

Comparação entre LABicELISA e *kit* ELISA comercial para análise de microcistinas em águas


Comparison between LABicELISA and commercial ELISA kit for microcystins analysis in water


• **Data de entrada:**
23/08/2017


• **Data de aprovação:**
07/08/2018

Cássia Reika Takabayashi Yamashita^{1*} | Emília Kiyomi Kuroda¹ | Josemarque Lima da Rosa¹ | Ken-Ichi Harada² | Osamu Kawamura³ | Elisa Yoko Hirooka¹ | DOI: <https://doi.org/10.36659/dae.2020.028>


ORCID ID


Yamashita CRT  <https://orcid.org/0000-0002-4821-1961>

Kuroda EK  <https://orcid.org/0000-0001-8678-5619>

Rosa JL  <https://orcid.org/0000-0002-3612-7957>

Harada KI  <https://orcid.org/0000-0001-5501-4811>

Kawamura O  <https://orcid.org/0000-0003-2957-2638>

Hirooka EY  <https://orcid.org/0000-0003-0481-1188>

Resumo

Os potenciais riscos associados à exposição às microcistinas (MCs) requerem o desenvolvimento de pesquisas voltadas para métodos de análise visando ao monitoramento eficiente e rápido de águas. O trabalho avaliou a aplicação dos imunoenaios ELISA desenvolvido em laboratório (LABicELISA) e o comercial (*kit* ELISA) para detecção de MCs em águas (n=22). O LABicELISA demonstrou ser mais sensível que o *kit* ELISA, apresentando limite de quantificação de 0,05 e 0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados demonstraram que ambos os imunoenaios foram eficientes para detecção e análise de MCs em diferentes tipos de água (sintéticas, de mananciais destinados ao abastecimento e de reservatórios), com coeficiente de correlação de 0,997 e forte correlação na exatidão e precisão. O emprego do LABicELISA proporcionou análise com custo aproximado e reduzido de 100 vezes em relação ao do *kit* ELISA, podendo assim, aplicar em larga escala de abrangência para monitoramento de mananciais superficiais no país.

Palavras-chave: Imunoensaio. Cianotoxinas. Anticorpo. Custo.

Abstract

The risks associated with exposure to microcystins (MCs) result in monitoring and research development focused on efficient and rapid methods. This study aimed to evaluate enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA developed in lab (LABicELISA) and commercial ELISA (*kit* ELISA) for MCs detection in waters (n=22). LABicELISA data showed to be more sensitive than *kit* ELISA, with limit of quantification of 0.05 and 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The results demonstrated that both, LABicELISA and *kit* ELISA, were efficient for detection and analysis of MCs in different water types (artificial contamination, water supply and reservoirs), with correlation coefficient of 0.997 and they showed accuracy and precision with strong correlation. LABicELISA provided a cost-effective analysis with reduced cost of approximate 100-folds in relation to *kit* ELISA, thus LABicELISA indicates perspective of large-scale application and for the monitoring of surface water sources.

Keywords: Immunoassay. Cyanotoxin. Antibody. Cost.

¹ Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Londrina - Paraná - Brasil.

² School of Environmental and Human Sciences and Faculty of Pharmacy, Meijo University - Nagoya - Aichi - Japão.

³ Faculty of Agriculture, Kagawa University - Miki-cho - Kagawa - Japão.

* **Autor correspondente:** cassiarty@gmail.com.

1 INTRODUÇÃO

A detecção de linhagens de cianobactérias tóxicas em florações de águas foi relatada em várias partes do mundo (AZEVEDO et al., 2002; CARMICHAEL, 1995), com ocorrência de morte de animais após o consumo de água contendo elevada densidade de cianobactérias ($> 10^6$ cél.mL⁻¹) (WHO, 2003). Em 1996, mais de 50 mortes foram causadas por contaminação por cianotoxinas no sistema de tratamento de água da clínica de hemodiálise em Caruaru-PE. Na ocasião, microcistinas - MCs foram detectadas em soro e tecido do fígado de pacientes (AZEVEDO et al., 2002; IARC, 2010), porém seus efeitos propagaram-se por muito tempo após o ocorrido. As MCs são metabólitos secundários tóxicos produzidos por cianobactérias pertencentes a diversos gêneros tais como *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* e *Microcystis* (CARMICHAEL, 1995; LUUKKAINEN et al., 1993).

