pelo menos 3,5 bilhões de anos e figuram-se entre os primeiros seres vivos que apareceram na Terra, sendo-lhes atribuída a responsabilidade de terem possibilitado o início da formação da atmosfera atual;
- São encontrados nos mais diversos habitats: marinho, água doce, águas termais (temperaturas acima de 60°C), neve, solo etc.;
- Morfologicamente, as cianobactérias podem ser unicelulares ou coloniais e filamentosas sem ou com ramificação (ramificação pode ser falsa ou verdadeira de acordo com o plano de divisão celular). Podem apresentar envoltório ou bainha de mucilagem.

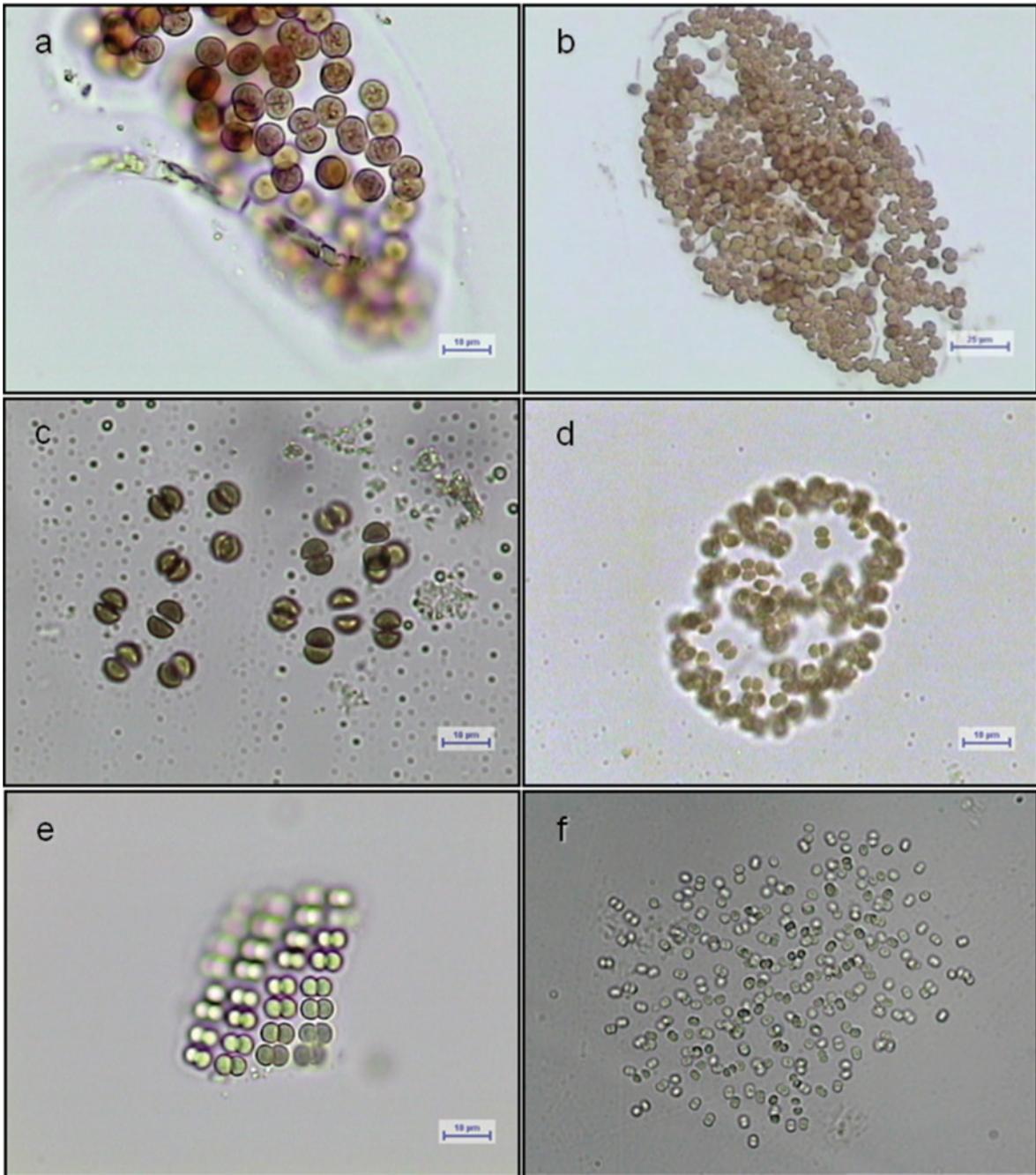


Fonte: SVS/MS.

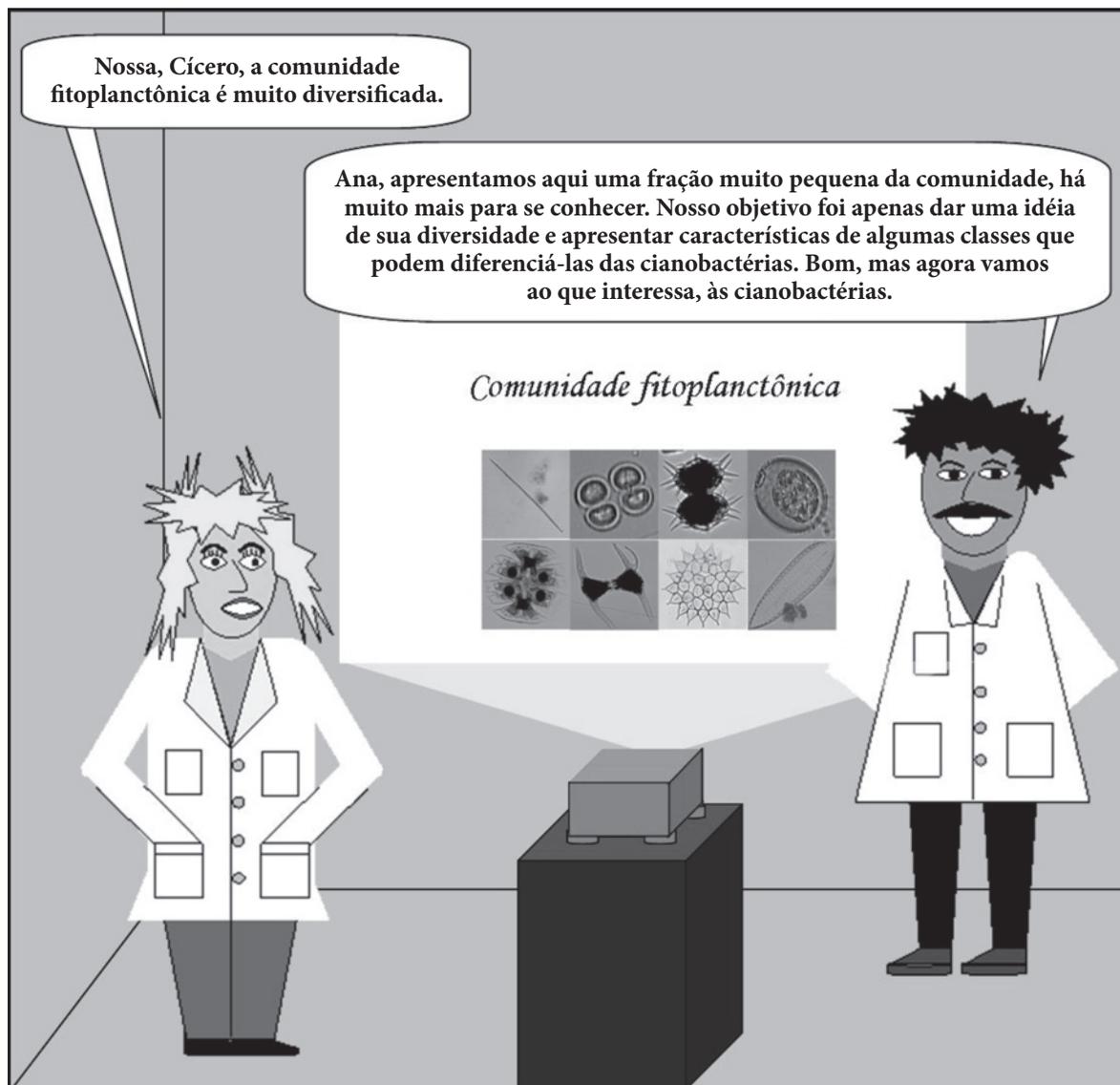
3.3.1 Chroococcales

- Unicelulares, coloniais ou pseudofilamentosas (filamentos não verdadeiros, sem conexão entre as células) (Figura 20);
- Células cocóides (cilíndricas, ovóides, esféricas);
- Divisão celular em 1 (um), 2 (dois) ou mais planos perpendiculares;
- Podem ser planctônicas, bentônicas, terrestres ou sub-aerofíticas;
- As células (individualmente) ou um grupo de células (colônias) podem apresentar envoltório mucilaginoso ou sistemas de hastes mucilaginosas.

Figura 20 – a e b – *Microcystis wesenbergii*; c – *Chroococcus* sp.; d – *Coelomoron* cf. *tropicale*; e – *Merismopedia glauca*; f – *Aphanocapsa* sp.



Fonte: SVS/MS.

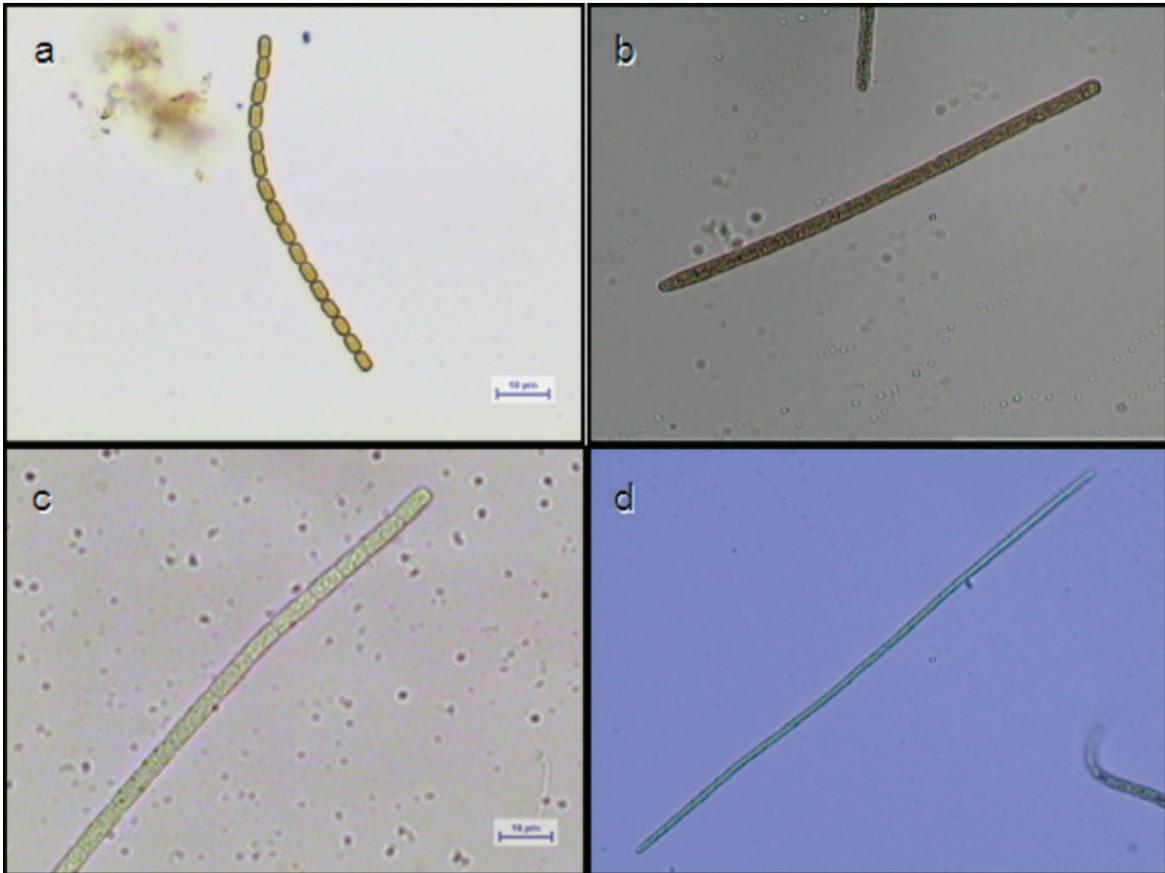


Fonte: SVS/MS.

3.3.2 Oscillatoriales

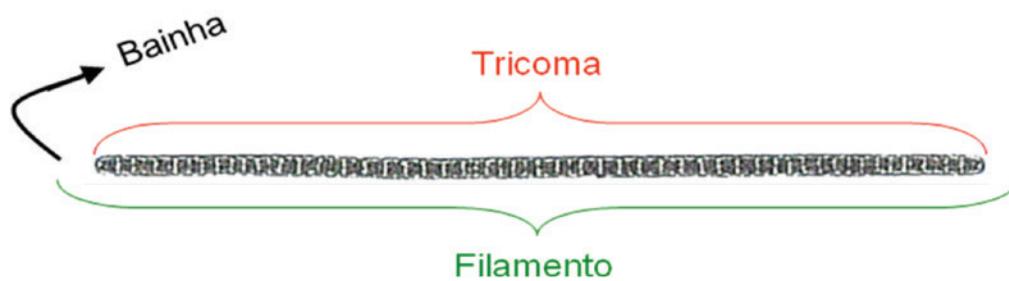
- Apresentam organização filamentosa (Figura 21);
- Não possuem células especializadas (heterócitos ou acinetos);
- As células são arranjadas em seqüências unisseriadas, denominada tricoma;
- Podem apresentar ou não bainha mucilaginosa;
- As células se dividem ao longo do eixo do tricoma em 1 (um) plano;
- A reprodução ocorre por fragmentação (quebra) do tricoma.

Figura 21 – a – *Pseudanabaena* sp.; b – *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek; c – *Pseudanabaena* sp.; d – *Geitlerinema amphibium* (C. Agardh) Anagnostidis



Fonte: SVS/MS.

Obs.: O filamento é constituído pelo conjunto tricoma e bainha de mucilagem (conforme esquema abaixo). Entre as células do filamento há troca de substâncias.



3.3.3 Nostocales

- Filamentos sem ramificações verdadeiras (podem ocorrer falsas ramificações);
- Tricomas unisseriados e divisão celular em 1 (um) plano (Figura 22);
- Apresentam células diferenciadas das vegetativas: **Heterócitos** - células responsáveis pela fixação do N₂; **Acinetos** - células de resistência, responsáveis pela reprodução do organismo após períodos em situação adversa;
- Algumas espécies apresentam bainha mucilaginosa.

Figura 22 – a – *Anabaenopsis* sp.; b – *Anabaena* sp.; c – *Aphanizomenon* sp.; d – *Raphidiopsis curvata* F.E. Fritsch & M.F. Rich; e – *Raphidiopsis mediterranea* Skuja; f – *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju



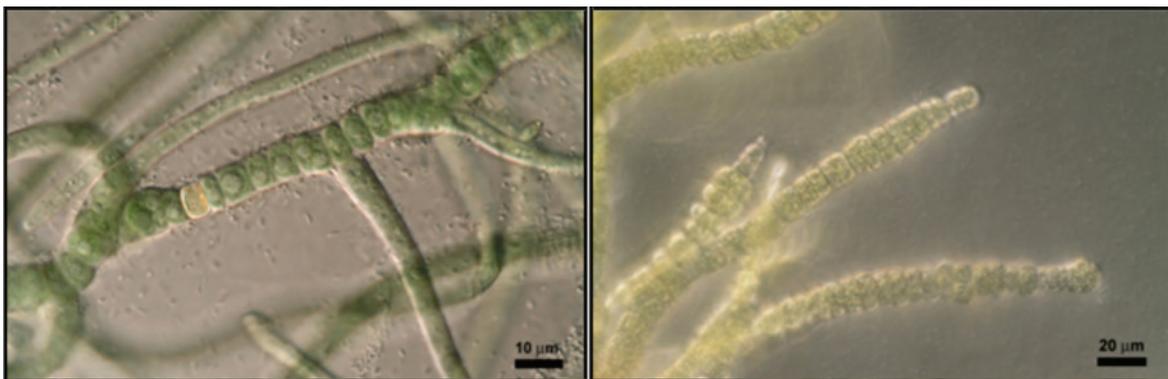
Fonte: SVS/MS.

3.3.4 Stigonematales

- Organismos filamentosos uni ou plurisseriados com ramificações verdadeiras e presença de bainha mucilaginosa (Figura 23);
- Divisão celular em mais de 1 (um) plano, irregular;
- Podem apresentar heterócitos e acinetos;
- Talo micro ou macroscópico;
- Seu habitat geralmente são locais preservados (indicadoras de ambientes oligotróficos) (bentônicos, sub-aerofíticos e terrestres).

Obs.: Não é comum encontrar Stigonematales no plâncton.

Figura 23 – a – *Fischerella* cf. *maior* Gomont; b – *Fischerella* sp



Fonte: Disponível em: <<http://ccala.butbn.cas.cz/>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

3.4 Análise Qualitativa

A análise qualitativa consiste na identificação de espécies e baseia-se na observação das características morfológicas, acrescido da medição dos organismos e de algumas de suas estruturas. A seguir veremos os equipamentos, acessórios e substâncias, essenciais ou não, utilizados para a análise qualitativa de cianobactérias, assim como, algumas importantes características citológicas, morfológicas, estruturais e morfométricas para definição dos táxons:

a) Equipamentos e acessórios

- Microscópio óptico binocular;
- Centrífuga;
- Ocular de medição (acessório acoplado ao microscópio);
- Câmara clara (acessório acoplado ao microscópio);

- Câmara fotográfica (acessório acoplado ao microscópio);
- Sistema de epifluorescência (acessório acoplado ao microscópio);
- Caixas de lâminas e lamínulas;
- Pipetas Pasteur (não estéril).

Obs.: Os procedimentos que utilizam alguns destes equipamentos serão apresentados mais adiante (item 3.5)

b) Características taxonômicas

- Disposição celular (unicelulares, coloniais ou filamentos).

Organismos unicelulares ou coloniais

- » Formas e medidas celulares (comprimento, largura ou diâmetro); plano de divisão celular; arranjo celular (enfileiradas, agregadas, frouxas etc.); presença, forma, textura e arranjo da mucilagem; presença, forma e disposição de hastes mucilaginosas; conteúdo celular (granuloso, presença de aerótopos etc.); etc.

