



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL

JACKSON BRUNO BEZERRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA EFICIENCIA DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE
MICROCISTINA INTRA E EXTRACELULAR DE MEIOS DE CULTURA DE**
Microcystis aeruginosa IN VITRO

FORTALEZA

2018

JACKSON BRUNO BEZERRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA EFICIENCIA DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE
MICROCISTINA INTRA E EXTRACELULAR DE MEIOS DE CULTURA DE
Microcystis aeruginosa IN VITRO**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. José Capelo Neto.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R369a Ribeiro, Jackson Bruno Bezerra.
Avaliação da eficiência de extração e concentração de microcistina intra e extracelular de meios de cultura de *Microcystis aeruginosa* in vitro / Jackson Bruno Bezerra Ribeiro. – 2018.
42 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Ambiental, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. José Capelo Neto.

1. Microcistina intra e extracelular. 2. Cromatografia. 3. Cartuchos. 4. Extração em fase sólida. I. Título.
CDD 628

JACKSON BRUNO BEZERRA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA EFICIENCIA DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE
MICROCISTINA INTRA E EXTRACELULAR DE MEIOS DE CULTURA DE
Microcystis aeruginosa IN VITRO**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. José Capelo Neto.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Capelo Neto - UFC (Orientador)

MsC. Marianna Correia Aragão Mileo – UFC (Co-Orientadora)

Prof. Dr. Ismael Kesley Carloto Lopes - IFCE

Aos meus pais, Carla Maciel Bezerra Pinto e
Marcelo Robson Torres Ribeiro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, que me acompanharam e me ajudaram durante todos os momentos difíceis que passei no último ano.

Aos meus pais, Carla e Marcelo, por todo apoio e a melhor educação possível.

Aos meus avôs, pelo carinho e paciência comigo durante toda minha vida.

Aos companheiros do laboratório SELAQUA, em especial, o Prof. Capelo e a Marianna por todo apoio e paciência durante a realização do presente estudo e sua construção.

Enfim, a todos que me apoiaram e torceram por mim.

“It's not the broken dreams that break us.
It's the ones we don't dare to dream.”

- Will Schuester, Glee.

RESUMO

Com o aumento das atividades antrópicas, o processo de eutrofização vem se tornando cada vez mais recorrente em corpos hídricos. Esse fenômeno causa um acúmulo de nutrientes que por sua vez tornam mais propício o aparecimento de florações de cianobactérias. Essas florações acabam por liberar na água metabólitos secundários conhecidos como cianotoxinas, como a microcistina que causam efeitos hepatotóxicos no ser humano quando ingeridas, mesmo em concentrações pequenas. Técnicas para concentração desse metabólito, como a extração em fase sólida (SPE), são usadas na identificação e quantificação de variantes de microcistina em meios onde esta encontra-se mais diluída, como em reservatórios de água para abastecimento. O presente estudo avalia a eficiência de extração e concentração de Microcistina intra e extracelular de meios de cultura de *Microcystis aeruginosa* in vitro e compara a eficiência dos cartuchos C18 e WCX, utilizados na técnica de extração em fase sólida (SPE), para a concentração de variantes de microcistina extracelular. A partir de um cultivo de *Microcystis aeruginosa* foi realizada a extração da microcistina intracelular utilizando extração a vácuo e a concentração da microcistina extracelular utilizando a técnica SPE através de cartuchos de WCX e C18. Em seguida com os extratos obtidos, foi realizada a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação das variantes obtidas. Observou-se que a MCLR é a variante mais produzida pela espécie este estudo, apresentando concentração superior no meio intracelular do que no meio extracelular. Na técnica SPE, o cartucho C18 apresentou uma boa recuperação da amostra, em torno de 109-118%, possibilitando a identificação das variantes MCLR e MCLA a partir da análise cromatográfica, enquanto o WCX não foi eficiente, pois não conseguiu reter e concentrar as variantes de microcistina identificadas com o C18. Com isso, conclui-se que esse resultado é um fator de alerta para o monitoramento de cianobactérias em reservatórios voltados para abastecimento público posto que a espécie deste estudo é potencialmente produtora de uma das variantes de microcistina mais tóxicas, a MCLR.

Palavras-chave: Microcistina intra e extracelular, Cromatografia, Cartuchos, Extração em fase sólida.

ABSTRACT

With the increase of anthropic activities, the process of eutrophication is becoming more and more recurrent in water bodies. This phenomenon causes an accumulation of nutrients that in turn make more favorable the appearance of cyanobacteria blooms. These blooms eventually release into the water secondary metabolites known as cyanotoxins, such as microcystins that cause hepatotoxic effects in humans when ingested, even in small concentrations. Techniques for concentration of this metabolite, such as solid phase extraction (SPE), are used in the identification and quantification of variants of microcystin even where it is more diluted, as in water reservoirs for supply. The present study evaluates the extraction efficiency and concentration of intra- and extracellular Microcystin of *Microcystis aeruginosa* culture media in vitro and compares the efficiency of the C18 and WCX cartridges used in the solid phase extraction (SPE) technique for the concentration of extracellular microcystin variants. A *Microcystis aeruginosa* culture was used to extract the intracellular microcystin using vacuum extraction and extracellular microcystin concentration using the SPE technique using WCX and C18 cartridges. After the extracts obtained, the analysis of Liquid Chromatography of High Efficiency (HPLC) was carried out to quantify the obtained variants. It was observed that MCLR is the most produced variant by this species in this study, presenting higher concentration in the intracellular environment than in the extracellular. In the SPE technique, the C18 cartridge showed a good recovery of the sample, around 109-118%, allowing the identification of the MCLR and MCLA variants from the chromatographic analysis, while the WCX was not efficient, since it could not retain and concentrate the microcystin variants identified with C18. Therefore, it is concluded that this result is an alert factor for the monitoring of cyanobacteria in reservoirs intended for public supply since the species of this study is potentially producing one of the most toxic variants of microcystin, MCLR.

Keywords: Intra- and extracellular microcystin, Chromatography, Cartridges, Solid phase extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microcystis aeruginosa.....	14
Figura 2 - Microcistina.....	16
Figura 3 - Etapas da SPE.....	19
Figura 4 - Cartuchos para SPE (WCX e C18).....	20
Figura 5 - Cultivo de Cianobactérias	24
Figura 6 - Manifold.....	25
Figura 7 – Cromatógrafo Líquido de Alta Performance	26
Figura 8 - Cromatograma do Padrão de MCLR.....	28
Figura 9 - Cromatograma do Padrão de MCLA.....	28
Figura 10 - Curva de Calibração MCLR.....	29
Figura 11 - Curva de Calibração MCLA.....	30
Figura 12 - Cromatograma da microcistina extracelular concentrada com C18	32
Figura 13 - Cromatograma da microcistina extracelular concentrada com WCX	33
Figura 14 - Cromatograma da microcistina intracelular extraída de amostras de cultivo.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo ASM-1.....	22
Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas.....	27
Tabela 3 - Gradiente de eluição utilizado no método.....	27
Tabela 4 - Análise de recuperação de microcistina.....	31
Tabela 5 - Valores das concentrações de microcistina intra e extracelular obtidas com as análises de extração e concentração.	34

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 <i>Microcystis aeruginosa</i>	14
3.2 Microcistina	16
3.3 Extração em Fase Sólida – SPE	18
3.3.1 Cartuchos	19
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Cultivo de Cianobactérias	22
4.2 Extração de Microcistina Intracelular	24
4.3 Concentração de Microcistina Extracelular	25
4.4 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Cromatogramas e Curvas de calibração para soluções padrão de MCLR e MCLA	28
5.2 Recuperação de amostras com cartuchos C18 e WCX	30
5.3 Análise cromatográfica de Microcistina Extracelular após ensaios de concentração de amostras de cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> in vitro usando SPE e de Microcistina Intracelular após extração de células de <i>Microcystis aeruginosa</i> de culturas in vitro	32
5.4 Análise das Concentrações de Microcistina Intra e Extracelular.	33
6. CONCLUSÃO	35
Referências	36

1.INTRODUÇÃO

Constantemente as atividades humanas prejudicam os ambientes aquáticos e os seres vivos que neles habitam. Ao despejar esgotos domésticos ou industriais acabam por provocar o desencadeamento do fenômeno conhecido como eutrofização. Esse fenômeno se trata do processo de enriquecimento dos sistemas aquáticos devido à grande quantidade de nitrogênio e fósforo que passam a estar disponíveis na água. O fenômeno da eutrofização é um grande responsável por outro fenômeno chamado de *bloom* ou floração.