A MC-LR (lisina-arginina) é a toxina mais amplamente estudada, sendo frequentemente presente em floração de cianobactérias toxigênicas em rios e lagos (FIGUEIREDO et al., 2004; IARC, 2010). A Organização Mundial de Saúde estabeleceu um valor de referência provisório para MC-LR em água potável de 1 µg.L⁻¹, com base em uma dose diária tolerável de 0,04 mg.kg⁻¹ de peso corporal (WHO, 2003), e a legislação brasileira limitou para 1,0 µg.L⁻¹ de MCs totais calculado pelo somatório das concentrações de todas as variantes incluindo as frações intra e extracelular (BRASIL, 2017). A MC-LR é classificada no grupo 2B, sendo possivelmente cancerígena para os seres humanos (IARC, 2010).

A detecção/análise de MCs pode ser realizada utilizando método físico-químico como cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de UV, de arranjo de fotodiodo ou de espectrometria de massa. Além destes, podem ser utilizados testes colorimétricos de inibição de fosfatase,

bioensaios e métodos imunológicos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Atualmente, preconiza-se o uso de protocolos simples e econômicos associados a métodos analíticos rápidos, sensíveis, específicos, confiáveis e precisos nas análises. As principais vantagens do imunoensaio ELISA para detecção/análise de MCs consistem em especificidade na detecção, devido à seletividade de ligação anticorpo-antígeno, rapidez, simplicidade e adaptabilidade. A reação é realizada numa microplaca com capacidade de análise simultânea para dezenas de amostras. Além disso, a maioria dos protocolos dispensa a limpeza prévia da amostra e o uso de solventes orgânicos tóxicos (utilizados nos métodos químicos) e requer apenas a extração das toxinas intracelulares, quando necessária, e filtração antes da análise (LAWTON et al., 2010; LINDNER et al., 2004; LONG et al., 2009).

Na Tabela 1 é apresentada uma compilação de publicações sobre desenvolvimento de imunoensaio ELISA para detecção de MCs, assim como de kits comerciais disponíveis no mercado internacional. O sucesso da implementação dos ELISAs depende do formato de análise (competitivo direto, indireto e sanduíche) e do anticorpo (Ac) empregado (mono e policlonal). O ELISA competitivo direto consiste na competição entre o antígeno (Ag) da amostra e o Ag conjugado com enzima, pelo Ac imobilizado na microplaca; já o competitivo indireto baseia-se na competição entre Ag da amostra e Ag imobilizado na microplaca pelo Ac adicionado, sendo acrescido um anti-Ac conjugado com enzima para reação colorimétrica. O sanduíche envolve a detecção do Ag empregando dois Acs, sendo que o Ag fica entre os mesmos como um recheio de sanduíche.

A diferença entre Ac monoclonal (AcM) e policlonal (AcP) está nas células produtoras do Ac, em que AcM é produzido pelo cultivo celular de um único linfócito B imortalizado, gerando Ac es-

pecífico contra o Ag; já o AcP provém de vários linfócitos B produtores de Acs que se ligam ao Ag em várias posições, resultando em Acs não espe-

cíficos (ABBAS, 2012). Em geral, o imunoenensaio ELISA sanduíche (NAGATA et al., 1999) e o emprego de AcM resultam em maior sensibilidade.

Tabela 1 – Imunoensaios ELISA para análise de MCs reportados e kit comercial ELISA

Imunoensaio ELISA reportado			
Modalidade	Anticorpo (linhagem)	LD/LQ	Referência
c-ELISA	Monoclonal (MC-159)	0,01 ng mL ⁻¹	Khreich et al. (2009)
comp. inh-ELISA	Policlonal (soro)	10 ng mL ⁻¹	Baier et al. (2000)
dc-ELISA	Monoclonal (MC10E7)	0,006 ng mL ⁻¹	Zeck et al. (2001)a
	Monoclonal (AD4G2)	0,07 ng mL ⁻¹	Zeck et al. (2001)b
	Monoclonal (M8H5)	0,05 ng mL ⁻¹	Weller et al. (2001)
	Monoclonal	0,03 ng mL ⁻¹	Pyo, Lee e Choi (2005)
	Policlonal	0,02 ng mL ⁻¹	Yu et al. (2002)
	Policlonal	0,12 ng mL ⁻¹	Sheng et al. (2006)
	Policlonal	0,06 ng mL ⁻¹	Mhadhbi et al. (2006)
ic-ELISA	IgY (anticorpo oriundos de ovos de galinhas)	0,09 ng mL ⁻¹	McDermott, Feola e Plude (1995)
	Monoclonal (M8H5)	0,02 ng mL ⁻¹	Nagata et al. (1997)
	Monoclonal (MC8C10)	0,1 ng mL ⁻¹	Sheng, He e Shi (2007)
ELISA sanduíche (anti-imunocomplexo)	Monoclonal (contra imunocomplexo anticorpo-antígeno, 3F7)	0,002 ng mL ⁻¹	Metcalfe, Bell e Codd (2000)
Kit ELISA comercial			
Modalidade	Anticorpo	LD/LQ	Kit/Empresa ^o
dc-ELISA	Policlonal	0,15 ng mL ⁻¹	1
	Policlonal	0,147 ng mL ⁻¹ ** 0,03 ng mL ⁻¹ ***	2
	Monoclonal (AD4G2)	0,09 ng mL ⁻¹	3
ic-ELISA	Monoclonal	0,1 ng mL ⁻¹	4
	Monoclonal (M8H5)	0,05 ng mL ⁻¹	5