Organismos filamentosos

- » Forma e medidas celular (comprimento, largura ou diâmetro); forma, medida e arranjo (emaranhado, isolado, paralelos, etc.) dos tricomas e filamentos; presença de ramificações; ramificações verdadeiras ou falsas; presença de células especializadas (heterócito e acineto); presença, forma, textura e arranjo da mucilagem; conteúdo celular (granuloso, presença de aerótopos, etc.); tricomas com ápices iguais ou diferentes (iso ou heteropolares); septos evidentes ou não; etc.

c) Substâncias auxiliares da análise qualitativa

- Cloreto de zinco iodado (para visualização dos septos): preparar duas soluções separadamente e misturar uma gota de cada uma na lâmina, sobre uma gota da amostra, antes de sobrepor a lamínula (Fórmula: solução 1 – cloreto de zinco, 20g de $ZnCl_2$ + 85mL de água destilada. Dissolver a uma temperatura entre 50-60°C; solução 2 – iodeto de potássio, 3g de KI + 1,5g de I_2 + 60mL de água destilada);
- Tinta nanquim (para visualização da bainha mucilaginosa e flagelos);
- Azul de metileno (para visualização da bainha mucilaginosa).

Obs.: Existem outras substâncias auxiliares mais adequadas a outros grupos fitoplanctônicos.



Fonte: SVS/MS.

3.5 Laboratório de Análises de Cianobactérias

Um laboratório para análise qualitativa e quantitativa de cianobactérias deve apresentar a seguinte estrutura:

- A. Local para recepção e registro de amostras;
- B. Local para acondicionamento e processamento de amostras;
- C. Sala de análises microscópicas;
- D. Local para a emissão dos laudos.

A. Local para recepção e registro de amostras

Após a coleta de água (como especificado na cartilha de coleta de cianobactérias) a amostra deve ser adequadamente registrada na unidade de pesquisa, em formulário próprio, constando as seguintes especificações: nº da amostra, origem, procedência, data da coleta, ponto de coleta e responsável pela mesma.

B. Local para acondicionamento e processamento de amostras

E. Amostra viva

F. Destinada à análise qualitativa a amostra viva deve ser analisada o mais rápido possível em microscópio biológico, utilizando-se câmara de Sedgewick Rafter (Figura 24), base da cubeta de Utermöhl ($\pm 3\text{mL}$) (no microscópio invertido) (Figura 25) ou diretamente com o conjunto lâmina e lamínula (Figura 26).

Obs.:

- Os procedimentos com amostras vivas devem ser realizados até 12 horas após a coleta, evitando-se a perda significativa de organismos;
- O volume de sedimentação deve ser definido a partir da análise prévia do número de organismos apresentados na amostra durante o estudo qualitativo. Se muitos organismos forem visualizados (amostra aparentemente densa), deve-se escolher cubetas de volumes menores para sedimentação, já se forem observados poucos organismos, deve-se escolher volumes maiores.

Figura 24 – Câmara de Sedgwick Rafter



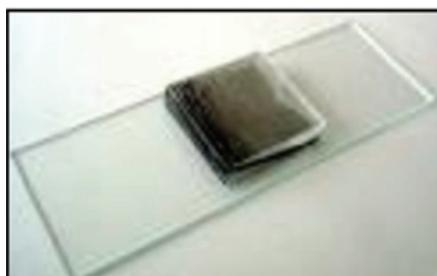
Fonte: SVS/MS.

Figura 25 – Câmara de Utermohl



Fonte: SVS/MS.

Figura 26 – Conjunto lâmina Laminula

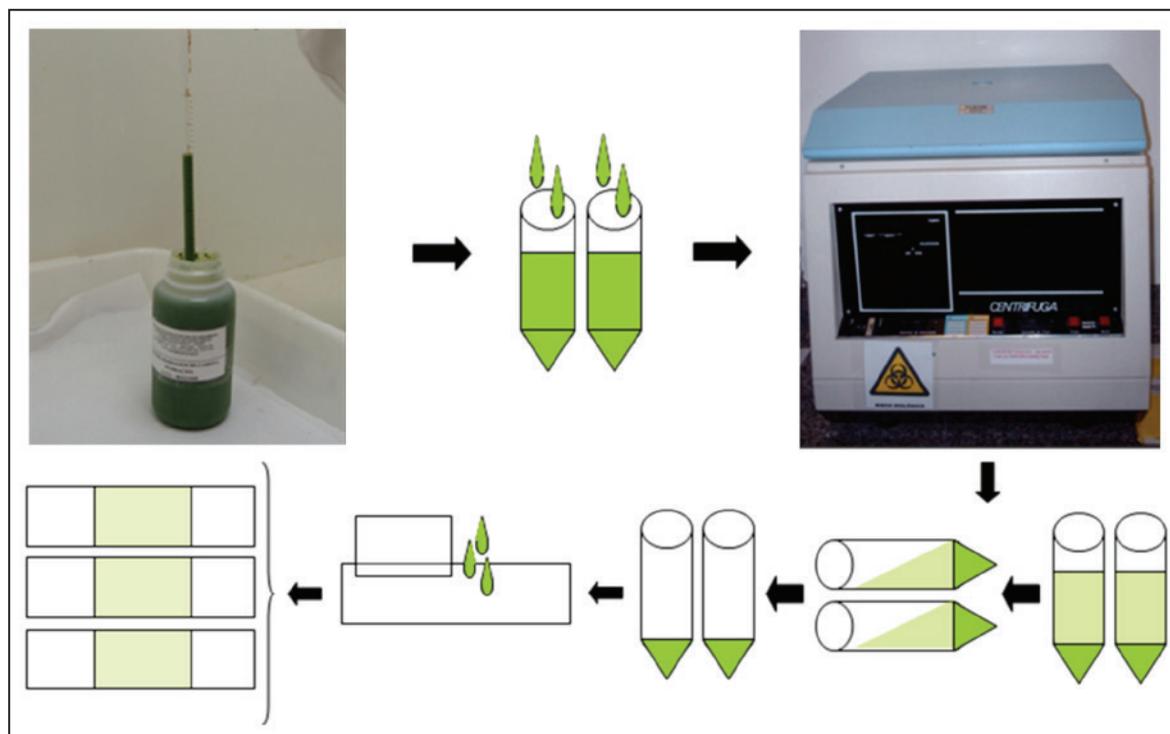


Fonte: SVS/MS.

Amostra fixada com formol

Transfira \pm 40mL da amostra fixada com formol para tubos cônicos de centrífuga, e centrifugue a 2500rpm durante 20 min. Após este procedimento, retire o sobrenadante e do sedimento, faça 3 lâminas para observação em microscópio biológico, visando a identificação dos táxons (Figura 27).

Figura 27 – Representação esquemática do procedimento da análise de amostras fixadas com formol

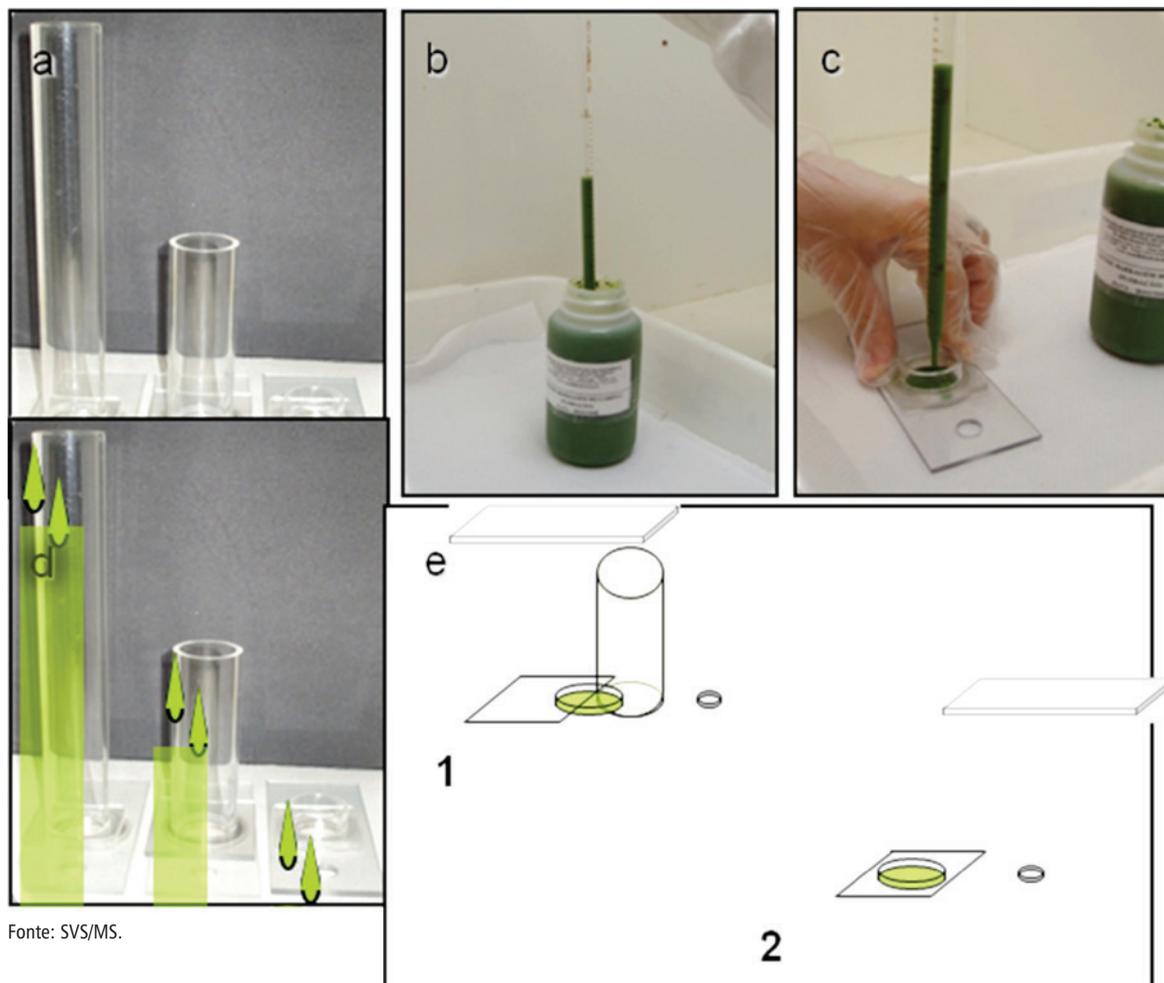


Fonte: SVS/MS.

Amostra fixada com lugol

Após a observação prévia da amostra, com a identificação dos táxons e definição do volume de sedimentação estabelecido, deve-se transferir alíquota representativa para uma câmara de Utermöhl (Figura 28), destinada à análise quantitativa de organismos fitoplanctônicos em microscópio invertido. Deve-se colocar a cubeta em superfície plana, livre de vibrações, próximo ao microscópio e despejar a alíquota definida, aguardando por período determinado em concordância com o volume de sedimentação. Alguns autores asseguram que a completa sedimentação dos organismos só ocorrerá por tempo igual em horas, a pelo menos três vezes a altura da câmara em centímetros. Outros recomendam de 2 – 4 horas por centímetro. Na prática, amostras em cubetas até 25mL permanecem sedimentando por 24h e acima deste volume, 48h. Após o tempo de sedimentação deve-se deslocar a torre para descarte do volume sobrenadante e conduzir a base para quantificação.

Figura 28 – Representação esquemática do procedimento de sedimentação de amostras



Fonte: SVS/MS.

Obs.: Se no momento da análise for observado número excessivo de organismos, que inviabilize a contagem, a amostra deve ser diluída e realizada nova sedimentação. Ao final do cálculo realiza-se a correção (Ex: Diluição da amostra em partes iguais (1:1), multiplicar o cálculo final de células por dois).

C. Sala de análises microscópicas

Um laboratório de análises qualitativa e quantitativa de cianobactérias deve ter um local reservado para os ensaios microscópicos, de preferência individualizado, onde constarão apenas os microscópios (biológico e invertido), seus acessórios e literatura especializada para consulta.

D. Local para a emissão dos laudos

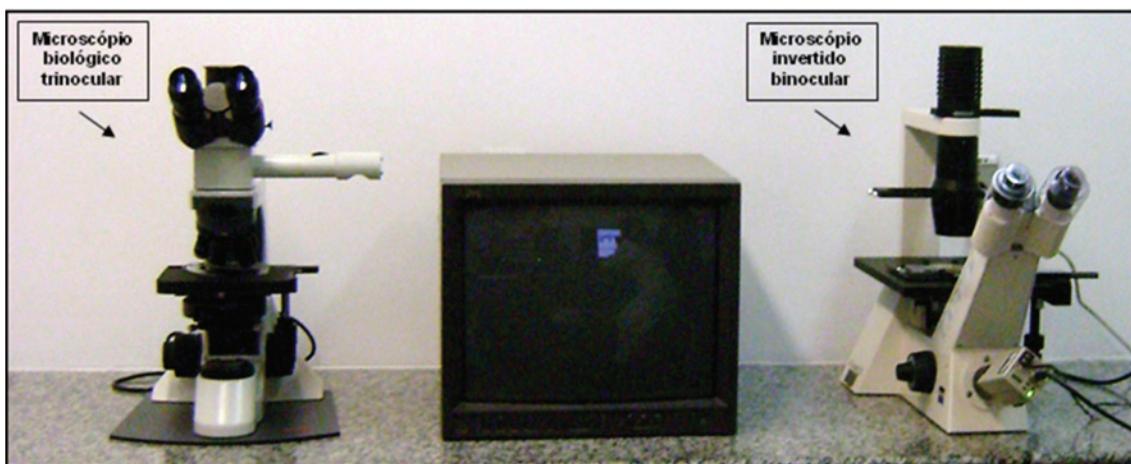
De forma semelhante, o laboratório deve apresentar uma sala individualizada para emissão de laudos, arquivamento de documentos e registros dos procedimentos.

3.5.1 Resumo dos equipamentos e acessórios do laboratório

- a) Microscópios biológico trinocular e invertido binocular para pesquisa qualitativa e quantitativa de cianobactérias, respectivamente (opcionais: sistema de captura de imagem, monitor, câmara clara, sistema de epifluorescência) (Figura 29);
- b) Conjunto de câmara de Utermöhl combinada de 5, 10, 25, 50 e 100mL*;
- c) Câmara de Sedgewick Rafter (1 e 2 mL);
- d) Caixa de lâminas p/ microscopia;
- e) Caixa de lamínulas p/ microscopia (standard);
- f) Pipeta Pasteur (não estéril), para transferência de amostras (0,5 - 3,0mL);
- g) Macropipetador;
- h) Pipetas Graduadas - Capacidade 10 e 20mL (1/10 - Divisões 0,1mL);
- i) Centrifuga e tubos acessórios.

* A base do conjunto da câmara de Utermöhl apresenta volume variado entre 1 – 3mL.

Figura 29 – Microscópio biológico trinocular com câmara clara, monitor acessório para microscopia (opcional) e microscópio invertido binocular

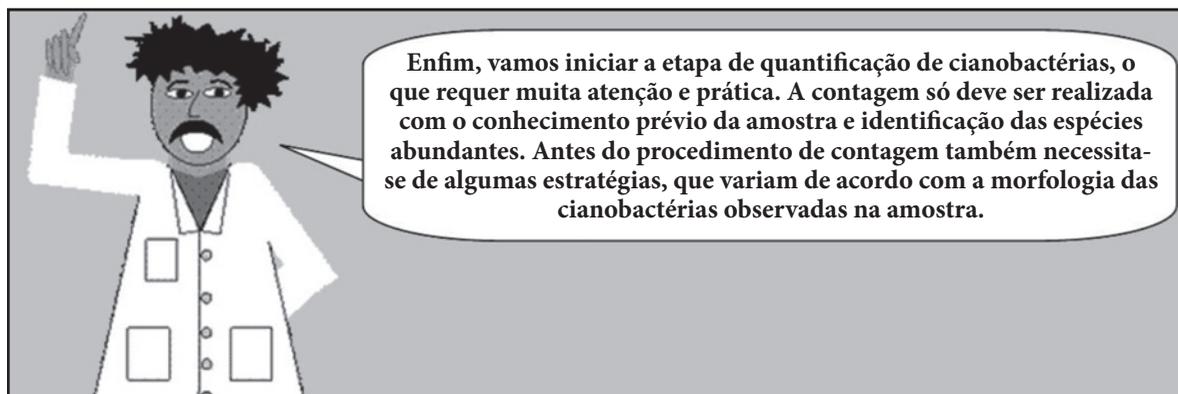


Fonte: SVS/MS.

3.5.2 Biossegurança no laboratório

Considerando que todas as atividades desenvolvidas em laboratório devem ser realizadas de forma cuidadosa e que o técnico analista de cianobactérias estará lidando com organismos potencialmente tóxicos, prejudiciais à saúde, além de manusear substâncias com certo grau de toxicidade, todos os procedimentos deverão estar em conformidade com o que determina a norma ISO nº 17025, do INMETRO, que dá orientações sobre como deve-se proceder análises laboratoriais (ex.: biossegurança, registros, competência dos técnicos e auxiliares, etc.).

Nesse sentido, como orientações básicas, durante o manuseio de amostras e substâncias, o analista deve fazer uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), como luvas de látex, jaleco, máscaras de proteção para gases tóxicos e sapato fechado. Deve-se ter cuidado especial ao manusear formalina (formol), pois esta substância está relacionada pelo IARC (OMS) como um possível causador de câncer.



Fonte: SVS/MS.