A floração é definida como o aumento, em grande quantidade, das cianobactérias presentes no ambiente aquático. As cianobactérias, conhecidas também como algas azuis ou algas cianofíceas, são microrganismos procariontes, semelhantes bioquimicamente às bactérias, mas que realizam fotossíntese como as algas, se distinguindo dessas por possuírem uma cor verde azulada, associação entre um pigmento azul, a ficocianina e a clorofila. São organismos com crescimento favorecido em águas doces com pH variando entre 6 e 9 e com alta concentração de nitrogênio e fósforo. (BATISTA DO NASCIMENTO et al., 2010)

O aparecimento descontrolado de florações de cianobactérias caracteriza um sério problema ambiental e de risco a saúde pública. Além de problemas como a desoxigenação da água, as cianobactérias produzem toxinas que alteram a cor e o gosto da água, podendo acarretar em diversos problemas à saúde.

As microcistinas são as cianotoxinas mais comumente encontradas na ocorrência de florações de cianobactérias. Elas possuem características hepatotóxicas e se acumulam em organismos aquáticos de onde são transmitidas pelos níveis tróficos superiores, sendo absorvidas por peixes, pássaros e mamíferos (MARTINS; VASCONCELOS, 2009).

Tais metabólitos secundários são estáveis e possuem resistência à temperatura, hidrólise química e oxidação. De todas as variantes de microcistina, a microcistina-LR (MCLR), com leucina e arginina, é a variante mais encontrada no ambiente e a com maior toxicidade.

Um dos fatores que mais influencia na remoção da microcistina de sistemas aquáticos é conhecer em qual meio ela se encontra: intracelular ou extracelular (quando ocorre a “lise” celular). Por isso, se torna importante avaliar a quantidade total de microcistina em uma amostra, tanto as existentes no interior das células quanto as dissolvidas no meio externo.

Um dos métodos mais utilizados para a quantificação da microcistina consiste em análise cromatográfica (com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com extração em fase sólida. Para tal se torna necessário o conhecimento sobre cartuchos de extração em fase sólida, já que, atualmente, existem diversos modelos e variedades no mercado.

Diante disso, este trabalho tem como fim avaliar, quantificar e comparar a eficiência para a análise de extração de microcistina intracelular e para a concentração de amostras contaminadas com microcistina extracelular utilizando dois modelos de cartuchos para extração em fase sólida disponíveis no mercado, o C18 e o WCX.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação da eficiência de extração e concentração de microcistina intra e extracelular de meios de cultura de *Microcystis aeruginosa* in vitro.

2.2 Objetivos Específicos

Extração de Microcistina Intracelular de células de *Microcystis aeruginosa* de culturas in vitro.

Concentração de Microcistina Extracelular de culturas in vitro de *Microcystis aeruginosa*.

Comparação da eficiência de cartuchos para realização de SPE, C18 e WCX, para concentração das variantes de microcistina extracelular.

Análise cromatográfica de amostras obtidas após utilização dos cartuchos estudados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Microcystis aeruginosa*

As cianobactérias são organismos classificados como procariotos que possuem a capacidade de fixar carbono através do processo de fotossíntese. Dessa forma, se tornam parte da comunidade fitoplanctônica e, conseqüentemente, contribuem com a produtividade primária e o fluxo de energia de ecossistemas aquáticos. As cianobactérias existem em uma vasta variedade no ambiente e estão situadas nos mais diversos biótopos aquáticos. (SÁ et al., 2010).

Segundo (SVIRČEV et al., 2017), esse grupo de microrganismos são ancestrais procariontes que apareceram no ambiente há cerca de 2,3 bilhões de anos atrás e se proliferaram em todo o mundo. Em condições adequadas, as cianobactérias se acumulam em grande velocidade em lagos de água doce, estuários e em águas costeiras, onde podemos observar a ocorrência do fenômeno de eutrofização devido as atividades antropogênicas. Ainda segundo o autor, florações desses microrganismos podem causar impactos em diversos âmbitos da sociedade, seja no econômico ou no social. Isso ocorre devido aos danos causados à indústria de água potável, recreação, turismo, cultura e agricultura. Além disso, os metabólitos secundários, conhecidos como cianotóxicas, produzidos por esses seres causam impactos a saúde humana.

Com diversos gêneros no ambiente, as cianobactérias do gênero *Microcystis*, como a *Microcystis aeruginosa* (Figura 1), ganham destaque por serem as que mais causam problemas em ambientes aquáticos em grau global, devido sua alta capacidade de formação de florações e produção de toxinas (JACINAVICIUS, 2015).

Figura 1 - *Microcystis aeruginosa*



As florações de *Microcystis* são muito densas, devido à alta tolerância a elevadas intensidades luminosas, assim, acabam por dificultar o desenvolvimento de demais espécies fitoplanctônicas por sombreamento, diminuindo a competição. Outro fator interessante é que a taxa de crescimento da *Microcystis* tem relação direta com a temperatura, logo, quanto maior a temperatura maior será o crescimento das florações, tendo como temperatura ótima acima de 23°C (FERNANDES et al., 2009).

Dentre diversas espécies de cianobactérias dentro desse gênero, a *Microcystis aeruginosa* é vista com destaque dentre as formadoras de florações que ocorrem em água doce. Isto ocorre, devido essa espécie produzir uma cianotoxina conhecida por seus efeitos hepatotóxicos, chamada de microcistina. (LI et al., 2016).

De acordo com STRAUB et al. (2011) a *Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactérias mais comuns dentre as formadoras de florações em ecossistemas de água doce e pode ser encontrada bem distribuída nos cinco continentes. A autora ainda diz que o ciclo de vida anual da *Microcystis aeruginosa* é dividido em duas fases. A primeira é chamada de bentônica e nela essa espécie de cianobactéria vive de sedimentos durante as estações de inverno e primavera. Já a segunda fase, se chama planctônica e nela esse microrganismo passa a viver em colunas de água, nas quais se organizam em colônias e passam a migrar verticalmente, isso ocorre nas estações de verão e outono.

A *Microcystis aeruginosa* também possui linhagens não tóxicas, de acordo com JACINAVICIUS, (2015), as linhagens não tóxicas crescem em melhor qualidade do que as tóxicas em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes, já em ambientes com alta taxa de nutrientes o inverso se torna verdadeiro.