LD: limite de detecção

c-ELISA: ELISA competitivo

comp. inh-ELISA: ELISA competitivo de inibição

dc-ELISA: ELISA competitivo direto

ic-ELISA: ELISA competitivo indireto

* Kit/Empresa 1: Microcystin Plate Kit - Beacon Analytical Systems Inc., EUA; 2: QuantiPlate Kit for microcystins - Envirologix, EUA; 3: Microcystins-DM ELISA (Microtiter Plate) - Abraxis, EUA; 4: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, China; 5: Microcystin ELISA kit - Tokiwa Chemical Industries, Ltd., Japão

** Protocolo padrão do kit ELISA

*** Protocolo com aumento de sensibilidade.

Apesar de o ELISA direto ser mais simples por empregar menos etapas e conseqüentemente ser mais rápido, requer a utilização de antígeno conjugado à enzima com elevado custo de preparo/aquisição. A modalidade sanduíche, por sua vez, necessita do uso de anticorpo adicional anti-MCs, incrementando o custo de análise.

Em relação à especificidade do anticorpo, o policlonal apresenta, em geral, maior reatividade cruzada contra outros análogos de MCs, além de reatividade inespecífica com outros analitos.

Sheng et al. (2006) empregou AcP para detecção de MCs que apresentaram reatividade cruzada com MC-LR, -LF, -LW, -RR, -YR e nodularina variando de 50 a 122%. Nagata et al. (1995) utilizaram AcM anti-MC-LR, o M8H5 e este apresentou reatividade cruzada principalmente com MC-RR. Sheng, He e Shi (2007) desenvolveram ELISA utilizando AcM com alta especificidade para detecção de MC-LR e baixa reatividade cruzada para MC-RR e MC-YR (até 12%), MC-LF e LW (abaixo de 10-4%) e nodularina (0,1%).

Assim, dentre as diferentes concepções de imunoensaio ELISA, o competitivo indireto com emprego de anticorpo monoclonal (AcM) constitui uma opção técnica e financeira mais acessível e específica para análise de MCs.

Uma das dificuldades na análise de MCs em países em desenvolvimento, como o Brasil, é a aquisição, operação e manutenção de instrumentos sofisticados de alto custo como sistemas cromatográficos, bem como o uso de *kits* de imunoensaio importados, resultando também em custos elevados na análise. Sendo assim, uma das alternativas seria empregar imunoensaio ELISA desenvolvido a partir da produção ilimitada de AcM específico oriundo de hibridoma com menor custo de análise (HIROOKA et al., 2015; KHREICH et al., 2009; PYO, LEE e CHOI, 2005; SHENG et al., 2006).

O objetivo do trabalho foi avaliar comparativamente a eficiência e aplicação do imunoensaio competitivo indireto com emprego de anticorpo monoclonal (AcM) desenvolvido em laboratório, denominado LABicELISA e do imunoensaio ELISA comercial, *kit* ELISA importado, para análise de MCs em diferentes tipos de águas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise de Microcistinas por imunoensaios

LABicELISA é um ELISA competitivo indireto que empregou AcM anti-MC-LR produzido *in vitro* pela linhagem de hibridoma MC.5-3, com reatividade cruzada de 146% para MC-RR e 88% para MC-YR (HIROOKA et al., 2015; TABUCHI et al., 2015). O LABicELISA foi realizado seguindo o protocolo descrito por Nagata et al. (1997) com adaptações. As microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL de MC-LR-BSA (0,1 µg.mL⁻¹, tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6) e incubadas a 4° C por 18 h. Após 3 lavagens com PBST (tampão fosfato salina 0,1M pH 7,4 (PBS) com 0,05% Tween 20), os poços foram

bloqueados com 200 µL solução de 0,5% de gelatina em PBS e incubadas por 1 h a 25° C. Depois da etapa de lavagem com PBST, adicionou-se 50 µL de padrões MC-LR ou amostra, seguida de 50 µL de AcM anti-MC-LR (18,1 ng.mL⁻¹ em PBS). Após incubação a 25° C por 1 h e lavagens com PBST, adicionou-se 50 µL de Ac secundário conjugado com enzima peroxidase (IgG anti-*mouse*-HPR diluído, 1:5000 em PBST) e incubou-se a 25° C por 1 h. Posteriormente à lavagem dos poços, 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB (0,1 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5 com 0,5% de H₂O₂) foram adicionados e finalmente a reação enzimática foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M e a absorvância lida em 450 nm. As análises foram realizadas em triplicatas.