3.6 Preliminares da contagem de cianobactérias

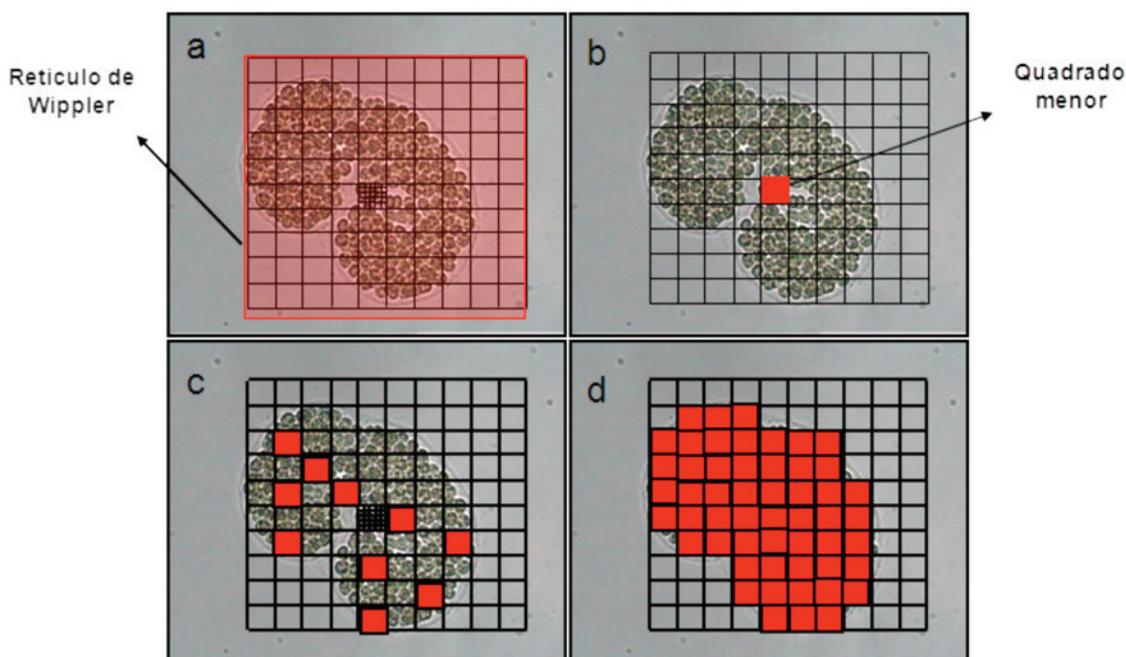
De acordo com a forma das espécies (unicelulares, coloniais, filamentosas retas, filamentosas em espiral, etc.), antes da contagem alguns procedimentos devem ser realizados, com o objetivo de facilitar a quantificação dos organismos.

a) **Formas unicelulares** (ex. *Synechocystis sp.*, *Chroococcus sp.*, *Synechococcus sp.*, etc.): Para espécies com esse formato não há estratégia prévia e devem ser contadas diretamente nos campos de observação do microscópio, registrando-se o total de células em cada campo visualizado em uma planilha de contagem (Figura 30);

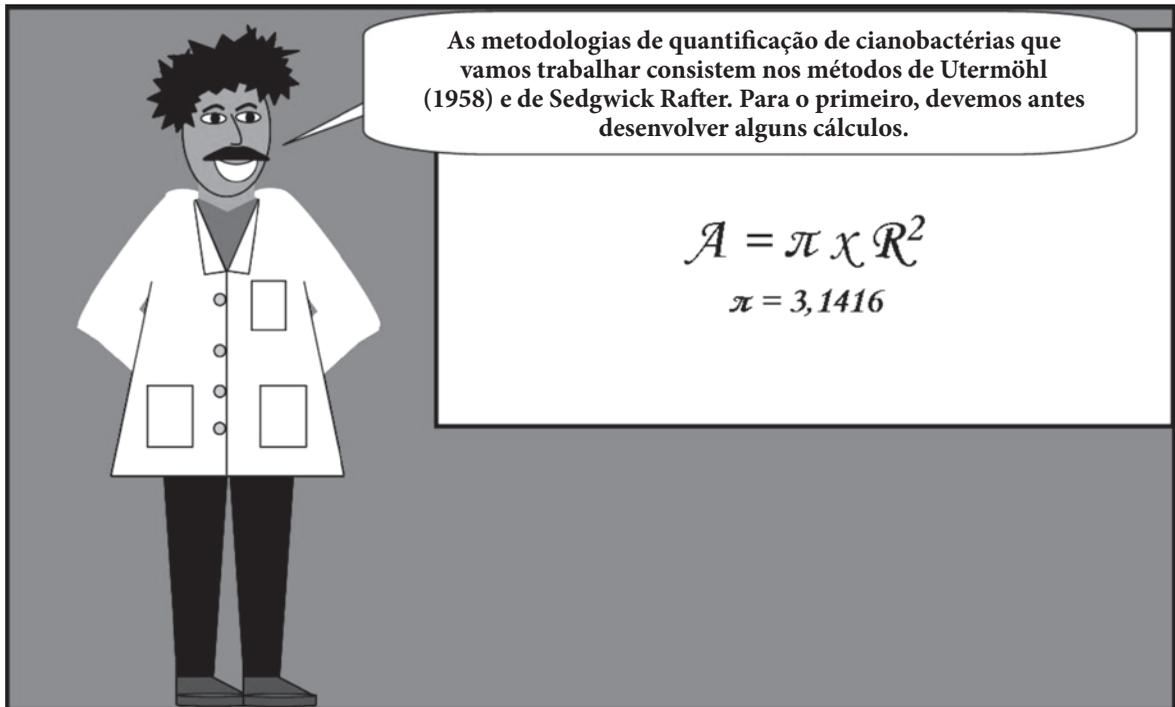
de Wippler (Figura 31a) (acessório reticular para acoplagem na ocular do microscópio) e promover os seguintes passos: 1º sobrepor o retículo de Wippler na colônia (Figura 31b); 2º contar o número de células em 10 quadrados menores do retículo de Wippler, aleatoriamente (Figura 31c); 3º efetuar o passo anterior (2º) para pelo menos 20 colônias e calcular a média de células/quadrado menor; 4º realizar os passos anteriores para cada espécie colonial observada. Durante a contagem, sobrepor o retículo nas colônias, contar o número de quadrados menores recobertos pela colônia (Figura 31d) e multiplicar esse quantitativo pela média do número de células/quadrado menor, anteriormente obtido.

Obs.: Algumas espécies podem apresentar uma só camada de células (ex.: *Radiocystis fernandoi*), duas camadas (*Sphaerocavum brasiliensis*) ou ainda três camadas (ex.: *Microcystis aeruginosa*). Nesse sentido, assegurando-se desta informação, ao final da contagem deve-se multiplicar o valor encontrado no cálculo anterior pelo número de camadas de cada organismo.

Figura 31 – a – Retículo de Wippler; b – Detalhe do quadrado menor; c – Simulação do cálculo da média de células em um quadrado menor; d – Simulação de contagem de células em uma colônia



Fonte: SVS/MS.



Fonte: SVS/MS.

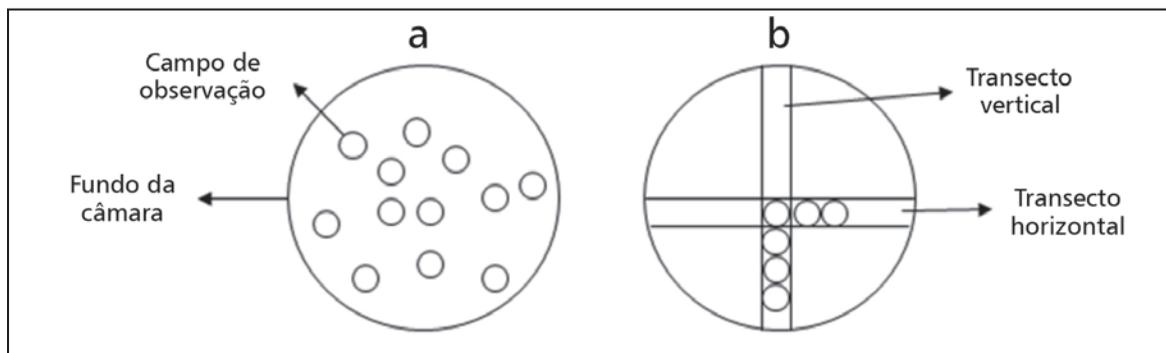
3.7 Contagem de cianobactérias

Existem algumas técnicas de quantificação de células fitoplanctônicas, bem como de cianobactérias, as quais são ajustadas ao uso do microscópio biológico, como os métodos de Sedgwick Rafter, Palmer Maloney, Petroff Hausser e Neubauer, e ao microscópio invertido, Utermöhl. Por se tratar dos métodos mais difundidos e aceitos pelos pesquisadores da área, iremos detalhar os métodos de Utermöhl (1958) e Sedgwick Rafter (2004).

3.7.1 Método de Utermöhl

Como anteriormente mencionado no item 3.5, subsecção “Amostra fixada com lugol”, o princípio da contagem com câmaras de Utermöhl é a sedimentação dos organismos dentro de um volume predeterminado. O método, descrito por Utermöhl (1958), consiste na quantificação dos organismos em campos aleatórios ou campos alinhados em transectos verticais ou horizontais (Figura 32).

Figura 32 – a – Desenho do fundo da câmara de Utermöhl com campos de observação aleatórios; b – Desenho do fundo da câmara de Utermöhl com campos em transectos vertical e horizontal



Fonte: SVS/MS.

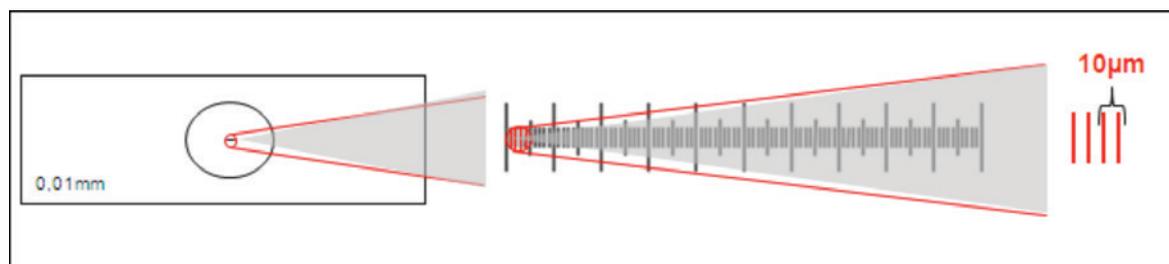
I – Acessórios e ferramentas

Para o cálculo da densidade (células/mL) de cianobactérias pelo método de Utermöhl, o técnico necessita de alguns acessórios e ferramentas (lâmina micrométrica, retículo micrométrico e paquímetro de precisão) para definição de valores a serem utilizados durante os cálculos.

Lâmina micrométrica - LM: Lâmina para calibração de microscópios, de dimensão semelhante a uma lâmina padrão de análise, apresenta régua microscópica gravada na porção central, com dimensão de um milímetro que, por sua vez, encontra-se dividida em 100 partes (1/100mm), entre as quais ajusta-se 10µm (Figura 33).

A lâmina micrométrica é utilizada para o cálculo da área do campo em diferentes objetivas, da área do retículo de Wippler e do fator de conversão para o retículo micrométrico acoplado à ocular.

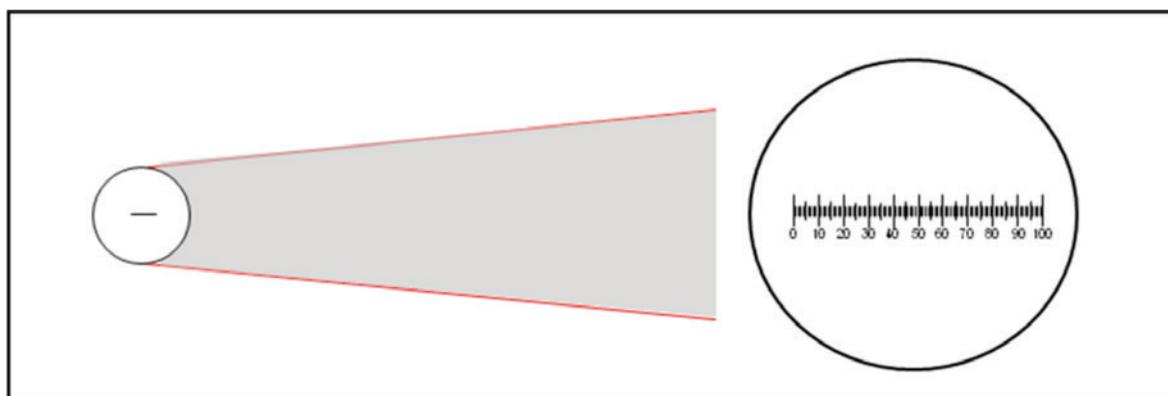
Figura 33 – Desenho do fundo da câmara de Utermöhl com detalhe da régua



Fonte: SVS/MS.

Retículo micrométrico – RM: Consiste em uma tipo de “película” ou “lâminula” plástica que apresenta uma escala reta (Figura 31) ou em cruz, que mede geralmente 10mm subdivididos em 100 partes, ajustada para ser acoplada em uma das oculares do microscópio. O retículo é utilizado para aferir as dimensões celulares.

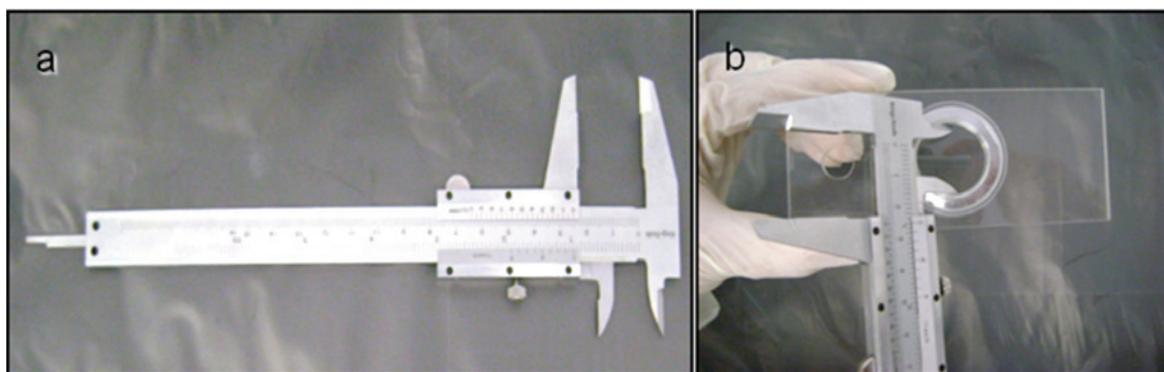
Figura 34 – Desenho do retículo micrométrico com detalhe da escala em linha reta



Fonte: SVS/MS.

Paquímetro: Instrumento de medida de dimensões lineares internas, externas e de profundidade de um objeto, como por exemplo, a medida do diâmetro interno de um círculo (Figura 35). É utilizado para medir o diâmetro interno da câmara de Utermöhl, para posterior cálculo da área do fundo da câmara.

Figura 35 – a – Paquímetro (profissional); b – Simulação da aferição do diâmetro interno da cubeta de Utermöhl

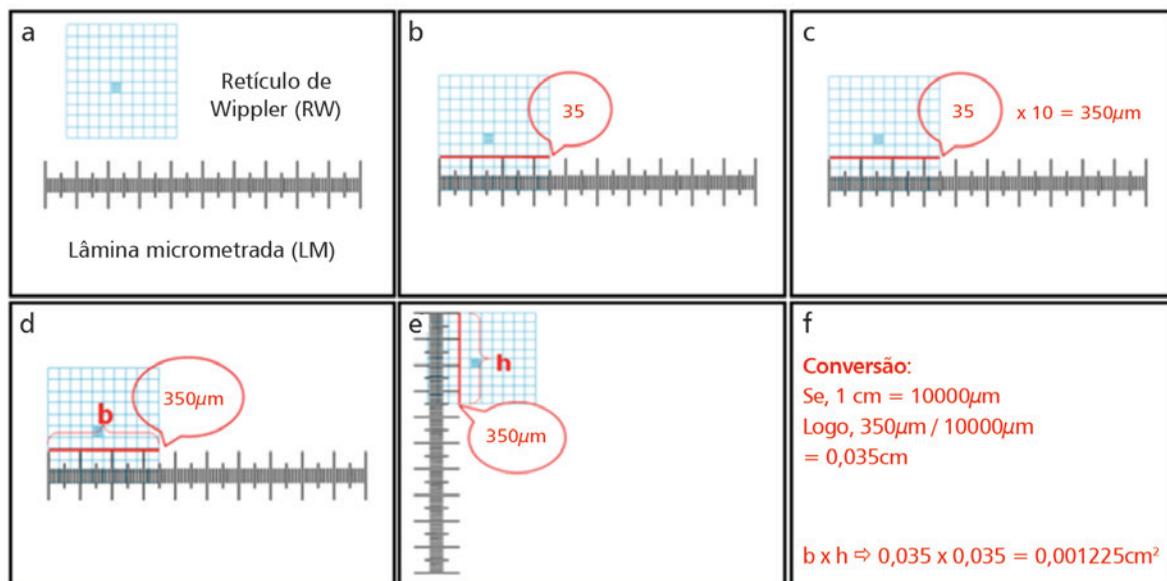


Fonte: SVS/MS.

II – Cálculos de áreas, retículos, campos e câmara de Utermöhl

1 – a) Cálculo da área do retículo de Wippler – RW; b) Sobrepor a marca da origem, esquerda da lâmina micrometrada - LM sobre a primeira linha vertical esquerda do RW (lado da base - b); c) Contar quantas unidades da LM estão inseridas entre a primeira e a última linha vertical do RW; d) Multiplicar as unidades contadas por 10 (dez), que corresponde ao número de micrômetros em cada uma das unidades da LM; e) Repetir os procedimentos anteriores sobrepondo a marca de origem esquerda da LM sobre a linha superior horizontal do RW (lado da altura - h); f) Calcular a área do RW ($A = b \times h$) em cm^2 (Figura 36).

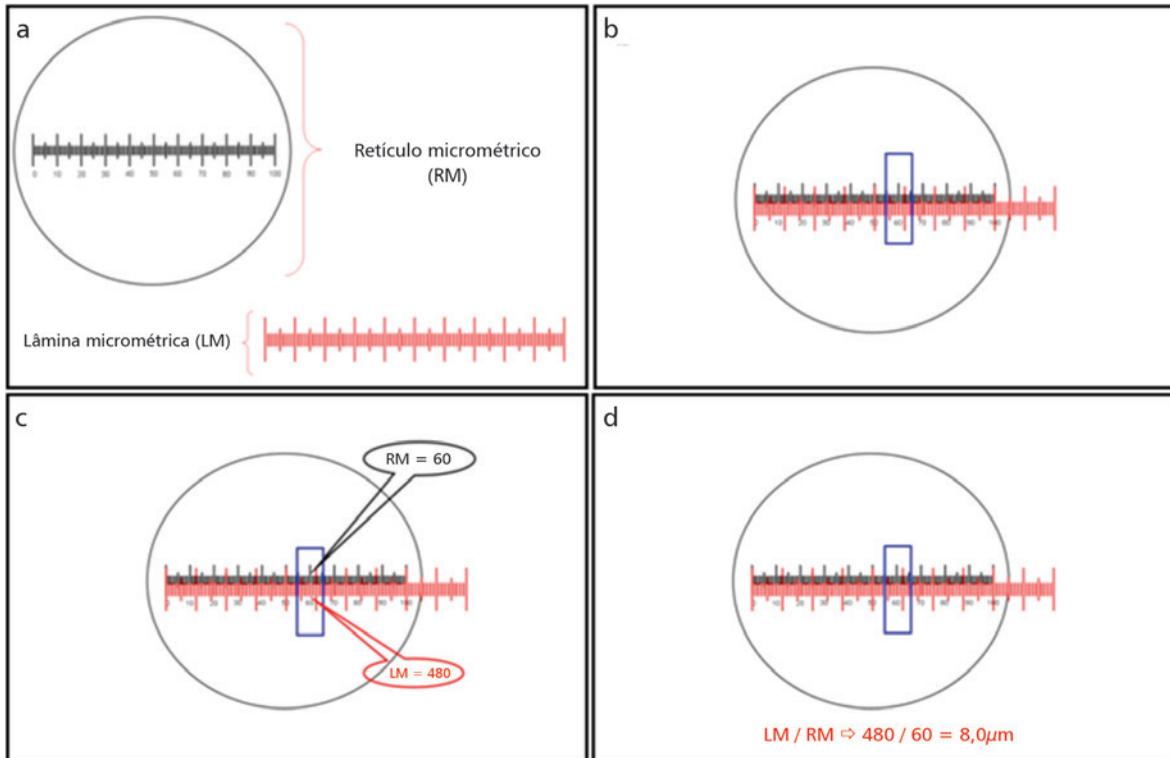
Figura 36 – Simulação do cálculo da área do retículo de Wippler



Fonte: SVS/MS

2 – a) Cálculo de conversão das unidades do retículo micrométrico - RM em μm; b) sobrepor a marca de origem esquerda da LM sobre a marca de origem esquerda do RM e identificar a primeira coincidência entre as marcas das duas escalas, após 50% do RM; c) Contar as unidades da LM (converter em micrômetros) e do RM até o ponto de coincidência; d) Calcular o valor de conversão dividindo o número de unidades da LM (em micrômetros - μm) pelas unidades do RM (Figura 37).