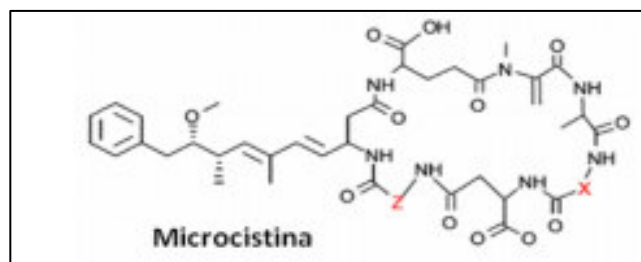
Florações de cianobactérias, como a *Microcystis aeruginosa*, apresentam características tanto ecológicas quanto econômicas e causam problemas de saúde para todos os organismos, incluindo os seres humanos, que convivem e interagem com ambientes aquáticos nos quais essas florações ocorrem ISAACS et al. (2014). As microcistinas, produzidas pela *Microcystis aeruginosa*, entram nesse contexto, já que, devido a cadeia alimentar, chegam ao seres humanos causando danos hepatotóxicos a saúde LI et al.,(2016), podendo causar o aparecimento de tumores e levar o indivíduo contaminado a óbito (ARAGÃO, 2014).

3.2 Microcistina

Segundo GUERRA et al. (2015), as microcistinas (MC) são as cianotoxinas com maior frequência de estudo e que vêm causando um número muito grande de casos relacionados com intoxicações em seres humanos em todo o mundo. A autora também define essas cianotoxinas como um heptapeptídeo monocíclico que possui em sua composição sete aminoácidos, dentre eles o ADDA – 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico que é responsável pelo funcionamento da atividade biológica.

A estrutura das microcistinas (Figura 2) é determinada como monocíclicas tendo em sua composição dois L-aminoácidos variáveis, incluindo leucina e alanina (LA), leucina e arginina (LR), tirosina e arginina (YR), tirosina e alanina (YA), tirosina e metionina (YM), e dois aminoácidos não usuais, N-metildehidroalanina (Mdha) e ácido 3-amino-metoxi-10-fenil-2,6,8- trimetildeca-4,6-dienóico (Adda) (DE CASTRO LEAL; PEREIRA SOARES, 2004).

Figura 2- Microcistina



Fonte: BORTOLI; PINTO (2015)

Dentre as mais de 80 variantes moleculares de microcistinas, seis ganham destaque: MC-LR, MC-LA, MC-YR, MC-RR, MC-LF e MC-LW, sendo MC-LR, MC-RR e MC-YR as mais predominantes e MC-LR a mais tóxica (PHAM; UTSUMI, 2018).

A microcistina tem sido a causa de envenenamento de animais agrícolas, de estimação e, inclusive, casos isolados de envenenamento humano. Estudos de epidemiologia apontam uma correlação entre a exposição crônica à essas cianotoxinas com o surgimento de câncer de fígado (OEHRLE et al., 2017). Em camundongos e ratos de laboratório, por exemplo, as microcistinas chegam a causar a morte dentro de poucas horas (DE CASTRO LEAL; PEREIRA SOARES, 2004).

O Anexo XX da PRC Nº5 de 28 de setembro de 2017 afirma que os riscos de contaminação da água para consumo humano com cianotoxinas devem ser minimizados com a realização do monitoramento de cianobactérias no ponto de captação do manancial superficial, identificando os diferentes gêneros e considerando, para efeito de alteração da frequência de monitoramento, o resultado da última amostragem. Quando a densidade de cianobactérias exceder $20000 \text{ células mL}^{-1}$, deve-se realizar análise de cianotoxinas na água do manancial, no ponto de captação, com frequência semanal. As concentrações de cianotoxinas não podem ultrapassar os valores máximos permitidos para água tratada pela legislação, para a microcistina o valor máximo não pode ultrapassar $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$.

De acordo com (JACINAVICIUS, 2015), diversos fatores podem influenciar na produção de microcistina em cianobactérias. O aumento da intensidade luminosa leva a um aumento na produção de microcistina, porém até um certo limite, quando passa a ter um efeito negativo que deve estar relacionado ao estresse celular. Já levando em consideração a temperatura, o aumento da mesma leva a resultados de maior cota celular de microcistina, porém, esse efeito varia de acordo com a variante da toxina. A autora ainda cita os efeitos do fósforo e do CO_2 , que em menores concentrações tendem a aumentar a cota celular de microcistina.

O motivo pelo qual ocorre a produção de microcistinas pelas cianobactérias ainda permanece em discussão, porém uma das explicações mais aceitas é de que a produção dessas toxinas serve de mecanismo de defesa para esses microrganismos. Porém, diversas evidências genéticas moleculares indicam que a origem das microcistinas datam desde antes da origem dos predadores naturais das cianobactérias, os zooplânctônicos, ou seja, essas toxinas podem ter tido outra função (SCHUURMANS et al., 2018).

Devido à capacidade de resistirem a altas temperaturas e de manterem a toxicidade mesmo após a fervura, métodos específicos para o suprimento de florações e tratamento de águas contaminadas têm sido alvos de estudo. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) vem sendo utilizado como ferramenta para suprir o crescimento nocivo de cianobactérias, principalmente, quando se torna necessária uma ação imediata. (SANCHES et al., 2012, SCHUURMANS et al., 2018).

GUERRA et al. (2015) relata que se tratando da remoção das cianobactérias em tratamentos convencionais é recomendado a priorização das células intactas visando reduzir as concentrações de precursores de sabor, odor e substâncias tóxicas que venham a permanecer na água tratada. Estudos já demonstraram que coagulantes, como o sulfato

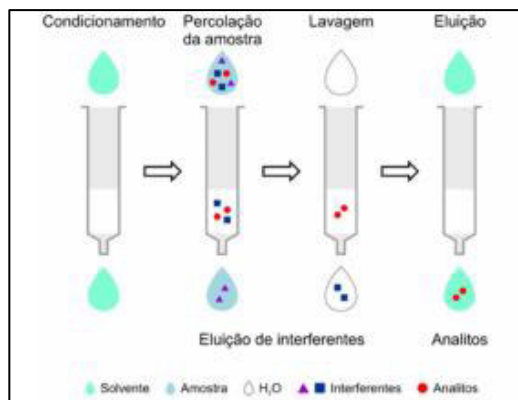
de alumínio ou cloreto férrico em conjunto com a ação mecânica de mistura rápida e da floculação não são causadores de danos em células de cianobactérias produtoras de microcistina, como a *Microcystis aeruginosa*. A autora ainda diz que em se tratando de lise celular e liberação da toxina causada por envelhecimento ou fatores ambientais, o tratamento convencional passa a não ser eficiente na remoção das toxinas já dissolvidas. Uma alternativa recomendada para esse caso é a adsorção por carvão ativado, que vem demonstrando ser eficaz nessa remoção.

Em escala laboratorial, uma das técnicas mais utilizadas para analisar cianotoxinas como a microcistina é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (SANCHES et al., 2012), para tal, se pode utilizar uma amostra de cultivo de cianobactérias posteriormente concentrada com o auxílio do método extração em fase sólida (SPE).

3.3 Extração em Fase Sólida – SPE

Segundo (ANDRADE, 2012), a extração em fase sólida (SPE) é um dos métodos de extração mais utilizados atualmente. Consiste na extração de analitos presentes em uma matriz aquosa a partir da percolação desta em um cartucho contendo um adsorvente. Porém, dentro da matriz aquosa encontram-se compostos interferentes, e na maioria das vezes, um solvente orgânico é utilizado para remover tais compostos.