Os resultados foram expressos como porcentagem de ligação, % Ligação = (B1/B0) x 100, em que B1 corresponde à média de absorvância do padrão ou amostra e B0, à média de absorvância na ausência de MC-LR. A concentração de MC-LR foi calculada pela curva padrão, plotando o valor de % Ligação contra valor de log da concentração de MC-LR.

No LABicELISA, os parâmetros de exatidão e precisão foram avaliados contaminando artificialmente água ultrapura, água proveniente de lago e de rio para abastecimento em 4 concentrações (0,2; 0,4; 1 e 5 µg.L⁻¹) e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com ANVISA (2003) e INMETRO (2010).

As análises pelo *kit* comercial ELISA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Beacon, USA). O anticorpo empregado neste *kit* apresenta reatividade cruzada principalmente para MC-RR (73%), MC-YR (58%) e nodularina (126%). Resumidamente, 50 µL de conjugado enzimático seguido de 50 µL de curva padrão ou amostra e 50 µL de solução de anticorpo foram pipetados nos poços e incubados a 25° C por 30

min. Após limpeza com solução de lavagem do *kit*, 100 µL de substrato foi adicionado em cada poço e incubado a 25° C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 100 µL de HCl 1N e a absorvância lida em 450 nm.

2.2 Amostras

As amostras foram provenientes de águas sintéticas preparadas com água de rio e adição de extrato de MCs produzida pela linhagem de *Microcytis* sp. TAC 95 (Tsukuba Algal Collection, Tsukuba, Japão), assim como de reservatórios do rio Tietê que apresentaram floração de cianobactéria (Barra Bonita, SP – março/2006 e Promissão, SP – março/2006), do lago Tsukui, Japão (agosto/2007) e de mananciais destinados ao abastecimento do Estado do Paraná (5 locais).

As amostras oriundas dos reservatórios do rio Tietê e lago Tsukui foram liofilizadas e armazenadas a -30 °C. A preparação das amostras para análise de MCs totais foi realizada com ressuspensão em água ultrapura na concentração de 1 g.L⁻¹ de liofilizado, seguida de 3 séries de congelamento-descongelamento, para promover a lise celular com liberação das MC e filtração em membrana de fibra de vidro (porosidade 1,2 µm).

Para as águas de mananciais, foram preparadas amostras para análise de MCs totais de acordo com procedimento descrito acima e extracelulares somente com filtração em membrana de fibra de vidro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exatidão e a precisão foram avaliadas para alguns tipos de água por meio de teste de recuperação em 4 níveis de contaminação (0,2; 0,4; 1

e 5 µg.L⁻¹), resultando em valores médios de recuperação (R) e coeficiente de variação (CV) de: R=93% e CV=7% para água ultrapura; R=102% e CV=6% para água de abastecimento e R=91% e CV=9% para água de lago. A curva padrão do LABicELISA apresentou coeficiente de determinação de 0,996, com faixa de trabalho variando de 0,03 a 0,5 µg.L⁻¹, LD e LQ calculados de 0,02 e de 0,05 µg.L⁻¹, respectivamente. A curva padrão do *kit* ELISA apresentou coeficiente de determinação de 0,992, com faixa de trabalho variando de 0,1 a 2,0 µg.L⁻¹, LD e LQ calculados de 0,04 e de 0,12 µg.L⁻¹ (valor de LQ próximo ao do informado pelo fabricante de 0,15 µg.L⁻¹), respectivamente. O *kit* comercial utiliza o imunoensaio ELISA competitivo direto com AcP, sendo um método mais rápido, mas com menor sensibilidade, uma vez que o LABicELISA (competitivo indireto com AcM) demonstrou ser mais sensível, com LQ 2,5 vezes menor (0,05 µg.L⁻¹ para LABicELISA e 0,12 µg.L⁻¹ para *kit* ELISA).