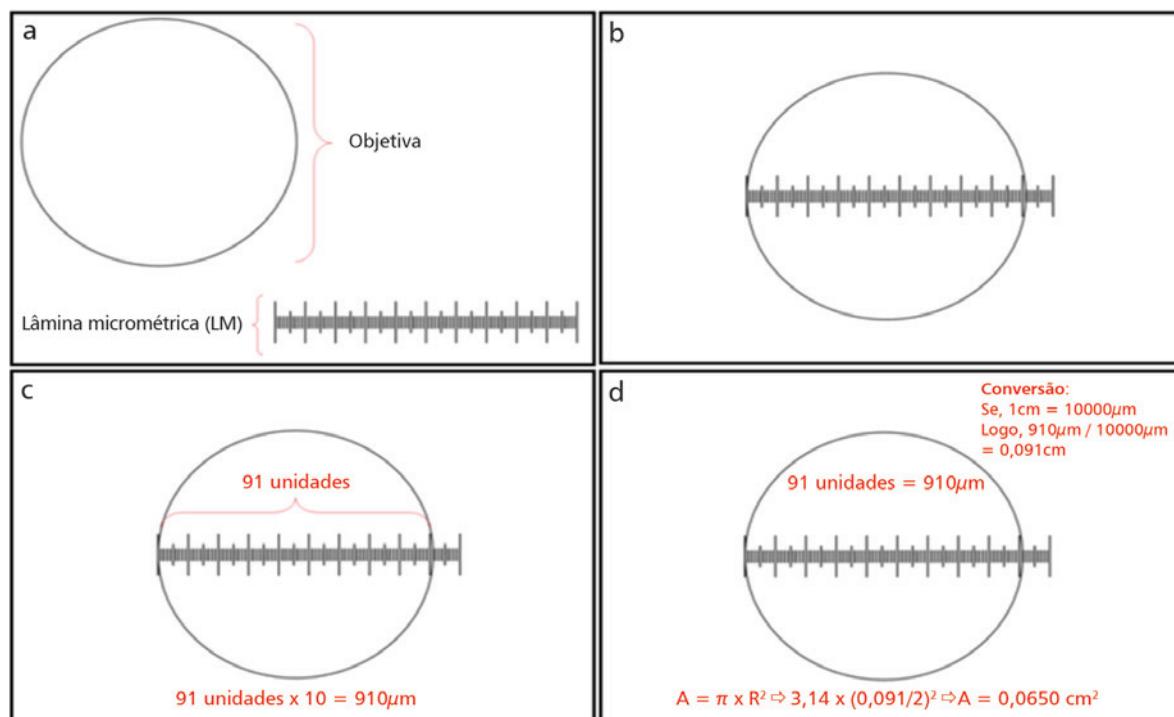
Figura 37 – Simulação do cálculo de conversão das unidades do retículo micrométrico em μm



Fonte: SVS/MS.

3 – a) **Cálculo da área do campo da objetiva**; b) Situar a LM sobre a maior extensão do diâmetro da objetiva (passando pelo centro) e coincidir o limite esquerdo da LM com o limite esquerdo do diâmetro do campo; c) Contar as unidades contidas neste diâmetro e multiplicar por 10 (dez); d) Calcular a área da objetiva em cm^2 : $A = \pi \times R^2$ (Figura 38).

Figura 38 – Simulação do cálculo da área do campo da objetiva

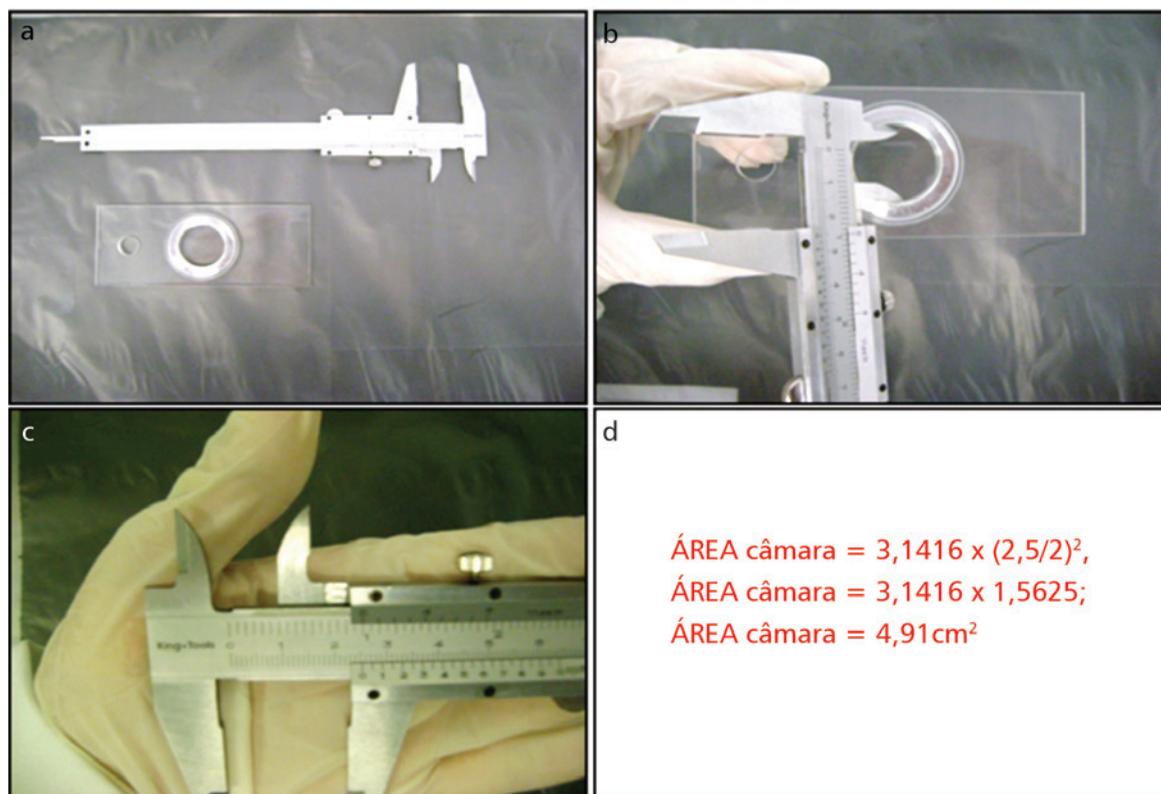


Fonte: SVS/MS.

Obs.: 1) O cálculo da área do retículo de Wippler, de conversão do retículo micrométrico e da área do campo da objetiva devem ser realizados separadamente para cada uma das objetiva, assim como para cada microscópio; 2) Para calcular a densidade das células sempre deve-se utilizar a mesma unidade de medida para todos os cálculos. Nos casos apresentados, os cálculos das áreas foram convertidos em **cm²**, mas também poderiam ser em **mm²**.

1 - a) Cálculo da área do fundo da camera ou cubeta de Utermöhl; b) Com um paquímetro, faça a medição do diâmetro (interno) de uma câmara de Utermöhl; c) Registre o valor medido e aplique-o a fórmula $\text{Área}_{\text{câmara}} = \pi \cdot R^2$, lembrando que o valor de π é **3,1416** e **R** é o raio do diâmetro aferido pelo paquímetro, ou seja, a metade do valor medido; d) Assim, é só substituir os valores na fórmula da seguinte maneira (considerando como resultado da aferição 2,5cm) (Figura 39).

Figura 39 – Representação do cálculo da área da câmara ou cubeta de Utermöhl



Fonte: SVS/MS.

3.7.2 Aplicação do cálculo de densidade de cianobactérias

Com todos os dados necessários para aplicação do cálculo de densidade das cianobactérias devidamente apresentados, vamos conhecer a fórmula do fator descrita na Norma Técnica Cetesb nº L5.303, dezembro de 2005.

Para aplicação da fórmula, inicialmente se faz necessário três valores; a) valor da **área** do fundo **da cubeta**; b) valor da **área do campo da objetiva** utilizada para contagem; e c) o **volume** inicial da amostra **sedimentado** na cubeta de Utermöhl.

$$\text{Fórmula do Fator de densidade de células} = A/a/v$$

Onde:

A = área da cubeta;

a = área contada (área da objetiva x nº de campos contados);

v = volume sedimentado.

Exemplo da aplicação da fórmula

Situação

Considerando que durante uma análise quantitativa foram contadas **500** células de cianobactérias da amostra, em uma cubeta com volume de **10mL**, utilizando uma objetiva com aumento de **40X**, onde foram analisados um total de **20** campos da objetiva (considerar $V = 4,9 \text{ cm}^2$ e área do campo da objetiva = **0,002** cm^2).

Organizando os dados

Área do fundo da cubeta (**V**): $4,9 \text{ cm}^2$;

Área do campo da objetiva: $0,002$;

Área contada (**a**): $0,04 \text{ cm}^2$ ($20 \times 0,002$);

Volume sedimentado (**v**): 10 mL .

Fator = $V/a/v$

Fator = $4,9 / 0,04 / 10$

Fator = **12,5**;

Com o cálculo do fator, multiplica-se o valor pelo nº de células contadas:

= $12,5 \times 500$;

Logo, o Nº de células de cianobactérias por mL será igual a **6.259 cél./mL**.

Incerteza do método

Quando se está quantificando cianobactérias, sempre ocorre a seguinte indagação: *Até quantos organismos ou campos devo contar?* Para resolver tal questão deve-se seguir a orientação estatística proposta no Standard Methods (2006):

No processo de quantificação das cianobactérias deve-se trabalhar com um erro menor ou igual a 20%. Para calcular tal erro faz-se uso da seguinte fórmula: $2/\sqrt{N}$ (dois dividido por raiz de N) x 100, onde "N" é o número total de organismos filamentosos ou coloniais quantificados.

Exemplo:

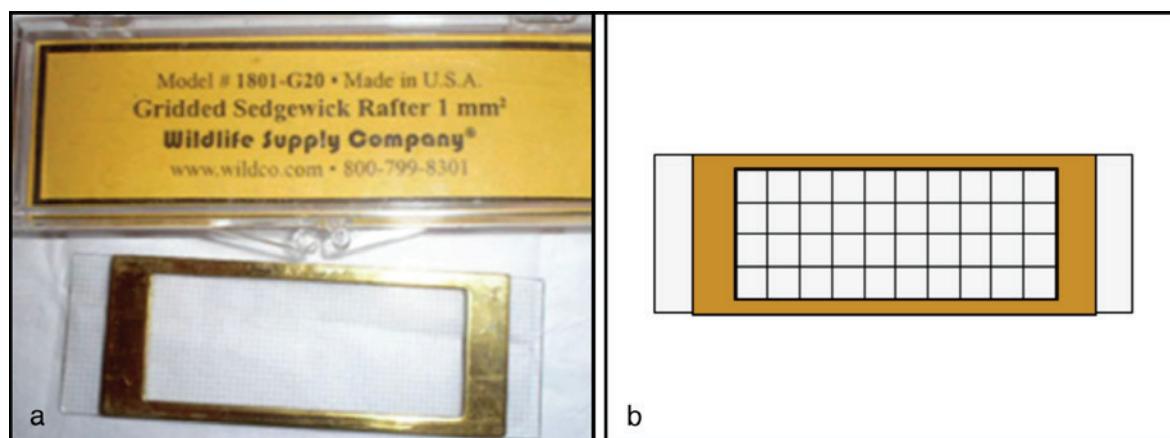
De acordo com a aplicação da fórmula acima, ao contar 100 organismos filamentosos ou coloniais, se estará trabalhando com um erro de 20%, maior erro admissível; com $N = 400$ organismos, esse erro será de 10%; e com $N = 800$ organismos, erro de 7%, e assim por diante.

3.7.3 Método de Sedgwick-Rafter

Descrição

A Câmara de Sedgwick-Rafter (SR) consiste em uma lâmina com capacidade para retenção de um 1 mL de amostra (existem variações com volumes maiores, com 2 mL). Apresenta modelos em acrílico, com leve depressão confeccionada na própria lâmina, e modelos em vidro (Figura 37a), com retângulo de metal acoplado à lâmina. Geralmente, apresentam dimensões padrões com 50mm de comprimento, 20mm de largura e 1mm de profundidade ou altura. Algumas câmaras apresentam subdivisões quadradas desenhadas na lâmina, com volume e dimensão conhecidos, que facilitam a análise e cálculo do n° de cél./mL (Figura 37b) (ASTM, 2004).

Figura 40 – a – Câmara de Sedgwick-Rafter; b – Câmara de Sedgwick-Rafter quadriculada



Fonte: SVS/MS.

Procedimento de análise

A utilização da câmara de SR para análise de uma amostra é bastante simples e rápida, além de ser possível sua utilização em microscópio biológico comum, sendo estas as suas principais vantagens. A amostra após homogeneizada deve ser colocada na câmara de SR com o auxílio de uma pipeta, a partir de um dos cantos da lâmina, lentamente, objetivando distribuição uniforme dos organismos. Em seguida, deve-se sobrepor a lâminula sobre a lâmina e aguardar de 15 – 30 min. para análise. A contagem dos organismos pode ser realizada através de campos aleatórios ou transectos verticais ou horizontais, de forma semelhante ao método de Utermöhl. A principal desvantagem no uso da câmara de SR consiste na limitação da análise em objetivas a partir de aumentos de 400x.

Cálculo

O cálculo do n° de células/mL ocorre com o desenvolvimento de uma regra de três simples, onde: o volume analisado (V_a) é proporcional ao número de organismos contados (n), e o volume total ($V_t = 1\text{mL}$) é proporcional ao total de organismos (x) na câmara de SR. O cálculo de incerteza é o mesmo apresentado anteriormente.

Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, 2006. Disponível em: <www.standardmethods.org>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ASTM. **D4148-82 (2004)**: Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method. West Conshohocken, 2004.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. São Paulo: RIMA, 2006. 502 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 25 jan. 2013.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. Brasília: CNPq, 2006. 109 p.

CZECH REPUBLIC. Culture Collection of Autotrophic Organisms. **Stigonematales**. Třeboň, 2012. Disponível em: <<http://ccala.butbn.cas.cz/en/type-classis-order/stigonematales>>. Acesso em: 31 jul. 2012.

HÖTZEL, G.; CROOME, R. **Phytoplankton methods manual for australian freshwaters**. Canberra: Land & Waters Resources; Research & Development Corporation, 1999. 58 p.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1: teil: chroococcales. In: ETTL, H. et al. (Ed.). **Süßwasser von Mitteleuropa**. [S.l]: Elsevier, 1999. p. 548.

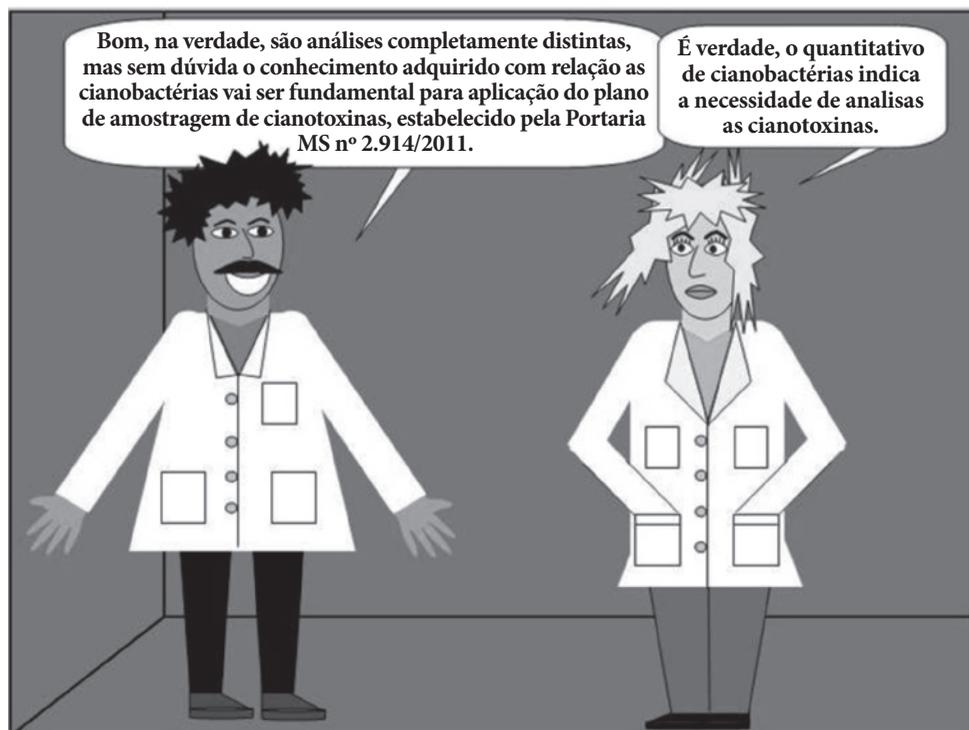
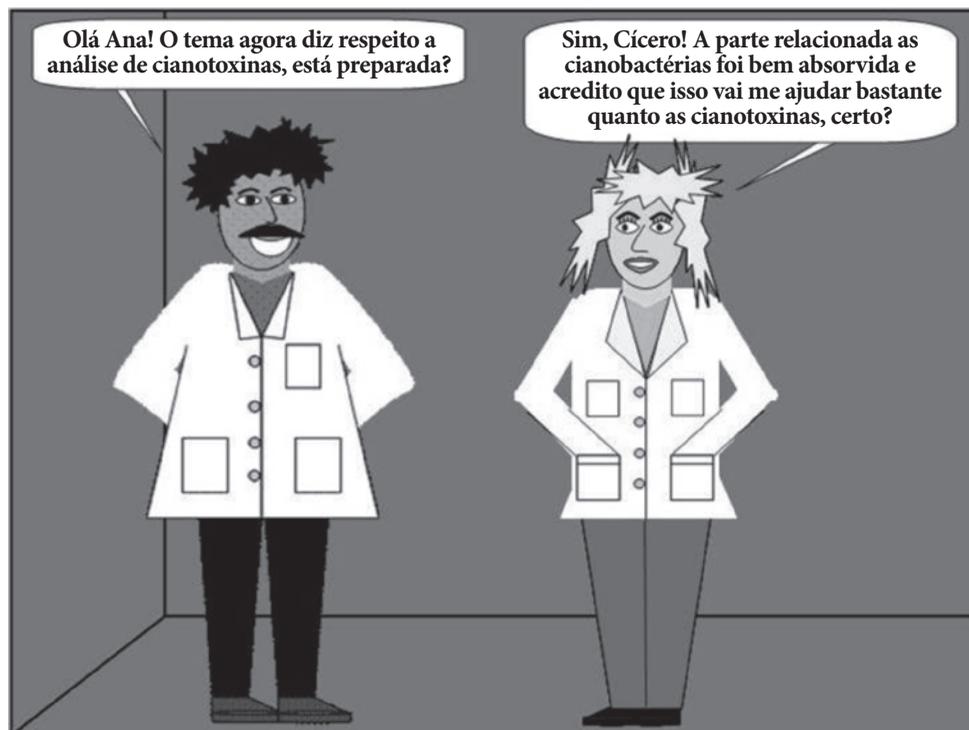
_____; _____. Cyanoprokayota 2: teil: oscillatoriales. In: BRIDEL, B. et al. (Ed.). **Subwasserflora von mitteleuropa**. [S.l]: Elsevier, 2005. p. 759.