Além de extrair, concentrar e pré purificar os analitos (Figura 3), a SPE faz uso de pequenos volumes de solventes e necessita de pouca manipulação da amostra, o que torna o método mais rápido para execução. Também pode-se considerar a SPE um método simples, de alta eficiência, reprodutível e com o auxílio de um sistema a vácuo, “manifold”, se torna ainda mais rápido e menos exaustivo (CAVALCANTE et al., 2007).

Figura 3 - Etapas da SPE

Fonte: (CALDAS et al., 2011)

Mesmo com diversas vantagens, a SPE possui algumas limitações, Elas se referem a etapa de dessorção ao analito retido no cartucho utilizado que necessita geralmente o uso de solventes mais específicos. (BARRIONUEVO; LAÇAS, 2001).

Já na escolha do sorvente é necessário levar em consideração as informações a respeito dos analitos de interesse, a natureza da matriz e as impurezas que se deseja eliminar. As fases sólidas mais usadas para a SPE são: 8, C18, carbono grafitizado, resina trocadora iônica e materiais poliméricos, tal como estireno divinilbenzeno, comercializados em cartuchos e disco. (CALDAS et al., 2011).

3.3.1 Cartuchos

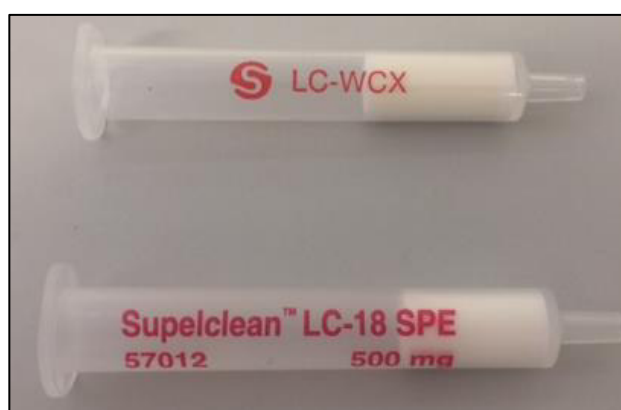
Atualmente, no mercado é possível encontrar diversos modelos de cartuchos para a realização da extração em fase sólida com diversas combinações de compostos que servem de adsorventes. Os compostos podem ser não-polares, moderadamente polares ou polares. Por exemplo, um octadecil (C18) ligado à sílica (ODS) é uma fase sólida bastante usada. Os grupos funcionais ligados à fase sólida atraem os compostos hidrofóbicos presentes na amostra por meio de interações de Van der Waals e os extraem da solução aquosa. (SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, 2006).

O cartucho C18 (Figura 4) é usado com compostos não polares à moderadamente polares, como antibióticos, barbitúricos, benzodiazepínicos, cafeína, drogas, corantes, óleos voláteis (essenciais), vitaminas lipossolúveis, fungicidas, herbicidas, pesticidas, hidrocarbonetos, parabenos, fenóis, ésteres de ftalatos, esteróides, surfactantes, teofilina e vitaminas solúveis em água. (DEAN, 2009).

Outro modelo de cartucho utilizado na extração em fase sólida é o WCX (Figura 4). O material LC-WCX SPE contém um grupo de ácido carboxílico alifático que está ligado à superfície da sílica. O grupo do ácido carboxílico é um ânion fraco e, portanto, é considerado um trocador de cátions fraco (WCX = weak cation exchanger). O grupo funcional de ácido carboxílico no LC-WCX tem um pKa de cerca de 4,8, que será carregado negativamente em soluções de pelo menos 2 unidades de pH acima deste valor e irá isolar cátions se o pH for um em que ambos fiquem carregados (DEAN, 2009).

O LC-WCX pode ser usado para isolar e recuperar cátions fortes e fracos, pois o grupo funcional ácido carboxílico na superfície da sílica pode ser neutralizado (2 unidades de pH abaixo do seu pKa) para eluir um cátion forte. Os cátions fracos também podem ser eluídos do LC-WCX com uma solução que neutraliza o cátion adsorvido (2 unidades de pH acima do pKa), ou adicionando um cátion diferente que desloca o analito (DEAN, 2009).

Figura 4 - Cartuchos para SPE (WCX e C18)



3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC

De acordo com LANÇAS (2009), a técnica de Cromatografia funciona partir da separação de componentes para sua posterior identificação, quantificação ou obtenção da substância pura. Esses componentes são distribuídos em fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária é fixa e possui uma grande área superficial enquanto a fase móvel é um fluido que passa através da fase estacionária.

Para a realização de procedimentos que objetivem a separação, identificação e quantificação de cianotoxinas é empregado o uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nesse método, diferentes fases estacionárias e móveis são usadas

dependendo das propriedades físico-químicas das amostras que se deseja analisar. Tais fases possuem a finalidade de separar os compostos da amostra, essa separação acaba resultando em cromatograma, onde são formados picos que são analisados de acordo com suas intensidades e tempos de retenção, eluição, o que possibilita a identificação do composto presente na amostra. Alguns sistemas de detecção são acoplados aos sistemas de CLAE, são eles: UV/Vis (absorbâncias em ultravioleta e visível) e PDA (arranjo fotodiodo) (BORTOLI; PINTO, 2015).

Os métodos baseados no CLAE são mais indicados para uma variedade de compostos orgânicos que apresentem a polaridade mais elevada e uma volatilidade mais baixa ou, ainda, elevada instabilidade térmica. ((DA SILVA; COLLINS, 2011).

Para a realização da quantificação de microcistinas é preciso se ter, previamente, o conhecimento da variante detectada e a realização de uma curva de calibração com seu padrão analítico. Tal padrão pode ser bastante caro e de difícil obtenção, já que deve ser importado na maioria dos casos e por possuir uma classificação de risco elevada (BORTOLI; PINTO, 2015).

Dentre as vantagens da CLAE estão o menor tempo de análise, a alta resolução, os resultados quantitativos, a boa sensibilidade, a versatilidade e a automação da técnica. Já entre as desvantagens estão o alto custo na instrumentação e operação, a falta de detector universal sensível a necessidade de experiência dos operadores (MILEO, 2014).

Se tratando da análises de microcistinas, estudos como os de CASSINI; ANTUNES; KELLER (2013) listam condições ótimas para se realizar a técnica de CLEA com essas cianotoxinas. Tais condições são: detector UV-Vis; Fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume injetado de 20,0 µL; comprimento de onda a 238 nm; temperatura ambiente, fase móvel acetonitrila/água 35-65%, com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), método isocrático.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Seção Laboratorial de Qualidade de Água (SELÁQUA) do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará.

O desenvolvimento das etapas experimentais e os equipamentos e materiais utilizados são descritos nos tópicos seguintes.

4.1 Cultivo de Cianobactérias

As amostras analisadas foram obtidas de cultivo próprio de *Microcystis aeruginosa* (MA) cultivadas no meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964) com pH 8, mantido a uma temperatura de 25°C e em um ciclo de luminosidade de 12/12h.

Para cada litro do meio de cultura ASM-1 (Tabela 1), foram utilizados 20mL de solução estoque A, 2mL de estoque solução B, 200 µl de solução estoque C e 400 µl de solução estoque D. Essas soluções foram adicionadas nessa ordem em água destilada e com um agitador magnético, teve seu pH ajustado para 8, adicionando HCl 1M ou NaOH 1M. Por fim, o meio foi autoclavado por 40 minutos, e após o resfriamento deste, as cepas de *microcystis aeruginosa* foi inoculado neste meio para promover seu crescimento.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo ASM-1.