Os resultados de MCs das amostras de águas artificial/naturalmente contaminadas são apresentados na Tabela 2, e os de mananciais destinados ao abastecimento, na Tabela 3.

Em amostras de águas sintéticas contaminadas artificialmente com extrato de MCs produzida pela linhagem *Microcytis* sp. TAC 95, os valores de MCs por LABicELISA variaram de não detectado (nd) a 8,7 µg.L⁻¹ e por *kit* ELISA de nd a 10,7 µg.L⁻¹, apresentando razão entre os valores analisados por LABicELISA/*kit* ELISA de 0,8 a 1,2 (Tabela 2).

Em amostras de águas preparadas com liofilizados de reservatórios com eventos de floração de cianobactérias, foram observados valores bem superiores, que variaram entre 99,2 e 1.519,3 µg.L⁻¹ de MCs por LABicELISA e de 89,0 a 1.495,6 µg.L⁻¹ pelo *kit* ELISA, com razão de 0,8 a 1,1 (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de MCs analisadas por LABicELISA e kit ELISA em amostras de água artificial/naturalmente contaminadas.

Contaminação	Amostra / Local	MCs ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Razão (LABicELISA / kit ELISA)
		LABicELISA	kit ELISA	
Artificial	Água sintética 1	nd	nd	-
	Água sintética 2	8,7	7,5	1,2
	Água sintética 3	8,1	10,7	0,8
	Água sintética 4	6,5	8,3	0,8
Natural	Promissão - coleta 1	99,2	89,0	1,1
	Promissão - coleta 2	195,2	237,6	0,8
	Barra Bonita - coleta 1	709,5	736,0	1,0
	Barra Bonita - coleta 2	234,0	288,2	0,8

nd: não detectado;
- : não realizado.

Tabela 3 - Valores de MCs extracelulares e totais analisadas por LABicELISA e kit ELISA em amostras de águas de mananciais destinados ao abastecimento.

Amostra	LABicELISA			kit ELISA			Razão ^a
	MCs Extracelular ^b	MCs Totais ^c	MCs Totais ^d	MCs Extracelular ^b	MCs Totais ^c	MCs Totais ^d	
Manancial 1	nd	32,3	24,2	nd	29,7	23,8	1,1 / 1,0
Manancial 2	nd	3,3	-	nd	3,8	-	0,9
Manancial 3	nd	nd	-	nd	nd	-	-
Manancial 4	nd	nd	-	nd	nd	-	-
Manancial 5	nd	nd	-	nd	nd	-	-

^a Valor da razão entre os dois imunossaios (LABicELISA/ kit ELISA)

^b Procedimento de filtração em membrana de vidro com porosidade de 1,2 μm ;

^c Procedimento de congelamento-descongelamento (3x) antes da filtração em membrana de vidro com porosidade de 1,2 μm ;

^d No procedimento de congelamento-descongelamento foi acrescentado etapa de ultrassonicação;

MCs: microcistinas; MCs Extracelulares: MCs liberadas pelas cianobactérias viáveis MCs Totais: soma de MCs intra e extracelulares; nd: não detectado; - : não realizado.

Nas amostras de água para abastecimento do Estado do Paraná foram analisadas MCs extracelulares, assim como a soma de MCs intra e extracelulares (totais). A comparação dos resultados apresentou razão LABicELISA/kit ELISA de 0,9 a 1,1, com valores de 3,3 a 32,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs por LABicELISA e 3,4 a 29,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pelo kit ELISA (Tabela 3). Não foram detectadas MCs extracelulares para todas as amostras, sendo que as amostras denominadas abastecimento 1 e 2 foram positivas para MCs totais (intra e extracelulares), indicando que as MCs detectadas foram de origem intracelular.

De forma geral, comparando-se os dois métodos de análise, pode-se observar que para todas as amostras analisadas não houve ocorrência de falso positivo/negativo entre os resultados e

apresentaram razão entre os valores analisados por LABicELISA/kit ELISA de 0,8 a 1,2.

Triantis et al. (2010) analisaram MCs em três tipos de água (água ultrapura, água de torneira e água superficial) empregando dois kits comerciais ELISA que apresentavam limite de detecção de 0,147 e 0,087 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores observaram recuperação média de 73 a 93% para um imunossai e recuperação de 133 a 189% para o segundo imunossai.

O uso do AcM como bioferramenta proporcionou a análise com baixo custo e elevada sensibilidade de detecção, o que possibilita a aplicação do método em larga escala de abrangência e uso promissor para monitoramento de mananciais superficiais.