LAWTON, L. et al. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, 1999. p. 334-361.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. 10. ed. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: SBFic, 2006.

SÃO PAULO (Estado). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Fitoplâncton de água doce: método qualitativo e quantitativo**. São Paulo: CETESB, 2005. 23 p.

4 Conceitos básicos para o estudo de cianotoxinas – princípios de identificação e quantificação



Fonte: SVS/MS.

4.1 Toxinas produzidas pelas cianobactérias

As toxinas de cianobactérias, de acordo com seus mecanismos de ação, podem ser agrupadas em neurotóxicas e hepatotóxicas. Estas podem ser consideradas os principais agentes tóxicos produzidos pelas cianobactérias, pois causam sérios danos a vida animal e a saúde humana, quando presentes em águas de recreação e/ou consumo.

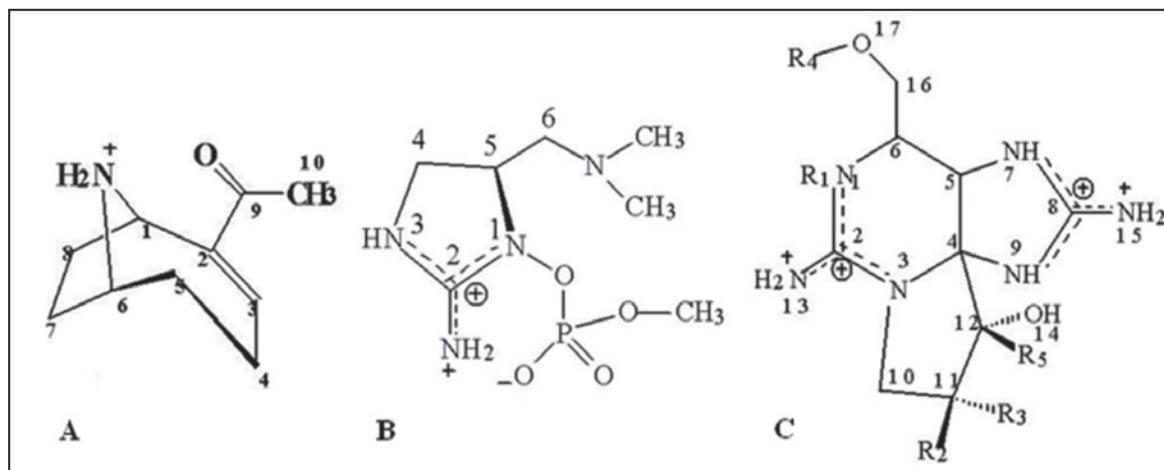


Fonte: SVS/MS.

4.1.1 Neurotoxinas

As neurotoxinas, caracterizadas por sua ação rápida, causam, apesar dos diferentes mecanismos de ação, a morte de vertebrados por parada respiratória após poucos minutos de exposição. As neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias até agora identificadas são: anatoxina-a e seus análogos, anatoxina-a(s) e as pertencentes ao grupo das saxitoxinas (ou “toxinas paralisantes de mariscos” do inglês *paralytic shellfish poison* – PSP) (Figura 41), que somam mais de 50 análogos conhecidos. Dessas, apenas anatoxina-a(s) e saxitoxinas já foram identificadas em ecossistemas aquáticos brasileiros, sendo a segunda bastante frequente, principalmente nas florações em que há presença da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Figura 41 – Estruturas químicas de neurotoxinas: A – Anatoxina; B – Anatoxia-a(s); e C – Saxitoxinas



Fonte: SVS/MS.

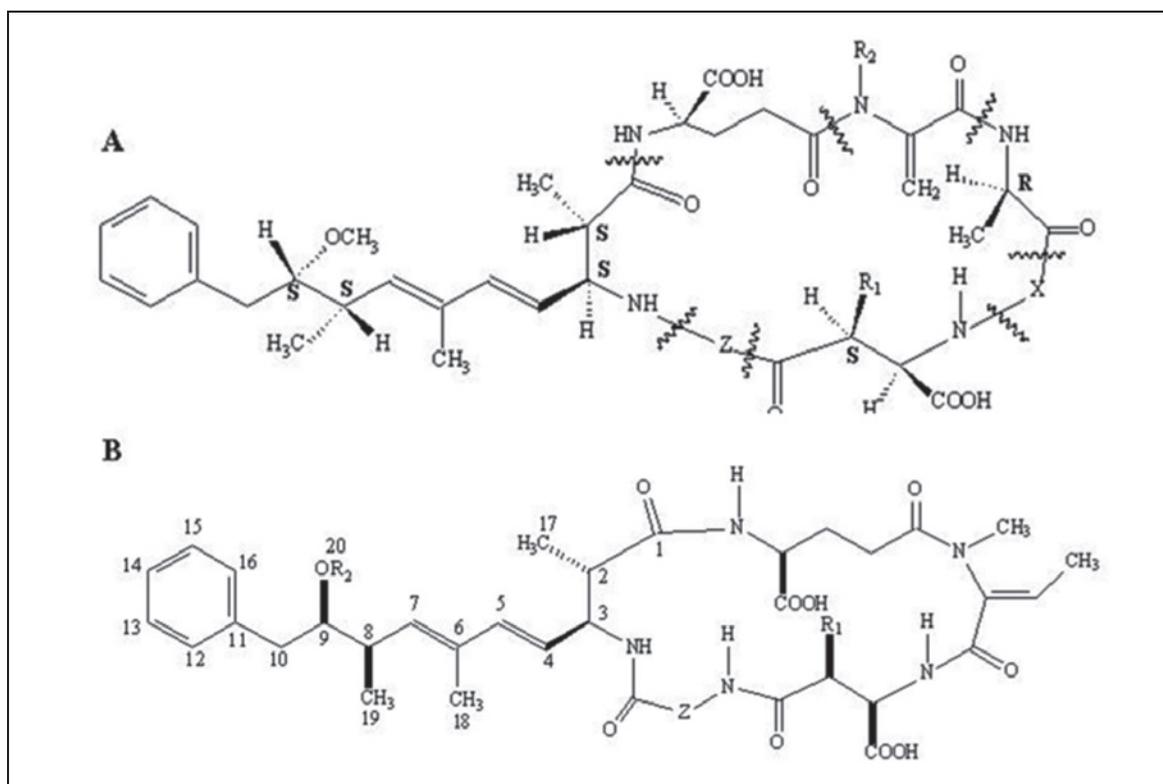
Os gêneros *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Raphidiopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Planktolyngbya*, *Hydrocoleum* e *Lyngbya* já foram descritos como produtores de neurotoxinas. Entretanto, como descrito anteriormente, outros gêneros também podem ser produtores dessas toxinas.

Até hoje, não há nenhum registro confirmado de mortes humanas causadas por neurotoxinas produzidas por cianobactérias, no entanto, alguns gêneros de dinoflagelados marinhos, que também produzem toxinas do grupo das saxitoxinas, já foram responsáveis por mortes de seres humanos que consumiram mariscos que haviam acumulado essas toxinas durante eventos de marés vermelhas.

4.2.1 Hepatotoxinas

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo as cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, quando comparadas às neurotoxinas. As hepatotoxinas peptídicas já caracterizadas são heptapeptídeos cíclicos conhecidos como microcistinas e as nodularinas, que são pentapeptídeos. A cilindrospermopsina é um alcalóide hepatotóxico que também age em outros órgãos, além de inibir a síntese de proteínas (Figura 42).

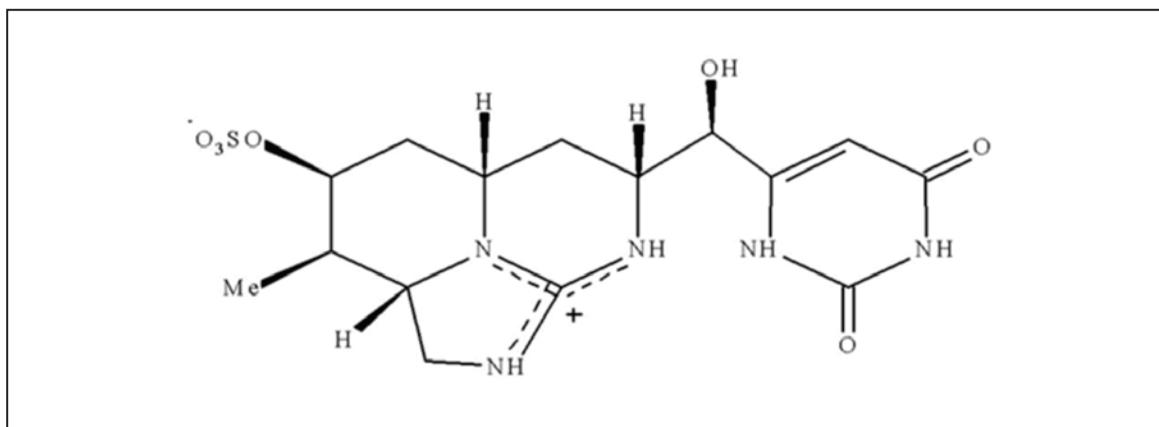
Figura 42 – Estrutura química de hepatotoxinas: a – Microcistina; b – Nodularina



Fonte: SVS/MS.

No Brasil há vários registros da presença de microcistinas em mananciais de abastecimento, porém apenas um registro de cilindrospermopsina (foi encontrada em amostras de carvão ativado da clínica de Hemodiálise de Caruaru na época do acidente com os pacientes) e nenhum de nodularina (Figura 43). Os gêneros relacionados a produção de hepatotoxinas são *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanocapsa*, *Arthrospira*, *Fischerella*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Plectonema*, *Radiocystis*, *Synechocystis*, *Woronichinia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Raphidiopsis*, *Umezakia*, *Nodularia*. Entretanto, todas as cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas.

Figura 43 – Estrutura química da Cilindrospermopsina



Fonte: SVS/MS.

4.2 Análise de cianotoxinas

A fim de otimizar o processo de análise de cianotoxinas, uma vez que existem diferentes metodologias, cujos custos são diferenciados, podem ser adotados os procedimentos analíticos descritos a seguir.

Primeiramente, deve-se detectar a presença de cianotoxinas na água bruta do reservatório. Não havendo cianotoxinas naquela, não há necessidade de analisar a presença delas na água tratada.

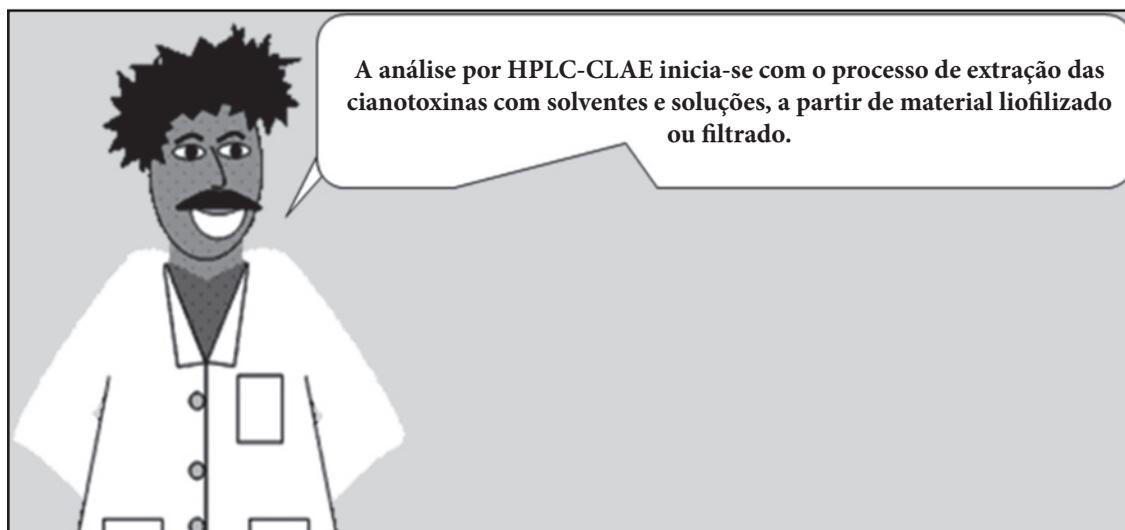
O emprego da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE) é uma boa alternativa a ser utilizada. Embora o custo de um equipamento de HPLC/CLAE seja elevado, o custo analítico, quando comparado ao ELISA, é menor. Outra limitação do HPLC/CLAE é o fato dos métodos para detecção de cianotoxinas possuírem limites de detecção mais elevados, quando comparados a outras metodologias (cromatografia líquida associada a espectrometria de massa e testes imunoenzimáticos – ELISA) e de serem mais laboriosos. Quando implementada, entretanto, a análise por HPLC/CLAE é uma excelente ferramenta para análise rotineira de cianotoxinas.

No caso da análise por HPLC confirmar a presença de cianotoxinas na água do reservatório, deve-se utilizar o ensaio imunoenzimático (ELISA), disponível para todas as cianotoxinas citadas na Portaria MS nº 2.914/2011, para verificar a presença na água tratada. O ELISA possui um limite de detecção muito inferior ao do HPLC, portanto é mais adequado para a verificação de cianotoxinas na água tratada.

Por fim, nada impede que o operador utilize os Kits ELISA para verificação da presença de cianotoxinas na água bruta (do reservatório). Neste caso, recomenda-se que as amostras de água sejam sonicadas com bastão de ultrassom para garantir o rompimento das células. Alternativamente,

na falta de aparelho de ultrassom, a solução poderá ser congelada e descongelada duas vezes. Após o rompimento das células, seguir os procedimentos descritos pelo fornecedor do Kit ELISA.

4.2.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-CLAE)



Fonte: SVS/MS.

Extração de cianotoxinas

Para dar início a análise de cianotoxinas há a necessidade de se realizar extrações destes compostos nas amostras, ou seja, com auxílio de solventes e soluções, deve-se separar as toxinas de parte da biomassa das cianobactérias, o que facilitará a posterior detecção. Cada toxina segue um protocolo diferenciado de extração, entretanto, parte da preparação da amostra é comum a todas elas.

A partir do material coletado em campo e que está preservado em laboratório (ver capítulo 2 – *Coleta, preservação e transporte de amostras de água para pesquisa de cianotoxinas*), geralmente mantido congelado a pelo menos -18°C , é que se inicia o processo de extração de uma amostra:

Liofilização

O processo de liofilização é iniciado a partir de uma amostra congelada. Se o material coletado foi concentrado em rede de plâncton ou, em razão da alta densidade da floração, foi coletado sem necessidade de concentração, haverá necessidade de liofilizá-lo. O processo de liofilização, resumidamente, irá remover a água por sublimação, ou seja a água passa do estado sólido (gelo) para o gasoso (vapor), o que garante a preservação da amostra e consequentemente das cianotoxinas. Após a liofilização do material, o ideal é que se tenha entre 20 e 100 mg de material seco para iniciar o processo de extração. Ao se manipular o material seco, o qual é facilmente disperso no ar, deve-se usar máscaras adequadas para evitar sua inalação o que pode representar um risco à saúde, caso o material tenha cianotoxinas.

Filtração

Por sua vez, caso a densidade (número de células por mL) da floração seja baixa e não se disponha de uma rede de plâncton, as amostras de água podem ser filtradas (Consultar capítulo 2 – *Coleta, preservação e transporte de amostras de água para pesquisa de cianotoxinas*) e os filtros armazenados a uma temperatura de pelo menos -18°C, os quais serão utilizados no processo de extração.