Solução Estoque A	Peso (g)	Completar para
NaNO ₃	1,7	200 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
Solução Estoque B	Peso (g)	Completar para
K ₂ HPO ₄ ou	0,87	100 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,14	
Na ₂ .HPO ₄ .12H ₂ O ou	1,78	
Na ₂ .HPO ₄ .7H ₂ O	1,33	
Solução Estoque C	Peso (g)	Completar para

H3BO3	2,48	
MnCl2. 4 H2O	1,39	
FeCl3.6H2O	1,08	
ZnCl2	0,335	
CoCl2.6H2O	0,019	
CuCl2 ou	0,0014 ou	
CuCl2 .2H2O	0,0018	
Solução Estoque D	Peso (g)	Completar para
EDTA Na2(titriplex III)	1,86	100mL

Amostras do cultivo de *Microcystis aeruginosa* (Figura 5) foram analisadas por cromatografia líquida após 15 dias de inoculação da cepa. As amostras foram processadas antes da análise cromatográfica sendo tais processos realizados, o de extração da microcistina intracelular e concentração da microcistina extracelular a partir do filtrado obtido do processo de extração. Uma alíquota da solução padrão de concentração conhecida da variante de MCLR foi diluído para um volume maior de forma a testar a eficiência de concentração da analito em estudo através da percolação dessa solução diluída nos dois cartuchos estudados nesse trabalho.

Figura 5 - Cultivo de Cianobactérias

4.2 Extração de Microcistina Intracelular

Para a extração da microcistina intracelular foi realizado um processo de filtração a vácuo da amostra para separação das células de *Microcystis aeruginosa* do meio onde estavam inseridas. O filtro com as células retidas foi acondicionado em placa de petri e o filtrado obtido armazenado para o processo de concentração da microcistina extracelular.

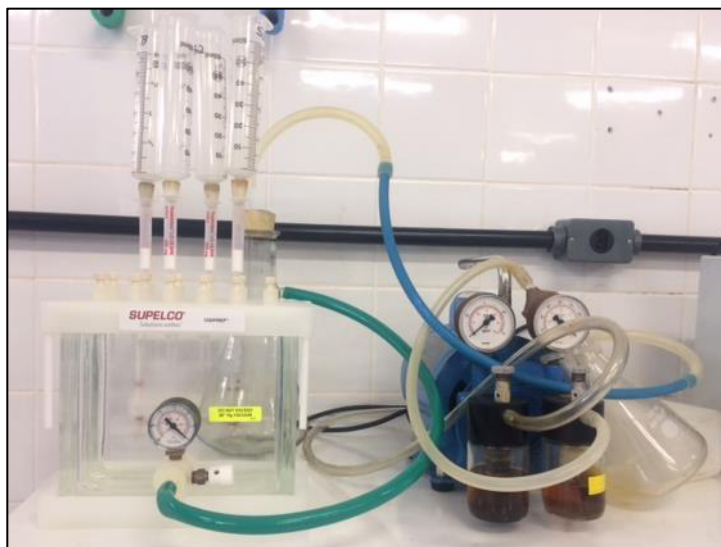
O filtro foi congelado e descongelado três vezes de forma a facilitar a ruptura da parede celular. Após essa etapa, o filtro foi submerso em 10mL de Metanol 100% durante, no mínimo, 2 horas para possibilitar a extração de todo o material intracelular incluindo o metabólito de interesse para esse estudo.

Após a extração, o líquido foi pipetado, filtrado para a remoção de particulados e armazenado em tubos de ensaio que, em seguida, foram aquecidos em um digestor a temperatura de 50°C para a cristalização da microcistina nas paredes do tubo. Esses cristais foram dissolvidos em metanol 80% e armazenado em vials para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.3 Concentração de Microcistina Extracelular

Para a concentração da microcistina extracelular foi utilizado o manifold (Figura 6) para extração em fase sólida, equipado com bomba de vácuo e válvula de controle de pressão. A amostra foi passada através dos cartuchos por gotejamento a partir de um sistema de adição de amostra (sistema aberto).

Figura 6 - Manifold



O processo de extração foi aplicado utilizando-se condicionamento sequencial com metanol (10 mL) e água (10 mL). Amostras (100 mL) foram percoladas pelo cartucho para concentração da microcistina. Após esta etapa, a lavagem do cartucho foi realizada para a remoção de outros compostos que poderiam interferir na pureza da microcistina ao final do processo. A lavagem foi executada de modo sequencial, percolando-se pelo cartucho, nessa ordem, solução de metanol 10, 20 e 30%. Por fim, o solvente foi evaporado até a secura durante, no mínimo, 5 min e após isso, a microcistina foi eluída percolando 750 μ L de solução de metanol 80% no cartucho, foi recolhida em vial para posterior análise em CLAE.

4.4 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Este estudo foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) com detector de luz visível. Na Figura 7, tem-se representado a esquematização do

sistema utilizado neste trabalho. A composição do aparato experimental é constituída pelo cromatógrafo e pelo sistema de aquisição de dados, feita através do programa LC Agilent para coleta e processamento dos dados.

Figura 7 – Cromatógrafo Líquido de Alta Performance



Foi utilizado um cromatógrafo Agilent Technologies modelo 1290 Infinity, contendo uma bomba de alimentação e quatro reservatórios para a fase móvel, um injetor automático, uma coluna de fase reversa e um detector de luz visível (DAD). Os eluentes utilizados foram: Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,05% em água (A) e Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,05% em Acetonitrilia (B).

As condições cromatográficas, adaptadas de Lawton (1994), estão descritas na Tabela 2. O Gradiente de eluição da fase móvel está descrito na Tabela 3.

Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas

Parâmetros	Detalhamento
Injetor de Amostra	50µL
Fase Móvel	A – 0,05% TFA em Água
	B – 0,05% TFA em Acetonitrila
Fluxo	0,5 mL/min
Desgaseificador	Presente no sistema HPLC
Coluna	Fase Reversa, C18
Temperatura da Coluna	40 °C
Detecção	DAD (238 e 222 nm)
Pressão Máxima	600 bar

Tabela 3- Gradiente de eluição utilizado no método

Tempo (min)	A – 0,05% TFA em Água	B – 0,05% TFA em Acetonitrila
0	70	30
10	65	35
25	30	70
26	0	100
27	0	100
28	70	30
30	70	30

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de análise foram utilizados para ambos os cartuchos, C-18 e WCX. Portanto, os resultados de cada um serão analisados nas próximas seções.

5.1 Cromatogramas e Curvas de calibração para soluções padrão de MCLR e MCLA

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 8 e Figura 9, obtidos a partir da injeção dos padrões de MCLR e MCLA, observa-se que a estas variantes eluíram no tempo de retenção de 4,83 e 16,05 min, respectivamente.

CASSINI; ANTUNES; KELLER (2013) obtiveram cromatogramas com picos de MCLR eluindo em tempos menores que MCLA, 25,7 min e 29,7 min, respectivamente. Diferentes especificações de coluna, vazão menor e tempo de corrida maiores podem explicar os tempos de eluição obtidos serem diferentes do presente trabalho (TR: 4,8 min para MCLR e TR: 16,05 min para MCLA).