Já foi relatado emprego de imunoenensaio ELISA desenvolvido no laboratório para monitoramento de MCs em águas brasileiras. Hirooka et al. (1999) realizaram detecção de MC em águas da região do Paraná, utilizando ic-ELISA desenvolvido. Os autores observaram valores positivos em amostra de águas superficiais de planta de tratamento de água em Santa Terezinha do Iguaçu ($6,63 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR) e amostras de praia artificial de São Miguel de Iguaçu ($6,38$ e $10,00 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR). Também analisaram amostras do Lago Igapó, Londrina; do Rio Tibagi e da Represa de Piraquara; apesar de demonstrarem resultados positivos para a contagem de cianobactérias *Microcystis* sp., MC-LR não foi detectado. Kamogae et al. (2002), empregando o mesmo ic-ELISA, analisaram 13 amostras de água próxima da margem da captação de água para o tratamento de potabilidade em Santa Terezinha de Itaipu. MC foi detectado em 92% das amostras, variando valores entre $<0,05$ e $0,60 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Outros autores empregaram ELISA comercial; Vieira et al. (2005) aplicaram ELISA comercial para análise de MCs em águas superficiais do reservatório de Utinga, Belém-PA e em amostras de água após as estações de tratamento. Nas águas superficiais, as MCs foram detectadas em níveis de nd a $1,25 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto as MCs não foram detectadas em amostras de água tratada. Fonseca et al. (2010) avaliaram corpos de águas da cidade de São José do Rio Preto-SP e região que eram favoráveis à presença de cianobactérias. Foi observada presença de MCs em 72%

das amostras com concentração média entre nd e $3,18 \mu\text{g.L}^{-1}$. Barros et al. (2010) relataram contaminação por MCs em águas dos sistemas de produção aquícola da cidade de Jaboticabal-SP. MC-LR foi detectado em 30% das amostras, com uma variação de nd a $3,30 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração de MC-LR foi relacionada à alta contagem de cianobactérias.

Também foi avaliado o processamento dessas amostras com ciclos de congelamento-descongelamento com e sem ultrassonicação (15 min, 20 kHz) visando à lise celular e consequente liberação de MCs intracelulares. Contrariando a recomendação de utilizar a etapa de ultrassonicação para potencializar a liberação de MCs intracelulares (JOYCE, WU e MASON, 2010; SRI-SUKSOMWONG et al., 2011; WU, JOYCE e MASON, 2012; ZHANG et al., 2006), não foram constatadas diferenças na concentração de MCs totais.

O estudo comparativo realizado com 22 amostras de água de diversas origens/processamento e a correlação dos resultados positivos dos dois métodos empregados são apresentados na Fig. 1. O coeficiente de correlação foi de 0,997, demonstrando uma forte correlação entre os métodos e estatisticamente, tanto pelo teste t ($t_{\text{tab}}=2,08$, $t_{\text{cal}}=1,28$) como pelo cálculo da razão entre as variâncias dos métodos (1,00) e comparação com valor de F de Snedecor a 5% ($F_{\text{tab}}=2,10$), os dois métodos não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$); sendo aplicáveis para detecção de MCs em águas.

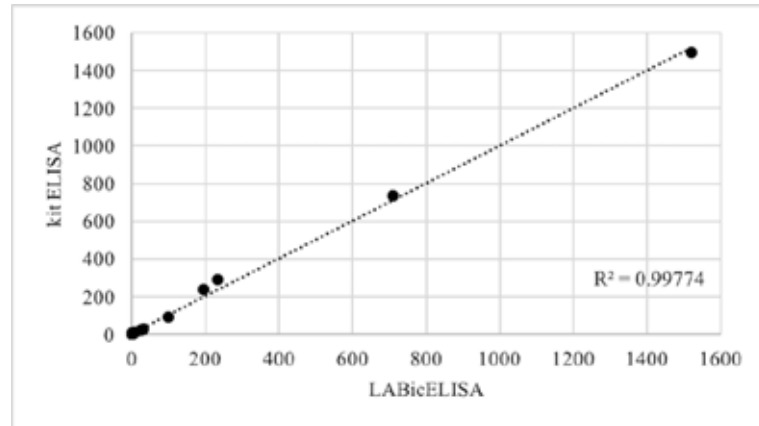


Figura 1: Curva de correlação entre as concentrações das amostras ($\mu\text{g.L}^{-1}$) analisadas por LABicELISA e *kit* ELISA (n=22).