4.2.2 Análise de Microcistinas

Extração

Na literatura especializada há a descrição de várias fases aquosas (soluções) utilizadas para a extração de microcistinas. Entretanto, a solução de metanol (P.A) 75% em água (75:25, metanol:água, v/v) tem sido uma das mais utilizadas, uma vez que é eficiente na extração tanto das microcistinas mais polares como das mais apolares (FASTNER; FLIEGER; NEUMANN, 1998). Neste caso, deve-se seguir os seguintes procedimentos:

- 1) Colocar as membranas filtradas contendo as células em um béquer de vidro (50 a 150 mL) com um volume de metanol 75% suficiente para cobrir os filtros. No caso da extração partir de material liofilizado, transferir uma massa conhecida entre 20 e 100 mg, aproximadamente, para um béquer e adicionar um volume de metanol 75% de aproximadamente 10 mL. Ao se manipular o material seco, o qual é facilmente disperso no ar, deve-se usar máscaras adequadas para evitar sua inalação o que pode representar um risco à saúde, caso o material tenha cianotoxinas. Sonicar a amostra com bastão de ultrassom para garantir o rompimento das células;
- 2) Deixar o material extraído por 1 hora. Se possível, realizar a extração com auxílio de uma placa agitadora e um ímã; para evitar perda de material deve-se cobrir o béquer com filme plástico e, se possível, realizar a extração em capela;
- 3) Transferir a solução para um tubo de ensaio (de vidro ou do tipo Falcon, com ou sem tampa) e centrifugá-lo. O operador deverá definir a melhor condição de centrifugação, ou seja, a quantos RPM e por quanto tempo. O importante é que o solvente fique límpido e separado da fração sólida;
- 4) Transferir o solvente (sobrenadante) para um béquer ou balão de evaporador rotativo;
- 5) Suspender o material precipitado com metanol 75% (o mesmo volume utilizado anteriormente - passo 1) e repetir o processo de extração mais duas vezes, sempre transferindo o sobrenadante, após a centrifugação, para o béquer ou balão de evaporador rotativo. O tempo da extração nas duas últimas etapas poderá ser de apenas 30 minutos;
- 6) Secar a solução de extração em evaporador rotativo, tomando o cuidado para que a temperatura da solução dentro do balão não seja superior a 40°C. Ao final da evaporação, o balão poderá ser guardado a -18°C, até a realização da análise, a qual deve ocorrer em até 30 dias;

7) Adicionar ao balão 500 µL de metanol 20% (metanol deverá ser grau HPLC e a água ultrapura), mexer o balão de maneira que a solução ressuspensa o material seco e transferi-la para um tubo de ensaio (1,5 ou 2 mL) ou frasco de vidro com tampa. Novamente adicionar 500 µL de metanol 20% (grau HPLC) ao balão e repetir o procedimento. Ao final juntar os dois volumes;

Obs: Para facilitar a ressuspensão do material, pode-se adicionar primeiro 100 µL de metanol puro, mexer o balão e em seguida mais 400 µL de água ultrapura (volume final de 500 µL e metanol com concentração final de 20%);

8) A solução utilizada para ressuspender o material do balão do evaporador rotativo poderá ser centrifugada, neste caso, uma força *g* superior a 18.000 é recomenda, pois garantirá a precipitação do material em suspensão. A amostra, ao invés de centrifugada, poderá ser filtrada em filtro de 13 mm e porosidade de 0,22 a 0,45 µm. O filtro deve ser compatível com solventes orgânicos e aquosos (nylon, PTFE, etc.);

9) A solução centrifugada ou filtrada está pronta para ser analisada por HPLC.

I – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Como citado para a extração de microcistinas, também para a análise por HPLC, existem na literatura diversos métodos. Aqui será apresentado um método que vem sendo utilizado por diferentes laboratórios do país e do mundo e que permite a identificação de diferentes análogos de microcistinas (LAWTON et al., 1994).

Condições e estrutura do equipamento

O conjunto de condições analíticas, tais como temperatura do forno, composição da fase móvel, etc. é que compõem o método analítico, o qual pode ser aplicado em qualquer equipamento de HPLC, desde que este tenha os módulos necessários. Entretanto, cada operador deverá conhecer o programa (software) e a interface de operação, os quais diferem entre as marcas de HPLC, além de ter o conhecimento básico sobre o uso do equipamento. O equipamento de HPLC (Figura 44) deverá dispor da seguinte configuração:

- Sistema de gradiente;
- Detetor de UV-Vis com arranjo de diodo;
- Sistema de aquisição de dados (software);
- Forno;
- Desgaseificador;
- Injetor manual com loop de 50 µL;
- Coluna de C18 (4 x 250 mm, tamanho de partícula de 5 µ).

Obs: O amostrador automático não é obrigatório, todavia otimiza o tempo de análise, uma vez que esta poderá ser realizada durante a noite.

Figura 44 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência composto por três bombas, sendo uma em sistema quaternário para realização de gradiente, degaseificador, detector de fluorescência, forno, detector de UV-Vis com arranjo de diodo e unidade de controle, que faz a conexão de todos os módulos com o microcomputador



Fonte: SVS/MS.

Reagentes

Os reagentes necessários são acetonitrila grau HPLC, ácido trifluoracético (TFA) P.A. e água ultrapura.

Procedimento de análise

- 1) Preparar 500 mL de solução 0,05% de TFA em água (250 μ L de TFA mais 499,75 mL de água) (solução A) e 500 mL de solução 0,05% TFA em acetonitrila (250 μ L de TFA mais 499,75 mL de acetonitrila) (solução B);
- 2) Programar gradiente linear, com fluxo de 1 mL/min, como descrito na Tabela 2:

Tabela 2 – Descrição da programação do gradiente linear para as soluções A e B

Tempo (minutos)	0	10	40	42	44	49	54
Solução A%	70	65	30	5	5	70	70
Solução B%	30	35	70	95	95	30	30

Fonte: SVS/MS.

Obs: No tempo 0 minutos a proporção da fase móvel será de 70% da solução A e 30% da solução B. Em 10 minutos, essa proporção mudará para 65% de A e 35% de B, nos 30 minutos seguintes a proporção mudará para 30% de A e 70% de B e assim sucessivamente. Repare que o final do gradiente corresponde a proporção inicial da fase móvel, ou seja, 70% da fase A e 30% da fase B.

- 3) Equilibrar a coluna com a proporção inicial de fase móvel do gradiente por uns 10 minutos;
- 4) Ajustar o o detector de arranjo de diodo para monitorar as corridas entre 190 e 300 nm;
- 5) Ajustar o forno para uma temperatura de 40°C, dentro dele deverá estar a coluna;
- 6) Durante a análise, injetar padrão de microcistina no início, durante e no final das análises. Este procedimento mostrará o correto funcionamento da análise do método e mostrará possíveis variações no tempo de retenção. As amostras só deverão ser injetadas após o tempo de retenção do padrão ter estabilizado;

Obs.1: O padrão poderá ser preparado em uma solução de metanol (grau HPLC) de 20% a 50%.

- 7) Preparar uma curva de calibração com o padrão (5 a 7 pontos). A faixa de concentração da curva poderá ser entre 100 µg/L e 1000 µg/L. Entretanto, as concentrações poderão ser maiores ou menores, dependendo do limite de detecção do método.

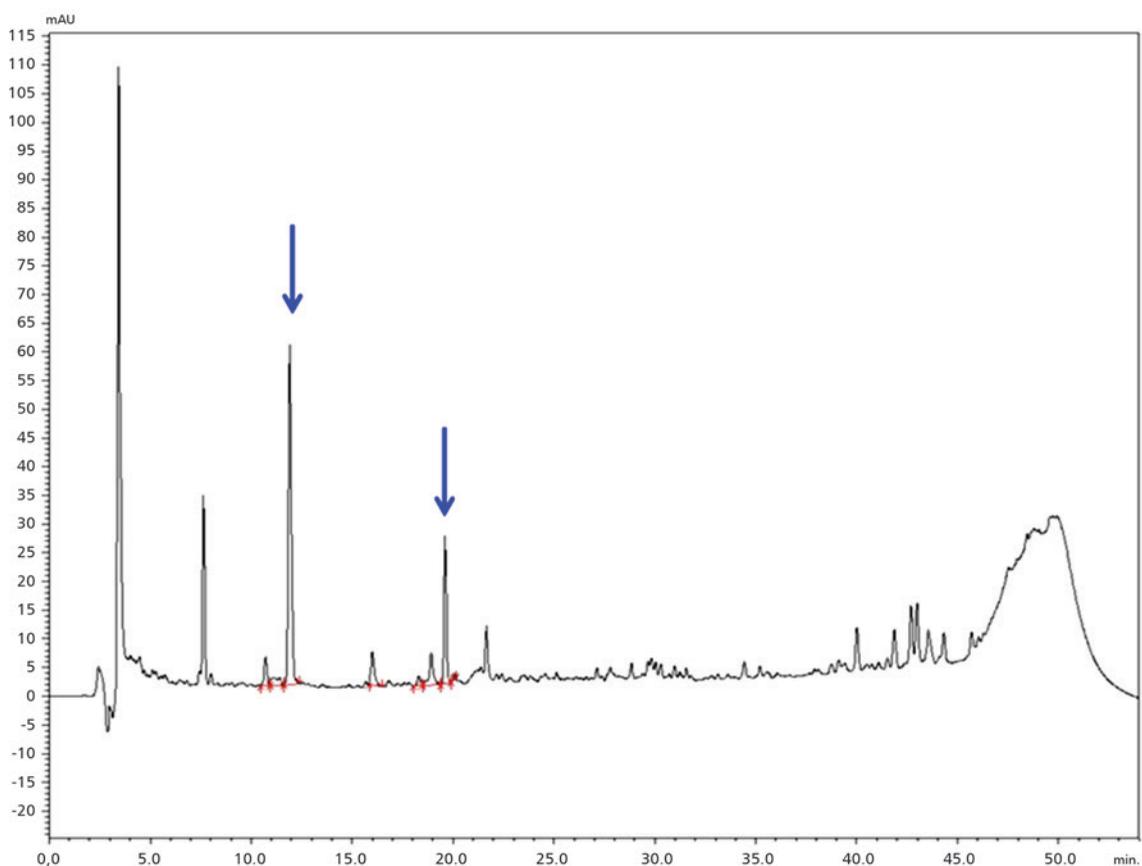
Obs.2: Para maior segurança analítica, sugere-se preparar uma curva de calibração a cada dia de trabalho, porém com apenas três concentrações do padrão;

Obs.3: O monitoramento dos cromatogramas deverá ser feito em 238 nm, que é o comprimento de absorção máxima das microcistinas, garantido uma melhor visualização daqueles;

Obs.4: Um dos problemas da análise de microcistinas é a falta de padrões. Existem mais de 80 análogos, porém há pouquíssimos padrões sendo comercializados. Neste caso, a identificação dos análogos de microcistinas que não têm padrão e, que, portanto, o tempo de retenção na análise será diferente dos padrões, é feito pela comparação de seu espectro de absorção entre 190 e 300 nm, que é bastante similar para todos os análogos de microcistinas. Para melhor entendimento observar as figuras 45 e 46;

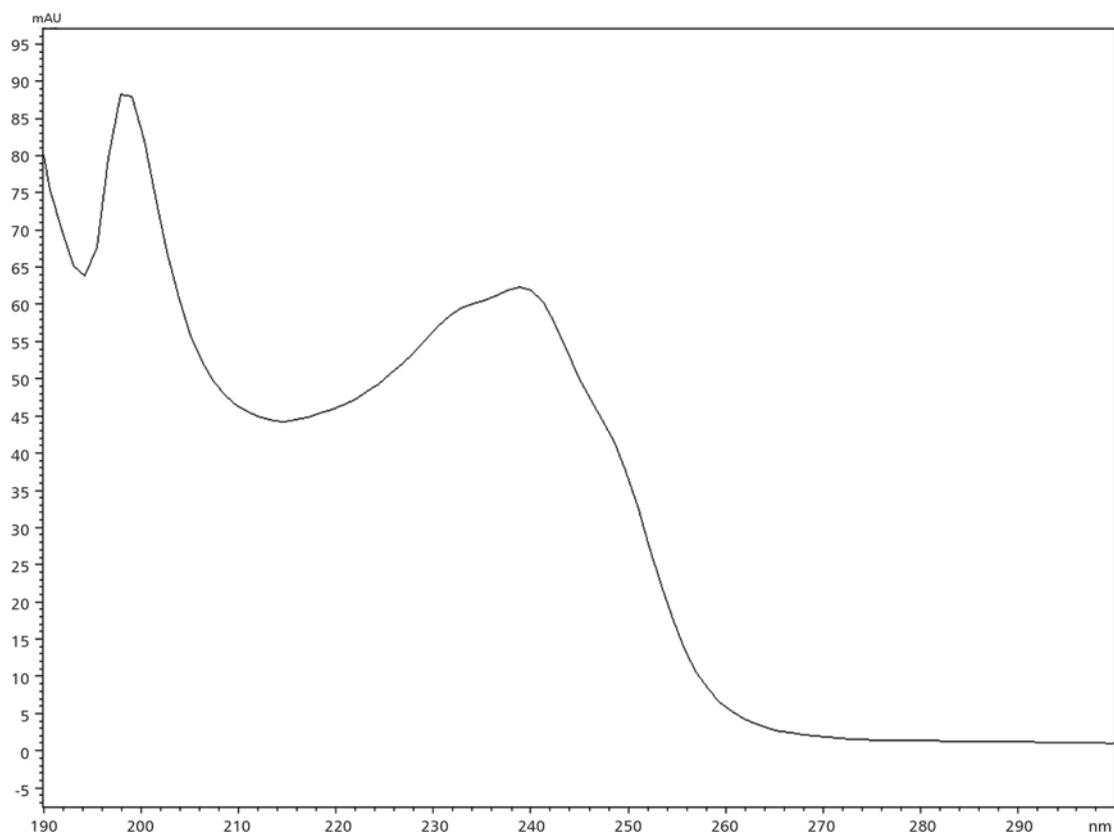
Obs.5: Caso os picos dos cromatogramas não fiquem bem resolvidos (separados) ou estorem a escala, a amostra pode ser diluída (10, 20, 50x) com a mesma solução utilizada para ressuspender o material resultante da extração.

Figura 45 – Cromatograma de amostra de floração de cianobactérias para análise de microcistinas. As condições cromatográficas utilizadas: gradiente linear (conforme descrito acima), temperatura do forno a 40°C, monitoramento em 238 nm e coluna de C18 (4 x 250 mm, tamanho de partícula de 5 μ). Seta indica dois picos identificados como microcistinas



Fonte: SVS/MS.

Figura 46 – Espectro de absorção entre 190 e 300 nm característico das microcistinas



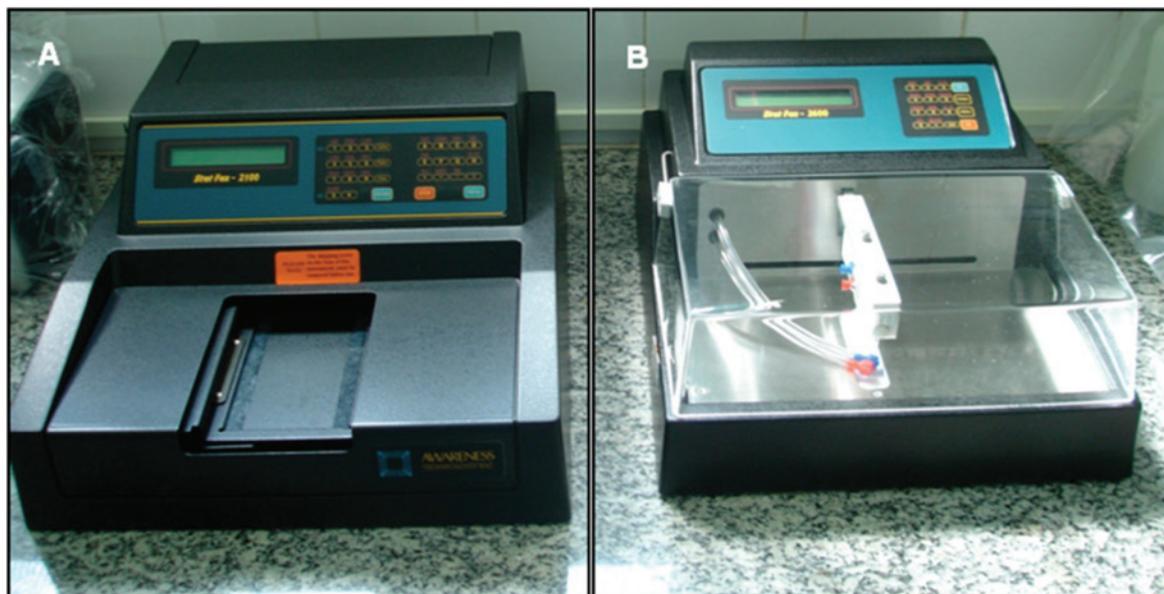
Fonte: SVS/MS.

II – Análise por ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA, em razão de seu baixo limite de detecção (detecta concentrações inferiores a 1 ppb – $\mu\text{g/L}$) e custo elevado, é mais recomendado para a análise da presença de microcistinas na água tratada. Após a confirmação da presença de microcistinas na água bruta do reservatório pela técnica de HPLC, a água tratada deve ser monitorada através do ELISA. Porém, como informado anteriormente, o monitoramento da presença de cianotoxinas na água do reservatório pode ser feito apenas com o kit ELISA.

Existem algumas empresas que comercializam o kit de análise e trata-se de uma análise relativamente simples. Em termos de equipamentos será necessário uma leitora, uma lavadora de microplacas (Figura 47) e pipeta automática multi-canal, sendo a lavadora opcional, porém seu uso garante uma maior precisão na lavagem e otimiza o tempo de análise. Os kits contêm todas as instruções necessárias para a realização das análises.

Figura 47 – A – Equipamento de leitura de microplacas pelo método ELISA; B – Equipamento de lavagem de microplacas utilizadas pelo método de ELISA



Fonte: SVS/MS.

4.2.3 Análise de Saxitoxinas

Extração

Para extração de saxitoxinas utiliza-se uma solução de ácido acético 50 mM. As toxinas desse grupo são bastante estáveis em soluções ácidas. Da mesma maneira como explicado para as microcistinas, a extração pode ser feita a partir de membranas filtrantes utilizadas para concentrar a amostra do reservatório ou de material liofilizado. Neste caso, deve-se seguir os seguintes procedimentos:

- 1) Colocar as membranas filtrantes contendo as células em um béquer de vidro (50 a 150 mL) com um volume de ácido acético 50 mM suficiente para cobrir os filtros. No caso da extração partir de material liofilizado, transferir uma massa conhecida entre 20 e 70 mg, aproximadamente, para um béquer e adicionar um volume de ácido acético de aproximadamente 8 mL;
- 2) Sonicar a amostra com bastão de ultrassom para garantir o rompimento das células. Alternativamente, na falta de aparelho de ultrassom, a solução poderá ser congelada e descongelada duas vezes;
- 3) Deixar o material extraído por 1 hora. Se possível, realizar a extração com auxílio de uma placa agitadora e um ímã;

- 4) Transferir a solução para um tubo de ensaio (de vidro ou do tipo Falcon, com ou sem tampa) e centrifugá-lo. O operador deverá definir a melhor condição de centrifugação, ou seja, quantos RPM (rotações por minuto) e tempo de centrifugação. O importante é que a solução de extração fique límpida e separada da fração sólida;
- 5) Transferir o solvente (sobrenadante) para um béquer ou balão de evaporador rotativo;
- 6) Suspender o material precipitado com ácido acético 50 mM (o mesmo volume utilizado anteriormente) e repetir o processo de extração mais duas vezes, sempre transferindo o sobrenadante, após a centrifugação, para o béquer ou balão de evaporador rotativo. O tempo da extração nas duas últimas etapas poderá ser de apenas 30 minutos;
- 7) Secar a solução de extração em evaporador rotativo, tomando o cuidado para que a temperatura dentro do balão não seja superior a 40°C. Ao final da evaporação, o balão poderá ser guardado a -18°C, até a realização da análise, a qual deve ocorrer em até 30 dias;
- 8) Adicionar ao balão de 1 a 2 mL de ácido acético 0,5 M, mexer o balão de maneira que a solução ressuspenda o material seco e transferi-la para um tubo de ensaio (1,5 ou 2 mL) ou frasco de vidro com tampa;
- 9) A solução utilizada para ressuspender o material do balão do evaporador rotativo poderá ser centrifugada, neste caso, uma força g superior a 18.000 é recomendada, pois garantirá a precipitação do material em suspensão. A amostra, ao invés de centrifugada, poderá ser filtrada em filtro de 13 mm e porosidade de 0,22 a 0,45 μm ; O filtro deve ser compatível com solventes orgânicos e aquosos (nylon, PTFE, etc.);
- 10) A solução centrifugada ou filtrada está pronta para ser analisada por HPLC.