Figura 8 - Cromatograma do Padrão de MCLR

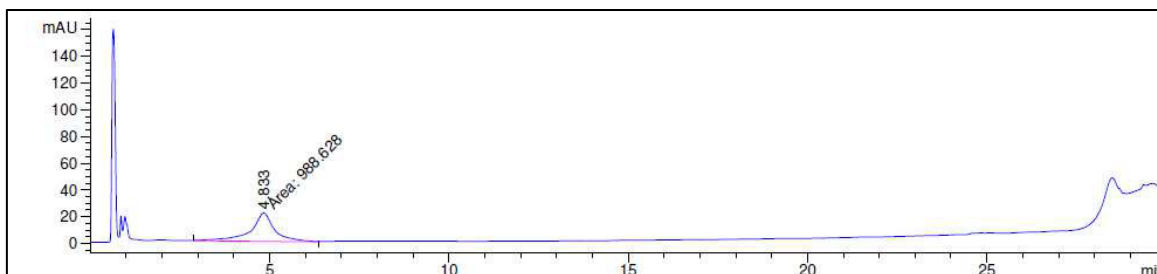
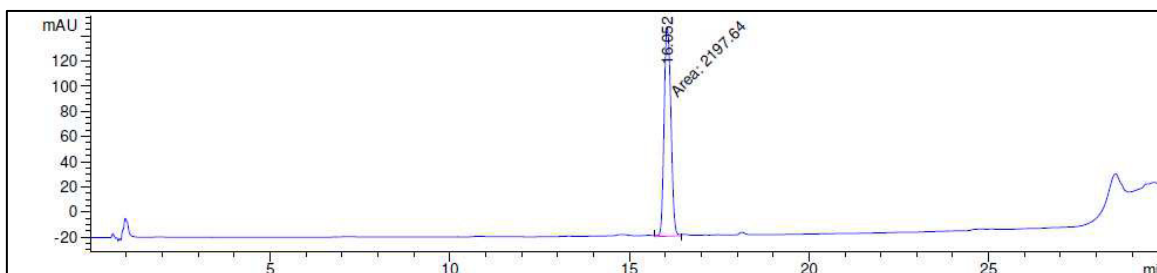
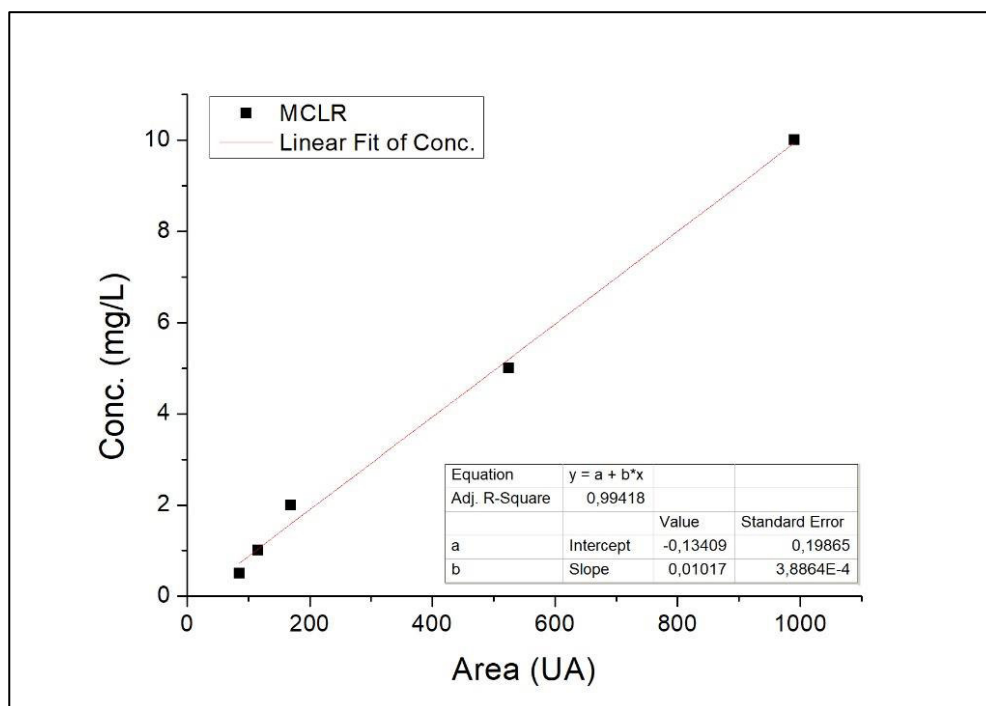


Figura 9 - Cromatograma do Padrão de MCLA

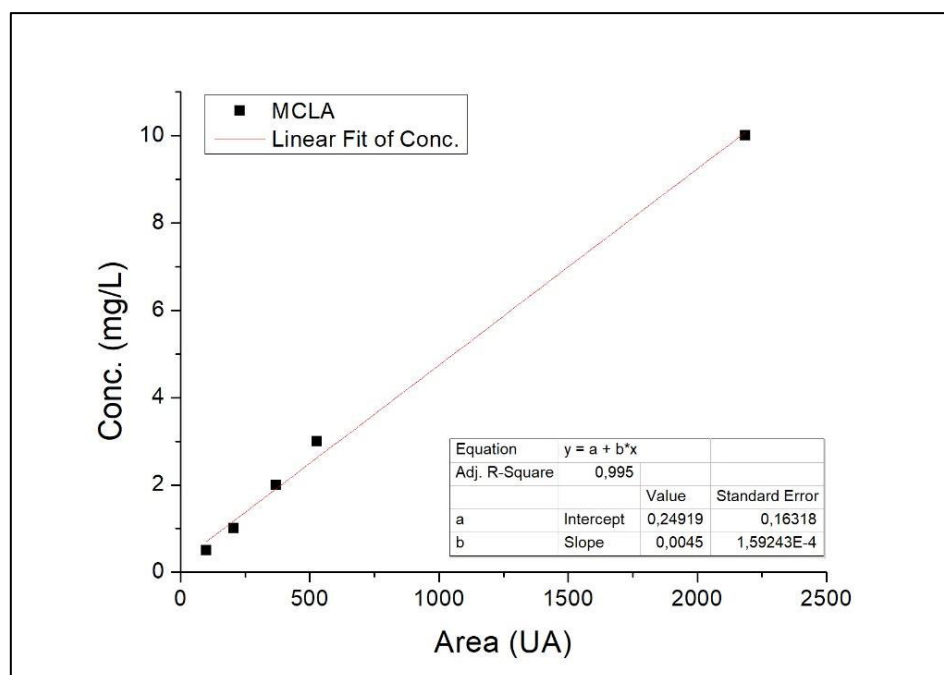


As concentrações para a curva de calibração variaram para a MCLR de 0,5 à 10 mg.L⁻¹. Na Figura 10, pode-se verificar a linearidade da MCLR com coeficientes de correlação (r^2) acima de 0,99, indicando que as áreas dos picos são proporcionais às concentrações respectivas, conforme exigido pela **RDC nº166/2017 da Anvisa**.

Figura 10 - Curva de Calibração MCLR



O mesmo range de concentrações da curva de calibração da MCLR foi utilizado para a curva de calibração da MCLA nas mesmas condições de análise. Na Figura 11, pode-se verificar a linearidade da MCLA com coeficientes de correlação acima de 0,99 e os picos proporcionais às respectivas concentrações.

Figura 11 - Curva de Calibração MCLA

MACHADO (2008) também elaborou uma curva de calibração para MCLR. A linearidade foi obtida também através da curva de calibração com cinco níveis de concentração: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,5 mg.L⁻¹ e coeficiente de correlação $r^2 > 0,99$. EM et al. (2012) também obteve um bom coeficiente de correlação ao realizar uma curva de calibração para MCLA e MCLR. Ele obteve valores do coeficiente de correlação acima de 0,99.