Para a análise por LABicELISA utilizou-se, além de equipamentos, microplacas de 96 poços, soluções de tampões, H_2SO_4 , gelatina, padrão de MC-LR, conjugado MC-LR-BSA, AcM anti-MC-LR, Ac secundário conjugado com enzima peroxidase e substrato cromógeno TMB, sendo que o material que mais influenciou no custo foi a microplaca, seguido de Ac secundário, correspondendo a aproximadamente 65% do custo total de materiais utilizados. O custo de análise por LABicELISA totalizou o valor aproximado de R\$ 20,00 por microplaca, visto que o próprio laboratório produziu o AcM de alta especificidade e afinidade. Esse valor é bem inferior ao do *kit* ELISA, representando um fator de redução aproximado de 100 vezes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O LABicELISA demonstrou ser um método de detecção/análise de MCs com elevada exatidão e precisão e forte correlação com o *kit* comercial ELISA, podendo ser aplicado em vários tipos de água.

O uso do AcM como bioferramenta proporcionou a análise com baixo custo e elevada sensibilidade de detecção, o que possibilita a aplicação do método em larga escala de abrangência e uso promissor para monitoramento de mananciais superficiais.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio por meio da bolsa de pós-doutorado (PNPD) e à Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) pela cooperação técnica.

6 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Conceitualização, Takabayashi-Yamashita CR, Kuroda EK, Harada K-I, Kawamura O e Hirooka EY; **Metodologia,** Takabayashi-Yamashita CR e Rosa JL **Redação – Primeira versão,** Takabayashi-Yamashita CR; **Redação – Revisão & Edição,** Takabayashi-Yamashita CR, Kuroda EK e Hirooka EY; **Aquisição de Financiamento,** Kuroda EK e Hirooka EY; **Recursos,** Kuroda EK, Kawamura O e Hirooka EY; **Supervisão,** Kuroda EK, Kawamura O e Hirooka EY.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular.** 7 ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2012, 560p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2003. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Poder Executivo, Brasília, DF, n. 104, 02 jun. 2003. Seção 1, p.56-9.

- AZEVEDO, S. M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RI-NEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- BAIER, W.; M. LOLEIT, M.; FISCHER, B.; JUNG, G.; NEUMANN, U.; WEIB, M.; WECKESSER, J.; HOFFMANN, P.; BESSLER, W.G.; MITTENBÜHLER, K. Generation of antibodies directed against the low- immunogenic peptide-toxins microcystin-LR/RR and nodularin. **International Journal of Immunopharmacology**, v.22, p. 339-53, 2000.
- BARROS, L.S.; DE SOUZA, F.C.; TAVARES, L.H.; AMARAL, L.A. Microcystin-LR in Brazilian aquaculture production systems. **Water Environment Research**, v. 82, n. 3, p. 240-248, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria de consolidação nº 5, de 03 de outubro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- CARMICHAEL, W.W. Toxic Microcystis and the Environment. In: WATANABE, M.; HARADA, K-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Eds.). **Toxic Microcystis**. Nova York, E.U.A.: CRC Press. 1995, p. 1-11.
- FIGUEIREDO, A.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F. J.M.; PEREIRA, M.J. Microcystin-producing blooms - a serious global public health issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 151-163, 2004.
- FONSECA, F.S.; RUVIERI, V.; ONAKA, E.M.; LISBOA SANTANA, R.; SCORSARAVA, M.A.; SABINO, M. Influência de fatores climatológicos na ocorrência de microcistina. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 461-466, 2010.
- HIROOKA, E.Y.; PINOTTI, M.H.P.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. **Natural Toxins**, v. 7, p. 103-109, 1999.
- HIROOKA, E. Y. et al. Safety and quality in agricultural product chain in Brazil. In: EISSA, A.A. (Ed.) **Food Production and Industry**, Rijeka, Croatia: InTech, 2015, p. 137-65.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008 **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Revisão: 03 - fev/2010.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans; v. 94: Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins**. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, 2010.
- JOYCE, E.M.; WU, X.; MASON, T.J. Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions. **Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, v. 45, n. 7, p. 863-866, 2010.
- KAMOGAE, M.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; AYMOTO, N. M.; OKADA, E. K.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Monitoramento de microcistinas em água para consumo humano na região de Itaipu, Paraná-Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 109-116, 2002.
- KHREICH, N.; LAMOURETTE, P.; RENARD, P-Y.; CLAVE, G.; FENAILLE, F.; CREMINON, C.; VOLLAND, H. A highly sensitive competitive enzyme immunoassay of broad specificity quantifying microcystins and nodularins in water samples. **Toxicon**, v. 53, p. 551-559, 2009.
- LAWTON, H.C.; EDWARDS, C.; NWAOPARA, A.A.; HEALY, M. Rapid detection of microcystins in cells and water. **Toxicon**, v.55, p.973-978, 2010.
- LINDNER, P.; RAMONA MOLZ, R.; YACOB-GEORGE, E.; DÜRKOP, A.; WOLF, H. Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. **Analytica Chimica Acta**, v. 521, p. 37-44, 2004.
- LONG, F.; SHI, H.C.; HE, M.; SHENG, J.W.; WANG, J.F. Sensitive and rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for microcystin-LR in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 123-127, 2009.
- LUUKKAINEN, R.; SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; FARDIG, M.; RI-NEHART, K.L.; NIEMELA, S.I. Isolation and Identification of Eight Microcystins from Thirteen Oscillatoria agardhii Strains and Structure of a New Microcystin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2204-2209, 1993.
- MCDERMOTT, C.M.; FEOLA, R.; PLUDE, J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1433-1442, 1995.
- METCALF, J.S, BELL, S.G, CODD, G.A, Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. **Water Research**, v. 34, p. 2761-2769, 2000.
- MHADHBI, H.; BEN-REJEB, S.; CLEROUX, C.; MARTEL, A.; DELAHAUT, P. Generation and characterization of polyclonal antibodies against microcystins—Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection. **Talanta**, v. 70, p. 225-235, 2006.
- NAGATA, S.; SOUTOME, H.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; SEKIJIMA, M.; SUGAMATA, M.; HARADA, K-I.; SUGANUMA, M.; UENO, Y. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. **Natural Toxins**, v. 3, n. 2, p. 78-86, 1995.
- NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Enzyme immunoassay for direct determination of microcystin in environmental water. **Journal of Association Official Analyst Chemistry International**, v. 80, p. 408-417, 1997.
- NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin

- and an anti-microcystin monoclonal antibody. **Natural Toxins**, v. 7, p. 49-55, 1999.
- PYO, D.; LEE, J.; CHOI, E. Trace analysis of microcystins in water using enzyme-linked immunosorbent assay. **Microchemical Journal**, v. 80, p. 165-169, 2005.
- SHENG, J-W.; HE, M.; SHI, H-C.; QIAN, Y. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 309-315, 2006.
- SHENG, J-W.; HE, M.; SHI, H-C. A highly specific immunoassay for microcystin-LR detection based on a monoclonal antibody. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, p. 111-118, 2007.
- SRISUKSOMWONG, P.; WHANGCHAI, N.; YAGITA, Y.; OKADA, K.; PEERAPORNPIPAL, Y.; NOMURA, N. Effects of Ultrasonic Irradiation on Degradation of Microcystin in Fish Ponds. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 13, n. 1, p. 67-70, 2011.
- TABUCHI Y., TAKABAYASHI-YAMASHITA C.R., MIGUEL T.A., ISHIKAWA NK, MACIEL L.F., HARADA K-I, HIROOKA E.Y., KAWAMURA O. Generation of Monoclonal Antibodies Producing Hybridomas for Detection of Microcystins in Environmental Water by ic-ELISA. In: International Conference on the Water Crisis in the Asia-Pacific Region; 12 February 2015; Kagawa, Japan **Anais... Japan**, 2015.
- TRIANSTIS T., TSIMELI K., KALOUDIS T., THANASSOULIAS N., LYTRAS E. & HISKIA A. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. **Toxicon**, v. 55, p. 979-989, 2010.
- VIEIRA, J.M.S.; AZEVEDO, M.T.P.; AZEVEDO, S.M.F.O.; HONDA, R.Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 45, p. 901-909, 2005.
- WELLER, M.G.; ZECK, A.; EIKENBERG, A.; NAGATA, S.; UENO, Y.; NIESSNER, R. Development of a direct competitive microcystin immunoassay of board specificity. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 1445-1448, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2003, 14 p.
- WU, X.; JOYCE, E.M.; MASON, T.J. Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies. **Water Research**, v. 46, n. 9, p. 2851-2858, 2012.
- YU, F-Y; LIU, B-H.; CHOU, H-N.; CHU, F.S. Development of a Sensitive ELISA for the Determination of Microcystins in Algae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4176-4182, 2002.
- ZECK, A.; EIKENBERG, A.; WELLER, W.G.; NIESSNER, R. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. **Analytica Chimica Acta**, v. 44, p. 11-13, 2001a.
- ZECK, A.; WELLER, M.G.; BURSILLB, D.; NIESSNER, R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. **Analyst**, v. 126, p. 2002-2007, 2001b.
- ZHANG, G.; ZHANG, P.; WANG, B.; LIU, H. Ultrasonic frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa*. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 13, n. 5, p. 446-450, 2006.