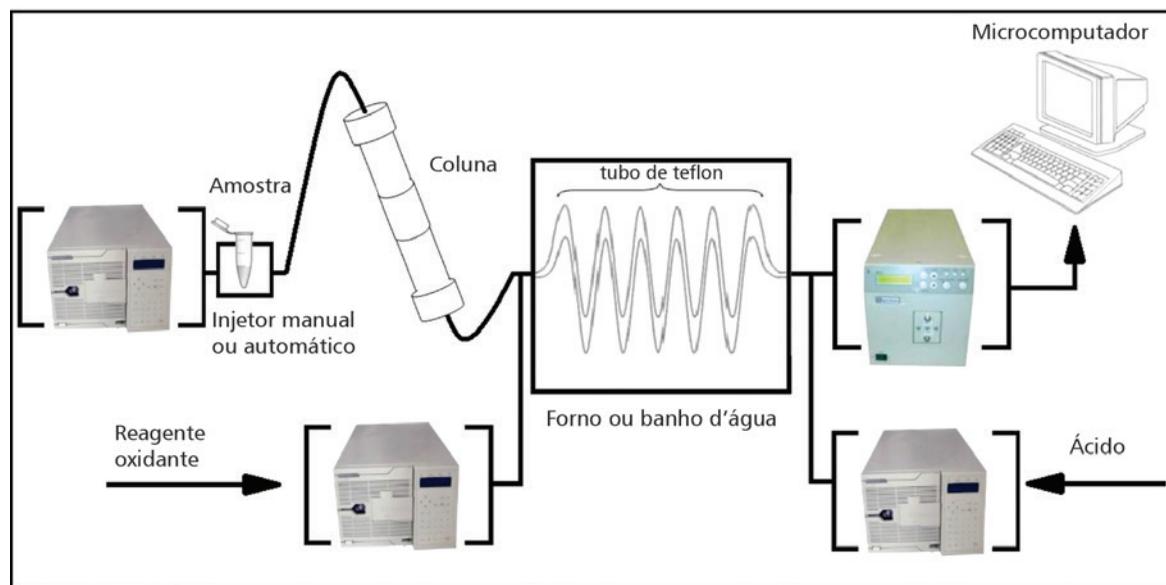
Fonte: SVS/MS.

I – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a análise de saxitoxinas também existem diferentes métodos descritos na literatura. Todavia, muitos laboratórios vêm adotando o método descrito por Oshima (1995). Neste método, são utilizadas três fases móveis, uma para cada subgrupo das saxitoxinas, ou seja, análogos não sulfatados (saxitoxina, neosaxitoxina, dc-saxitoxina, etc.), sulfatados (goniautoxinas – GTX1/4, GTX2/3, dc-GTX2/3 etc.) e duplamente sulfatados (C-toxinas – C1/2, C3/4). Como são utilizados três fases, a análise é mais demorada, porém a separação dos análogos é mais eficiente.

Como os análogos de saxitoxinas não absorvem no ultra-violeta e nem todos emitem fluorescência, o uso de detectores UV-Vis e de fluorescência respectivamente, é limitado. Neste caso, há necessidade de se realizar uma derivatização pós-coluna. Ou seja, os análogos de saxitoxinas são separados na coluna e em seguida são oxidados, num sistema *on-line* (Figura 48) se transformando em moléculas que emitem fluorescência quando excitadas com um comprimento de onda e, portanto, passíveis de ser detectadas pelo detector de fluorescência.

Figura 48 – Esquema de montagem do sistema de derivatização pós-coluna para análise de saxitoxinas



Fonte: SVS/MS.

A empresa que vende o sistema de HPLC possui técnicos habilitados para montar o sistema de derivatização. As especificações dos materiais utilizados são descritas a seguir.

Para este método, o equipamento de HPLC deverá ter três bombas (fase móvel, solução oxidante e solução acidificante), detector de fluorescência, sistema de aquisição de dados (software), forno (até 85°C), desgaseificador, coluna C8 ou C18 (4 x 250 mm, tamanho de partícula de 5 µ), injetor manual com loop de 50 µL e tubo de teflon de 10 metros de comprimento e diâmetro interno de 0,5 mm. O amostrador automático não é obrigatório, todavia otimiza o tempo de análise, uma vez que esta poderá ser realizada durante a noite. O método descrito por Oshima (1995) usa coluna C8, porém boas separações dos análogos têm sido obtidas com colunas C18.

Reagente/Soluções – Fases móveis – soluções oxidante e acidificante

Reagentes / Soluções estoque

- Solução de tetrabutil amônio fosfato - solução de 500mM ou 1,0M (grau HPLC) (estoque 1);
- Solução de 1 - heptanosulfonato 100mM: dissolver 2,02g do reagente grau HPLC em 100 mL de água ultrapura (estoque 2);
- Ácido Acético 50mM: diluir 1,43mL de ácido acético glacial - P.A em 500mL de água ultrapura (estoque 3);
- Ácido fosfórico 500 mM: diluir 28,8 g (16,85mL) de ácido fosfórico concentrado P.A. (85%, MM 98,0g) em 500 mL de água ultrapura (estoque 4);

- Hidróxido de amônio 1N: diluir 15,51mL de hidróxido de amônio (25%) em 100mL de água ultrapura (estoque 5);
- Ácido periódico 350 mM: dissolver 7,98 g de ácido periódico dihidratado ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MM 227,94 g) em 100 mL de água ultrapura (estoque 6);
- Fosfato dipotássio 250 mM: dissolver 21,77g de K_2HPO_4 (P.A., MM 174,18) em 500 mL de água ultrapura (estoque 7);
- Hidróxido de potássio 1 N: dissolver 6,6g de KOH (85% de pureza) em 100 mL de água ultrapura (estoque 8);

**Armazenar as soluções em frascos devidamente identificados na geladeira
(4°C e 8°C) por no máximo 6 meses**

Fases Móveis

Para toxinas C1, C2, C3 e C4 – Tetrabutil amônio em tampão acetato pH 6,0

- Dissolver 2 mL (500 mM) ou 1 mL (1,0 M) de solução (**estoque 1**) em 450 mL de água ultrapura;
- Transferir a solução para um béquer de 600 mL e ajustar para pH 5,8 cuidadosamente, adicionando ácido acético 0,05 N (**estoque 3**) ou solução de hidróxido de amônio (**estoque 5**). Transferir para balão volumétrico de 500mL e completar o volume com água ultrapura.

Para goniautoxinas (GTXs) – 2 mM de heptanosulfonato em 10 mM de tampão fosfato de amônio pH 7,1

- Dissolver 10 mL das soluções (**estoques 2 e 4**) em 450 mL de água ultrapura. Transferir a solução (pH em torno de 2) para um béquer de 600 mL e ajustar o pH a 7,1 com hidróxido de amônio (**estoque 5**). Transferir para balão volumétrico de 500mL e completar o volume com água ultrapura.

Para saxitoxina, neosaxitoxina, dc-saxitoxina – 2 mM de heptanosulfonato em 30 mM de tampão fosfato de amônio pH 7,1

- Diluir 10 mL da solução (estoque 2) e 30 mL da solução (estoque 4) em 440 mL de água ultrapura. Transferir a solução para um béquer de 600 mL e ajustar o pH a 7,1 com hidróxido de amônio (estoque 5). Adicionar 25 mL de acetonitrila (concentração final de 5%). Transferir para balão volumétrico de 500mL e completar o volume com água ultrapura.

Solução Oxidante

Ácido periódico 7,0 mM em 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 9,0

- Adicionar 10 mL da solução estoque 6 e 100 mL da solução estoque 7 em 300 mL e água ultrapura. Transferir a solução para um béquer de 600 mL e ajustar o pH a 9,0 com solução estoque 8. Transferir para balão volumétrico de 500mL e completar o volume com água ultrapura;
- Transferir para frascos de vidro devidamente identificados. A solução oxidante não pode ser armazenada. Preparar no dia da análise.

Solução Acidificante

Ácido acético 500 mM

- Diluir 28,6 mL de ácido acético glacial P.A. em 971,4 mL de água ultrapura;
- Filtrar, as fases móveis, acidificante e oxidante em membrana de nylon ou de celulose regenerada de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, utilizando sistema de filtração a vácuo.

Transferir para frascos devidamente identificados e armazenar em geladeira (entre 4°C e 8°C), por no máximo 1 semana.

Procedimento para análise

1) Preparar 500 mL de fase móvel para o sub-grupo de saxitoxinas (saxitoxina/ neosaxitoxina, GTXs ou C-toxinas) que será analisado. O volume da fase móvel dependerá da quantidade de amostras que será analisado;

2) Preparar 250 mL de oxidante e acidificante. O volume a ser preparado de oxidante e acidificante deverá ser sempre a metade do volume de fase móvel;

Obs.1: Antes de iniciar o bombeamento da fase móvel, é recomendado passar pela coluna acetonitrila 25% durante 5 minutos a um fluxo de 0,8 mL/min;

3) Equilibrar a coluna com uma das fases móveis (saxitoxina/ neosaxitoxina, GTXs ou C-toxinas) com um fluxo de 0,8 mL/min. até que a linha de base esteja estável;

4) Concomitantemente com o início do bombeamento da fase móvel, iniciar o bombeamento do oxidante e acidificante com fluxo de 0,4 mL/min. cada, ajustar a temperatura do forno para 70°C, ligar a lâmpada do detector e ajustar os comprimentos de onda para 330 nm de excitação (ex) e 390 nm de emissão (em);

5) Assim que todo o equipamento estiver funcionando, é aconselhável medir a vazão do fluxo que está indo para o recipiente coletor. A vazão deverá ser de 1,6 mL/min. (0,8 + 0,4 + 0,4 mL/min.);

Obs.2: A coluna deve ficar fora do forno;

Obs.3: O tubo de teflon deve ser enrolado em forma de “8” e colocado dentro do forno (Figura 49).

Figura 49 – Detalhe do forno do sistema de HPLC mostrando o tubo de teflon enrolado na forma de “8”



Fonte: SVS/MS.

6) Sempre que iniciar uma análise, injetar os padrões contendo os análogos de saxitoxinas, os quais deverão ser unidos de acordo com cada sub-grupo. Por exemplo, os padrões de saxitoxina, neosaxitoxina e dc-saxitoxina deverão ser misturados. O mesmo procedimento deverá ser seguido para as GTXs e C-toxinas;

7) Os padrões deverão ser preparados em um solução de 50 mM de ácido acético ou conforme instruções do fornecedor;

8) Preparar uma curva de calibração com os padrões (5 a 7 pontos);

9) Como os padrões de saxitoxinas são fornecidos em concentrações variadas, os mesmos deverão ser diluídos para que fiquem com concentrações aproximadas;

- A exceção são os padrões de GTX1/4, cujo sinal é fraco, portanto sua concentração deverá ser maior, e os padrões GTX2/3, cujo sinal é alto, portanto suas concentrações deverão ser menores.

10) A concentração inicial de cada padrão poderá ser em torno de 10 µg/L, exceto para GTX1/4, cuja concentração inicial deve ser em torno de 60 µg/L. Entretanto, na prática, as concentrações poderão ser maiores ou menores, pois dependerá do limite de detecção do método;

Obs.4: Os padrões deverão ser injetados repetidamente, até que seus tempos de retenção sejam constantes;

Obs.5: É aconselhável injetar os padrões no início, durante e no final das análises, a fim de identificar possíveis variações no tempo de retenção;

Obs.6: Para maior segurança analítica, sugere-se preparar uma curva de calibração a cada dia de trabalho, porém com apenas três concentrações dos padrões;

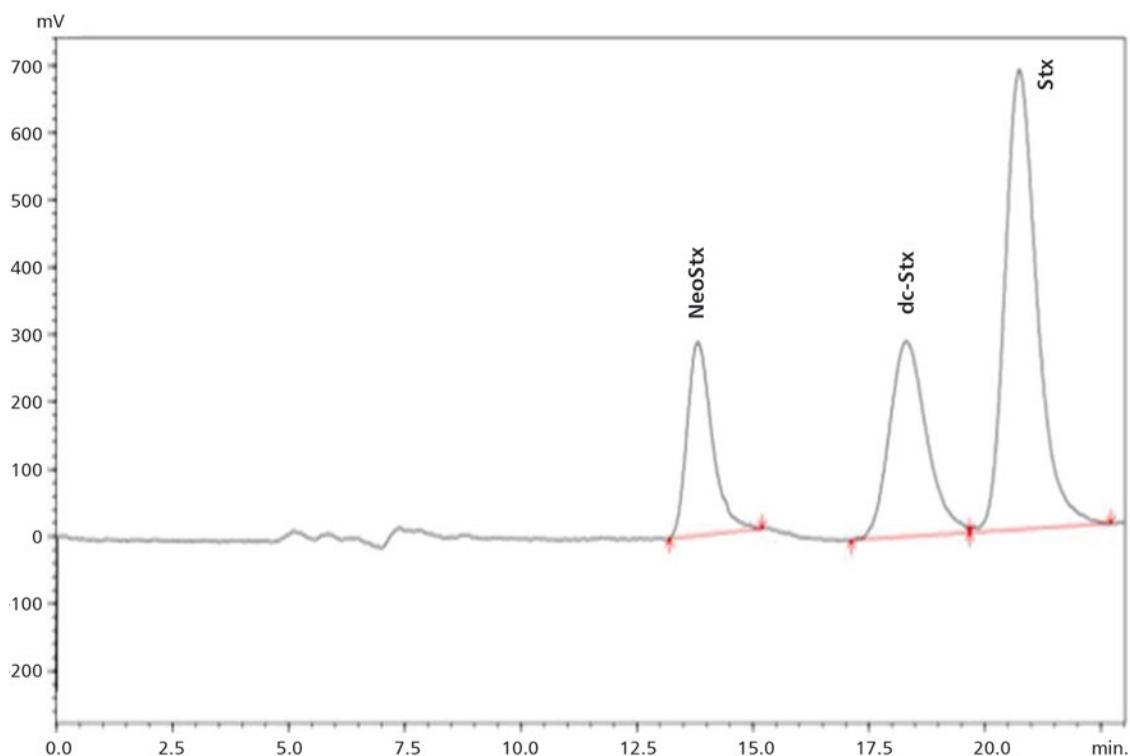
Obs.7: Ao final do trabalho, as linhas que contêm o oxidante e acidificante deverão ser lavadas com água ultrapura e a coluna lavada com acetonitrila 25% por 15 minutos;

Obs.8: Caso os sub-grupos de saxitoxinas sejam analisados num mesmo dia, antes de trocar a fase móvel, passe pela coluna acetonitrila 25% por pelo menos 10 minutos;

Obs.9: Caso os picos dos cromatogramas não fiquem bem resolvidos (separados) ou estorem a escala, a amostra pode ser diluída (10, 20, 50x) com a mesma solução utilizada para ressuspender o material resultante da extração.

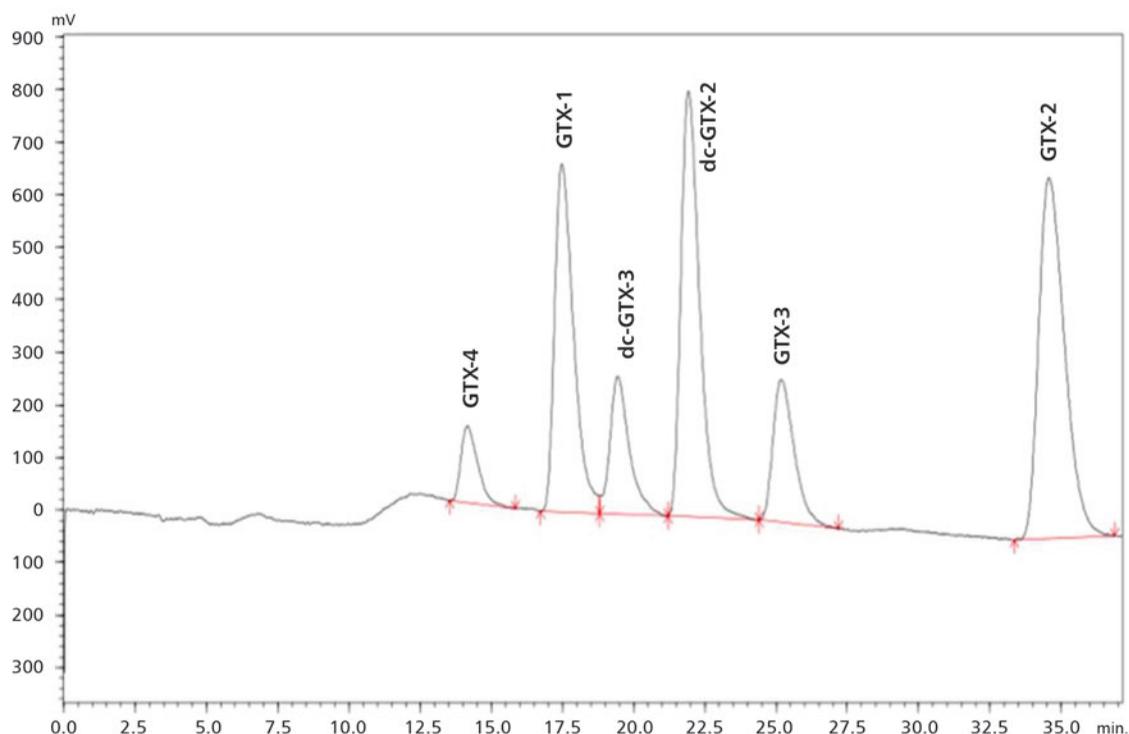
A seguir, as Figuras 50 e 51 apresentam cromatogramas da análise de análogos de saxitoxinas.