Comparando os coeficientes de correlação de MACHADO (2008) e EM et al. (2012) com os obtidos neste estudo para MCLR e MCLA, percebe-se que as curvas de calibração obtidas para essas duas variantes de microcistina são adequadas para a determinação destas variantes em amostras desconhecidas.

5.2 Recuperação de amostras com cartuchos C18 e WCX

Com os resultados dos cromatogramas obtidos foi realizado análises de recuperação de microcistina a partir da concentração das soluções diluídas do padrão das variantes analisadas. Os valores encontrados referentes ao cartucho C-18 em duplicata encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise de recuperação de microcistina

Amostra	Concentração (mg/L)		Volume (mL)	Recuperação (%)
	Teórico	Experimental	Experimental	
1	11,90	13,00	0,63	109
2	12,71	15,00	0,59	118

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Os valores para recuperação da amostra, obtidos a partir da Equação 01, foram 109% e 118%, respectivamente para as duplicatas 1 e 2. ZASTEPA (2014) mostrou uma recuperação similar ao que ocorreu no presente trabalho. Ele obteve uma recuperação em torno dos 87%. Isto mostra que o cartucho C-18 é eficiente para a concentração de amostras diluídas de microcistina. Isto pode ser aplicado para análises de amostras ambientais, onde mesmo em pequenas concentrações, a microcistina pode ser concentrada e detectada posteriormente por cromatografia líquida. De acordo com a **RDC nº166/2017 da Anvisa**, porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, devem variar entre 70-120%.

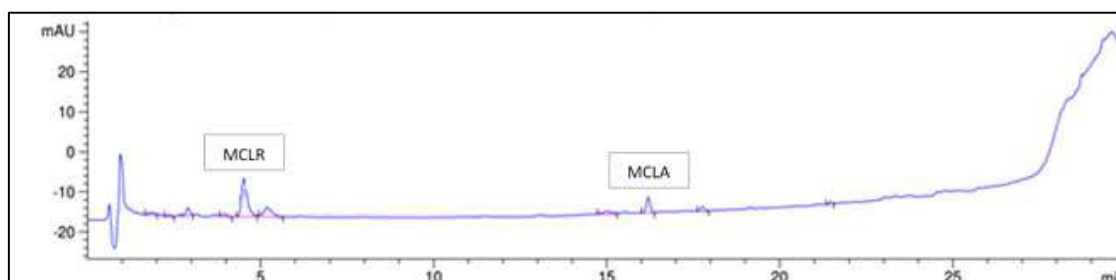
O mesmo procedimento foi realizado com o cartucho WCX, porém como o mesmo não mostrou nenhuma evidencia de MCLR ou MCLA nos cromatogramas obtidos, isto nos leva a crer que este cartucho não é adequado para a concentração de variantes de microstina.

De acordo com AGUIAR JÚNIOR et al. (2018) o sorvente mais utilizado como fase sólida na SPE é octadecilsilano (C-18) ligado quimicamente sobre sílica. Essa escolha se deve a seletividade adequada para os contaminantes de origem orgânica, eficiência na remoção de analitos presentes em amostras de matriz aquosa e sua grande diversidade comercial.

5.3 Análise cromatográfica de Microcistina Extracelular após ensaios de concentração de amostras de cultivo de *Microcystis aeruginosa* in vitro usando SPE e de Microcistina Intracelular após extração de células de *Microcystis aeruginosa* de culturas in vitro.

O cromatograma da Figura 12 foi obtido após a concentração da Microcistina extracelular de amostras de cultivo com o Cartucho C-18. A análise cromatográfica das amostras, obtidas após a percolação destas pelo cartucho, mostrou que a eluição da variantes ocorreu no tempo de retenção semelhante ao tempo de retenção obtido no cromatograma dos padrões, 4,5 min para MCLR e 16,2 min para MCLA, ordem de eluição já era esperada como também obtido por LAWTON; EDWARDS; CODD (1994).

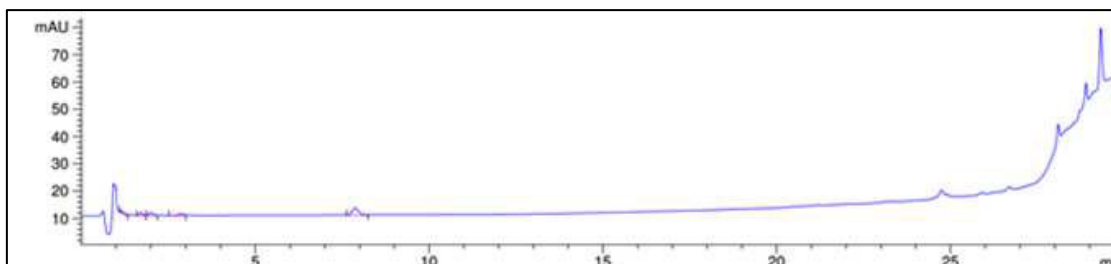
Figura 12 - Cromatograma da microcistina extracelular concentrada com C18



Trabalhos como o de ZASTEPA (2014) também corrobora com a ordem de eluição das variantes de microcistina. Em seus experimentos, a variante MCLR eluiu antes da variante MCLA.

De forma análoga ao processo com o cartucho C18, utilizou-se o cartucho WCX para a concentração de microcistina nas amostras de cultivo (Figura 13). Após a análise cromatográfica da amostra concentrada, observou-se que o cromatograma obtido não apresentou nenhum traço de variantes de microcistina. Isto deve-se a maior afinidade do WCX com matrizes orgânicas DEAN (2009), não conseguindo reter compostos em matriz aquosa.

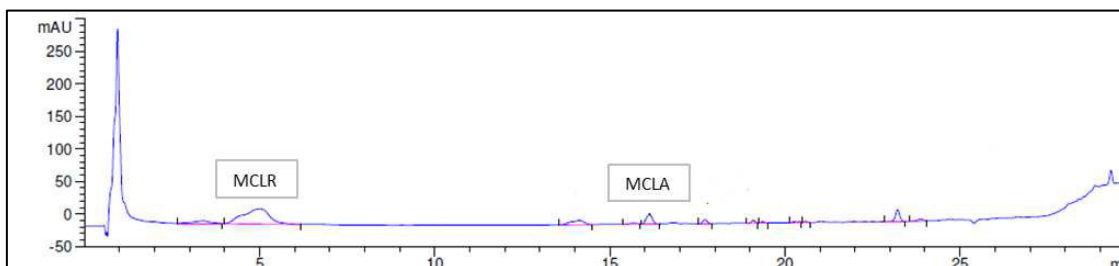
Figura 13 - Cromatograma da microcistina extracelular concentrada com WCX



Ao contrário do WCX, o cartucho C18 possui uma boa eficiência na remoção de interferentes apolares, além de uma seletividade adequada para os contaminantes orgânicos e eficiência no processo de remoção de analitos de amostras de água (CABRERA et al., 2012 e AGUIAR JÚNIOR et al., 2018).

O cromatograma da Figura 14 foi obtido após a extração da Microcistina intracelular de amostras de cultivo, utilizando o cartucho C-18.

Figura 14 - Cromatograma da microcistina intracelular extraída de amostras de cultivo



Como se pode observar, o cromatograma obtido se apresentou com o mesmo padrão presente nos cromatogramas das soluções padrão das variantes. A ordem de eluição permaneceu a mesma, com a MCLR eluindo em tempo menor que a MCLA.

5.4 Análise das Concentrações de Microcistina Intra e Extracelular.

Como se pode observar Tabela 5, referente ao cartucho C-18, se tratando do meio extra celular foram obtidos valores de concentrações para cada variante muito próximos nas duplicatas analisadas. Com a concentração de MCLA sendo quase o dobro do valor obtido para MCLR. No caso do meio intracelular, se obteve o contrário, a concentração de MCLR se torna muito maior que a de MCLA. Além disso, as concentrações de ambas as variantes no meio intracelular também são mais elevadas que no meio extracelular.

Tabela 5 - Valores das concentrações de microcistina intra e extracelular obtidas com as análises de extração e concentração.

Microcystis aeruginosa	Variante Microcistina	Concentração Amostra 1 (mg/L)	Concentração Amostra 2 (mg/L)	Média Concentração (mg/L)
Extracelular	MCLR	0,190	0,180	0,185
	MCLA	0,400	0,390	0,395
Intracelular	MCLR	11,370	12,870	12,120
	MCLA	0,990	1,060	1,025

Os maiores valores de concentração de microcistina intracelular podem ser explicados pela fase de crescimento em que a amostra de cultivo pode estar. No experimentos de ARAÚJO (2012), a concentração de microcistina intracelular se manteve maior que a concentração de microcistina extracelular durante a fase estacionária de crescimento, tal fato se tornaria contrário caso ocorresse uma lise celular devido a fatores mecânicos aplicados ao experimento.

A grande diferença de concentração das variantes no meio intracelular é considerada normal, de acordo com MATTHIENSEN; YUNES; CODD (1999) a variante que mais se destaca é a MCLR (com leucina e arginina como os aminoácidos variáveis).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que os métodos empregados para a extração de microcistina intracelular e concentração de microcistina extracelular são eficientes para obtenção deste metabólito a partir de amostras de *Microcystis aeruginosa* cultivadas in vitro. Para 21 dias de crescimento obteve-se 12,120 mg/L de MCLR e 1,025 mg/L de MCLA no meio intracelular e 0,185 mg/L de MCLR e 0,395 mg/L de MCLA no meio extracelular.

Conclui-se que, sem que haja a “lise celular”, a liberação natural dessas toxinas para o meio extracelular é pequena. No entanto, esse resultado é um fator de alerta para o monitoramento de cianobactérias em reservatórios voltados para abastecimento público posto que essa espécie é potencialmente produtora de uma das variantes de microcistina mais tóxicas, a MCLR.

Comparando-se os dois cartuchos WCX e C18 quanto a concentração de microcistina verificou-se que o cartucho C18 apresentou uma recuperação da amostra de 109 e 118% e possibilitou a identificação e quantificação das variantes de microcistina presentes na cultura. O cartucho WCX não possibilitou a identificação de variantes de microcistina pois não conseguiu reter e concentrar essas variantes do meio extracelular.

Conclui-se que o cartucho C18 é mais eficiente em estudos envolvendo concentração de microcistina em amostras de cultivo in vitro e amostras ambientais, já que este cartucho apresenta maior afinidade com este metabólito.

Referências

AGUIAR JÚNIOR, C. A. S. et al. Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 641–647, 28 mar. 2018.

ANDRADE, F. M. **Determinação de cianotoxinas em amostras de florações de cianobactérias coletadas em pesque-pagues e pisciculturas situadas na região do Alto Mogi**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

ARAGÃO, M. H. S. Aplicação Do Processo Fenton Na Remoção De Microcistina-Lr Para Água Destinada a Abastecimento Aplicação Do Processo Fenton Na Remoção De Microcistina-Lr Para Água Destinada a Abastecimento. **Universidade Estadual da Paraíba**, p. 45, 2014.

ARAÚJO, M. K. C. DE. **Produção E Liberação De Microcistinas Em Ritmo**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

BARRIONUEVO, W.; LAÇAS, F. Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001.

BATISTA DO NASCIMENTO, P. et al. Cianobactérias como indicadores de poluição nos mananciais abastecedores do Sistema Cantareira. 2010.

BRASIL. PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde.

BORTOLI, S.; PINTO, E. Cianotoxinas: Características Gerais, Histórico, Legislação E Métodos De Análises. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, p. 163–164, 2015.

CABRERA, L. DA C. et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227–240, 2012.

CALDAS, S. S. et al. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1208–1213, 2013.

CAVALCANTE, R. M. et al. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 560–564, 2007.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of High Performance Liquid Chromatography For The Study of Emerging Organic Pollutants. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

DE CASTRO LEAL, A.; PEREIRA SOARES, M. D. C. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 84–89, 2004.

DEAN, J. R. **Solid Phase Extraction**.

EM, P. D. E. P. et al. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO ULTRAVIOLETA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA EM *Microcystis aeruginosa* Kützing NPLJ-4 ULTRAVIOLETA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA EM *Microcystis aeruginosa* Kützing NPLJ-4**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

FERNANDES, V. D. O. et al. Ecologia De Cianobactérias: Fatores Promotores E Conseqüências Das Florações. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 02, p. 247–258, 2009.

GUERRA, A. DE B. et al. Remoção de microcistina-LR de águas eutrofizadas por

clarificação e filtração seguidas de adsorção em carvão ativado granular. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 4, p. 603–612, 2015.

ISAACS, J. D. et al. Microcystins and two new micropeptin cyanopeptides produced by unprecedented *Microcystis aeruginosa* blooms in North Carolina's Cape Fear River. **Harmful Algae**, v. 31, p. 82–86, 2014.

JACINAVICIUS, F. Aspectos Morfológicos, Fisiológicos e bioquímicos e suas relações com produção de microcistinas em cepas de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). p. 329, 2015.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. **The Analyst**, n. August, p. 1525–1530, 1994.

LI, J. et al. Growth inhibition and oxidative damage of *Microcystis aeruginosa* induced by crude extract of *Sagittaria trifolia* tubers. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 43, p. 40–47, 2016.

MACHADO, A. F. **Ozonização no tratamento da água para remoção de microcistina-Lr e validação do método de análise por lc-ms / ms porto alegre microcistina-Lr e validação do método de análise por Porto Alegre Agosto , 2008**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2008.

MARTINS, J. C.; VASCONCELOS, V. M. Microcystin dynamics in aquatic organisms. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 1, p. 65–82, 2009.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 361–376, 1999.

MILEO, M. C. A. **Saxitoxinas gtx 2,3, dcgtx 2,3 e c 1,2 em água de abastecimento público: estabilidade e validação de método analítico.** [s.l.] Universidade Federal do Ceara, 2014.

OEHRLE, S. et al. Toxin composition of the 2016 *Microcystis aeruginosa* bloom in the St. Lucie Estuary, Florida. **Toxicon**, v. 138, p. 169–172, 2017.

PHAM, T. L.; UTSUMI, M. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. **Journal of Environmental Management**, v. 213, p. 520–529, 2018.

SÁ, L. L. C. DE et al. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do Rio Tapajós, no Município de Santarém (Pará, Brasil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 281–285, mar. 2010.

SANCHES, S. M. et al. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 181–187, 2012.

SCHUURMANS, J. M. et al. Microcystin interferes with defense against high oxidative stress in harmful cyanobacteria. **Harmful Algae**, v. 78, n. July, p. 47–55, 2018.

STRAUB, C. et al. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

SVIRČEV, Z. et al. **Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins** *Archives of Toxicology*, 2017.

ZASTEPA, A. Fate and persistence of microcystin congeners in lakes and lake sediments. 2014.