Figura 50 – Cromatograma da análise de neosaxitoxina, dc-saxitoxina e saxitoxina. As condições cromatográficas foram iguais as descritas anteriormente



Fonte: SVS/MS.

Figura 51 – Cromatograma da análise de GTXs. Condições cromatográficas foram iguais às descritas anteriormente



Fonte: SVS/MS.

II – Análise por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Como para a análise de microcistinas, o kit ELISA para saxitoxinas também pode ser utilizado, em razão de seu baixo limite de detecção, para a análise da presença daquelas toxinas na água tratada. Serão necessários os mesmos equipamentos descritos anteriormente para a análise de microcistinas.

4.2.4 Análise de Cilindrospermopsina

Extração

Dentre os métodos de extração de cilindrospermopsina e seus análogos descritos na literatura, um dos mais simples é o que utiliza água como extrator (WELKER et al., 2002). Para este caso, deve-se seguir os seguintes procedimentos:

1) Colocar os filtros contendo as células em um béquer de vidro (50 a 150 mL) com um volume de água suficiente para cobrir os filtros. Deve-se usar a menor quantidade de água possível;

- 2) Sonicar a amostra com bastão de ultrassom para garantir o rompimento das células. Alternativamente, na falta de aparelho de ultrassom, a solução poderá ser congelada e descongelada duas vezes;
- 3) Deixar o material extraído por 1 hora. Se possível, sob agitação em uma placa agitadora e um imã;
- 4) Transferir a solução para um tubo de ensaio e centrifugá-lo. O operador deverá definir a melhor condição de centrifugação, ou seja, a quantos RPM e por quanto tempo. O importante é que o solvente fique límpido e separado da fração sólida;
- 5) Transferir o solvente (sobrenadante) para um tubo de ensaio;
- 6) Suspender o material precipitado novamente com água (o mesmo volume utilizado anteriormente – passo 2) e repetir o processo de extração mais uma vez. Transferir o sobrenadante, após a centrifugação, para o tubo de ensaio. O tempo de extração nesta etapa poderá ser de 30 minutos;
- 7) A solução deverá ser centrifugada, neste caso, uma força g superior a 18.000 é recomendada, pois garantirá a precipitação do material em suspensão. A amostra, ao invés de centrifugada, poderá ser filtrada em filtro de 13 mm e porosidade de 0,22 a 0,45 μm ; O filtro deve ser compatível com solventes orgânicos e aquosos (nylon, PTFE, etc.);
- 8) A solução centrifugada ou filtrada está pronta para ser analisada por HPLC.

Obs.1: Caso o volume de água utilizado para extração tenha sido elevado, o que dilui a amostra dificultando a detecção de cilindropermopsina, a amostra (extração) poderá ser seca em evaporador rotativo, tomando o cuidado para que a temperatura dentro do balão não seja superior a 40°C. Ao final da evaporação, o balão poderá ser guardado a -18°C, até a realização da análise, a qual deve ocorrer em até 30 dias;

Obs.2: Adicionar ao balão 1 mL de metanol 50% (metanol deverá ser grau HPLC e a água ultrapura), mexer o balão de maneira que a solução ressuspensa o material seco. A solução deverá ser centrifugada ou filtrada, conforme já explicado, antes de ser analisada por HPLC.

I – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Condições e estrutura do equipamento

Para o método que será aqui descrito (WELKER et al., 2002), o equipamento de HPLC deverá ter um sistema de gradiente, detector de UV-Vis com arranjo de diodo, sistema de aquisição de dados (software), degaseificador, injetor manual com loop de 50 μL e coluna de C18 (4 x 250 mm, tamanho de partícula de 5 μ). O amostrador automático não é obrigatório, todavia otimiza o tempo de análise, uma vez que esta poderá ser realizada durante a noite.

Reagentes

Os reagentes necessários são metanol grau HPLC, ácido trifluoracético (TFA) P.A. e água ultrapura.

Procedimento de análise

1) Preparar 500 mL de solução 0,05% de TFA em metanol (250 µL de TFA mais 499,75 mL de metanol) (solução A). Água ultrapura é a solução B;

2) Programar um gradiente linear, com fluxo de 1 mL/min., como apresentado na Tabela 3):

Tabela 3 – Descrição da programação do gradiente linear para as soluções A e B]

Tempo (minutos)	0	20	24	28
Solução A%	0	50	0	0
Solução B%	100	50	100	100

Fonte: SVS/MS.

Obs.1: No tempo 0 minutos a proporção da fase móvel será de 0% da solução A e 100% da solução B. Em 20 minutos, essa proporção mudará para 50% de A e 50% de B.

3) Equilibrar a coluna com a proporção inicial de fase móvel do gradiente por uns 10 minutos;

4) Ajustar o detector de arranjo de diodo para monitorar as corridas entre 195 e 300 nm;

5) Durante a análise, injetar padrão de cilindropermopsina no início, durante e no final das análises. Este procedimento mostrará o correto funcionamento da análise e mostrará possíveis variações no tempo de retenção. As amostras só deverão ser injetadas após o tempo de retenção do padrão ter estabilizado;

6) O padrão poderá ser preparado em uma solução de metanol (grau HPLC) 50%;

7) Preparar uma curva de calibração com o padrão (5 a 7 pontos). Entretanto, as concentrações que serão utilizadas para preparar a curva dependerá do limite de detecção do método;

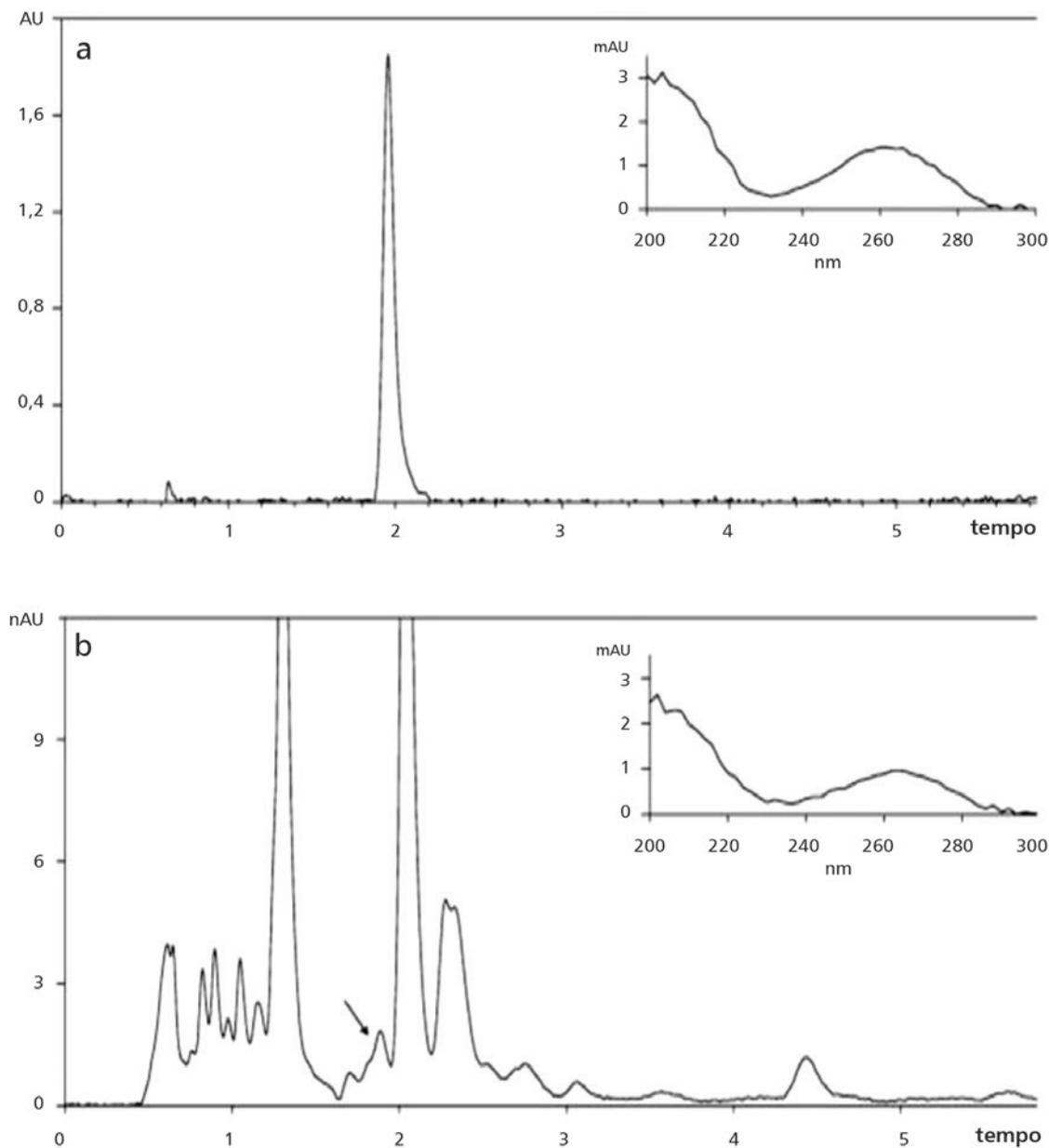
Obs.1: Para maior segurança analítica, sugere-se preparar uma curva de calibração a cada dia de trabalho, porém com apenas três concentrações do padrão;

Obs.2: O monitoramento dos cromatogramas deverá ser feito em 262 nm, que é o comprimento de absorção máxima das cilindropermopsinas;

Obs.3: Os análogos de cilindropermopsina, para os quais não existem padrões, poderão ser reconhecidos pelo seu espectro de absorção entre 200 e 300 nm (Figura 49) (Li *et al.* 2001);

Obs.4: Caso os picos dos cromatogramas não fiquem bem resolvidos (separados) ou estejam a escala, a amostra pode ser diluída (10, 20, 50x) com a mesma solução utilizada para ressuspender o material resultante da extração.

Figura 52 – Cromatogramas de padrão de cilindropermopsina (a) e de uma amostra de floração de cianobactérias produtora de cilindropermopsina-CIN (b). No detalhe, os espectros de absorção entre 190 e 300 nm dos picos



Fonte: SVS/MS.

II – Análise por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os kits ELISA para análise de cilindrospermopsina também podem ser utilizados para confirmação da presença dessa toxina na água tratada, caso sua presença seja confirmada na água do reservatório. Os equipamentos para a análise são os mesmos descritos anteriormente.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 25 jan. 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. 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. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 5 dez. 2012.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: guide to their public health consequences, monitoring and management**. London; New York: E & FN SPON, 1999.

FASTER, J.; FLIEGER, I.; NEUMANN, U. Optimised extraction of microcystins from field samples: a comparison of different solvents and procedures. **Water Research**, New York, v. 32, p. 3177-3181, 1998.

LAWTON, L. et al. Extraction and high-performance liquid-chromatographic of microcystins in raw and treated waters. **Analyst**, London, v. 119, p. 1525-1530, 1994.

LI, R. et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata*: cyanobacteria. **Journal of Phycology**, New York, v. 37, p. 1121-1126, 2001.

OSHIMA, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 78, p. 528-532, 1995.

WELKER, M.; BICKEL, H.; FASTNER, J. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin: opportunities and limits. **Water Research**, New York, v. 36, p. 4659-4663, 2002.

Glossário

Acinetos: célula vegetativa diferenciada que aumenta de tamanho, com parede espessada e conteúdo celular densamente granulado, constituindo-se em esporo de resistência.

Aérotomos: também conhecidos como vacúolos gasosos ou pseudovacúolos, são considerados vesículas gasosas que auxiliam no deslocamento ou flutuação de algumas espécies de cianobactérias ao longo da coluna d'água.

Água ultrapura: Água com baixíssimas concentrações de impurezas, sais e compostos orgânicos, cuja resistividade elétrica fica em torno de 18,2 MΩ-cm (25°C) e condutividade elétrica de 0,056 μS/cm (25°C).

Amostragem: termo que define amostra ou conjunto de amostras coletadas, de acordo com critérios estabelecidos previamente, visando uma determinada pesquisa.

Amostra viva: amostra de água sem substância fixadora.

Bainha mucilaginosa: camada de mucilagem constituída de polissacarídeos excretadas por células em algumas espécies de cianobactérias, cuja uma das funções é promover a adesão entre as células.

Bentônicos: conjunto de organismos associados com o fundo de um corpo d'água.

Células vegetativas: também designada célula somática, constitui os organismos, com exclusão das células germinativas.

Checklist: termo que designa um tipo de lista de checagem, utilizada para compensar os limites da memória e atenção humana.

Constricta: estreitamento circular observado na superfície de um filamento algal, situado entre células contíguas.

Cromatografia: método para detecção de substâncias quando estas se encontram combinadas ou misturadas, no qual o princípio é a separação e identificação dos componentes utilizando-se solventes durante duas fases analíticas, estacionária e móvel.

Cromatograma: registro gráfico de uma análise desenvolvida por método cromatográfico.

Diacríticas: característica que faz a diferença para a classificação de espécies com grande semelhança.

Dinoflagelados: organismos eucariontes (protistas) na maioria unicelulares, com algumas formas raras filamentosas, apresentam dois flagelos desiguais situados em diferentes regiões da célula (sulcos equatorial e longitudinal).

Elisa: (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) teste imunoenzimático

Escuma: também denominada de “nata” ou espuma superficial, originada pelo acúmulo de indivíduos de uma floração de cianobactérias, depositando-se geralmente nas margens sob efeito do vento dominante.

EPI: Equipamento de Proteção Individual, utilizado em laboratórios e em toda atividade na qual se faça necessário evitar riscos físicos ou por contaminação, para o analista ou funcionário.

Estigma: estrutura observada em certas algas, geralmente com coloração de azul intenso ou roxo, com função foto táctil.

Eutrófico: ambiente com alta concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, proveniente de processos naturais ou artificiais, como despejos de esgotos domésticos e/ou industriais e também pela lavagem de solos ricos em nutrientes (adubo), causando o que se conhece por eutrofização.

Fitoplanctônicos: organismos geralmente microscópicos, fotossintetizantes, que não possuem movimentos ativos capazes de vencer a ondulação da água dos ecossistemas aquáticos, permanecendo “ao sabor das ondas”, constituindo-se como produtores primários.

Flagelos: Estrutura filamentosa formada a partir do desenvolvimento de microtúbulos do centrosomo ou centríolos de algumas células. Ocorre em alguns protozoários, algumas algas e nos espermatozóides. Tem função de locomoção do organismo. São ausentes nas cianobactérias

Florações: proliferação excessiva de uma ou poucas espécies fitoplanctônicas, normalmente conferindo coloração esverdeada, amarelada ou avermelhada à água.

Formol: também conhecido por Formaldeído, é uma solução de ácido fórmico, que apresenta-se como um composto líquido claro utilizado com a finalidade de fixar as cianobactérias, durante o processo de coleta e acondicionamento das mesmas, preservando a suas características.

Frústula: parede celular das diatomáceas, constituída fundamentalmente por sílica polimerizada, formando duas metades (valvas) que se encaixam uma na outra.

Geosmina: Substância produzida por algas, cianobactérias e actinomicetos que confere gosto e odor a água com características de mofo e terra. As análises de geosmina em águas de abastecimento podem ser usadas por gestores de bacias hidrográficas e de serviços de saneamento como importante fonte de informação sobre o manancial.

Heterócito: célula vegetativa diferenciada onde ocorre a fixação de nitrogênio atmosférico. Apresenta parede menos espessa que o acineto, conteúdo celular freqüentemente verde-amarelado e possuem nódulos polares na zona de contato com as células vizinhas.

Irradiância: radiação solar, radiação magnética emitida pelo sol.

Liofilização: processo de desidratação, onde uma amostra ou substância é congelada e em seguida retira-se a água por sublimação, sem que esta passe pelo estado líquido.

Lugol acético: solução produzida basicamente por Iodo, Iodeto de Potássio e Ácido acético glacial, utilizada com a função de fixar as cianobactérias, promovendo assim a sua preservação, aumentando a sua densidade e facilitando a sedimentação das mesmas em câmaras especiais para o processo de quantificação.

Morfometria: termo muito utilizado na limnologia para designar os aspectos relacionados à forma, tamanho, volume, etc. de um ambiente aquático.

Micrômetro: unidade de medida que se constitui da milésima parte de um milímetro. Nos estudos planctônicos, é a unidade utilizada para aferir as medidas das células e dos organismos.

Marés vermelhas: proliferação ou floração de dinoflagelados que apresenta coloração com tonalidades de vermelho, caracterizada pela presença de uma variedade de pigmentos.

pH: símbolo para designar a grandeza físico-química “potencial hidrogeniônico”, que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa.

Pirenóide: é uma massa fundamentalmente protéica, incolor, que se observa no estroma dos plastos de muitas algas mais primitivas, nos mais variados grupos. Não se encontra nas formas superiores de algas.

Planctônicos: termo que define organismos que não possuem movimentos ativos de locomoção, situando-se na superfície dos corpos d'água, ali permanecendo ao sabor das ondas.

Polietileno: ou polieteno, é um dos tipos de plástico mais comum. É chamado de eteno pela IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry.

Pseudofilamentos: ramificações produzidas sem mudança no plano de divisão celular em relação ao eixo principal do tricoma.

Rafe: canal (ou fissura) ao longo do eixo longitudinal das diatomáceas Pennales.

Subaerofíticas: ambientes sub-aéreos, freqüentemente exposto ao ar e não totalmente submersos na água.

Taxon: é uma unidade taxonómica, essencialmente associada a um sistema de classificação científica.

Tricoma: fileira de células formando um filamento revestido por uma bainha.

Valvas: denominação que designa as metades que constituem a frústula (parede celular) das diatomáceas: a epivalva e a hipovalva que encaixam uma na outra lateralmente, numa zona composta por cinturas conectivas.

Variabilidade: algo sujeito a variações, inconstante, que pode assumir diferentes aspectos.

Zooplânctônicos: organismos geralmente microscópicos, não fotossintetizantes que desenvolvem o seu ciclo de vida na superfície dos corpos d'água, constituindo-se como consumidores primários do fitoplâncton.



Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
www.saude.gov.br/bvs



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Ministério da
Ciência e Tecnologia

Ministério da
Saúde

Ministério do
Meio Ambiente

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA