

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA FÍSICA, QUÍMICA E  
GEOLÓGICA**

FABIANE BRETANHA GUTIERREZ

**OTIMIZAÇÃO DO TESTE LAL PARA ANÁLISE DE LPS DE  
*MICROCYSTIS* EM CULTURA E DA REGIÃO ESTUARINA DA LAGOA DOS  
PATOS E PRAIA ADJACENTE**

RIO GRANDE  
AGOSTO DE 2007

FABIANE BRETANHA GUTIERREZ

IMPLEMENTAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO TESTE LAL PARA ANÁLISE DE LPS  
DE CIANOBACTÉRIAS EM CULTURA E DA REGIÃO ESTUARINA DA LAGOA DOS  
PATOS E PRAIA ADJACENTE

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós - Graduação em Oceanografia  
Física, Química e Geológica da  
Fundação Universidade do Rio  
Grande como requisito para  
obtenção do título de mestre em  
Oceanografia Física, Química e  
Geológica

ORIENTADOR: DR. ALEXANDRE MATTHIENSEN  
CO-ORIENTADOR: DR. JOÃOSARKIS YUNES

RIO GRANDE  
AGOSTO DE 2007

## AGRADECIMENTOS

Á Deus por de formas diferentes mostrar sua generosidade e iluminar o meu caminho.

Á minha família que esteve presente em todas as etapas da minha caminhada acadêmica.

Aos meus fiéis companheiros, Fred e Isadora, pela compreensão, carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Matthiensen pela acolhida e sua dedicação incansável.

Ao Prof. Dr. João Sarkis Yunes pela dedicação e empenho para concretização do trabalho.

Aos colegas da Unidade de Pesquisa de Cianobactérias (Gilmar, Sabrina, Wilson, Fabiana, Priscila e Graziela), pelo apoio e profissionalismo prestados.

Aos professores Dr. Pedro e Dra. Rosmari Horner pela atenção e disponibilidade para a finalização da dissertação.

Aos professores do Departamento de Fisiologia; Gilma Trindade e José Monserrat por gentilmente ceder os equipamentos e o laboratório para a realização dos testes LAL.

Ao colega Juliano Marangoni da Oceanografia Biológica, por sua colaboração na realização do tratamento estatístico do trabalho.

Ao secretário da Concur, Clabisnei pela paciência e envolvimento com os alunos.

Aos colegas do curso, pelo aprendizado compartilhado e por se mostrarem dispostos a ajudar a superar as dificuldades.

A todas as pessoas que contribuíram e se dedicaram para a execução do trabalho.

Á aquelas pessoas que não acreditaram no meu sucesso.

**EPIGRÁFE:**

O homem perde muitas coisas na vida,  
mas perde muito, quando perde a  
humildade, ele se torna ignorante.  
Autor desconhecido.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Cianobactérias	11
1.2 <i>Microcystis</i>	11
1.3 Florações de <i>Microcystis</i> na Lagoa dos Patos	12
1.3.1 Área de estudo: Lagoa dos Patos	12
1.3.2 Florações de <i>Microcystis</i>	13
1.4 Lipopolissacarídeos e Toxinas de Cianobactérias	14
1.5 Legislação	16
1.6 Avaliação e monitoramento das águas da região costeira da Lagoa dos Patos	19
1.7 Quantificação de LPS – Teste do Lisado do Amebócito de <i>Limulus</i>	19
1.7.1 Histórico	19
1.7.2 Princípio biológico	20
1.7.3 Aplicações do Teste	20
1.8 Objetivos	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1.1 Coleta das sub-amostras da cultura em laboratório	21
2.1.2 Quantificação de microcistinas das sub-amostras do cultivo	22
2.2 Locais de coleta das amostras ambientais	22
2.2.1 Coleta das amostras ambientais	22
2.3 Estimativa da concentração de clorofila- <i>a</i>	24
2.4 Identificação dos principais grupos taxinômicos	25
2.5 Preparo das amostras utilizadas no teste LAL	26
2.6 Teste do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> (LAL)	27
2.6.1 Materiais e reagentes utilizados especificamente para o teste LAL	27
2.6.2 Preparo das sub-amostras dos cultivos	27
2.6.3 Preparo das amostras ambientais	27
2.6.4 Preparo da curva-padrão	28
2.6.5 Reconstituição do Lisado	28
2.6.6 Reação	28
2.7 Descrição metodológica dos testes	29
2.7.1 Teste LAL n° 1	29

2.7.2 Teste LAL n° 2	29
2.7.3 Teste LAL n° 3	30
2.7.4 Teste LAL n° 4	30
2.7.5 Teste LAL n° 5	31
2.7.6 Teste LAL n° 6	31
2.7.7 Teste LAL n° 7	31
2.7.8 Teste LAL n° 8	32
2.8 Tratamento Estatístico	32
3. RESULTADOS	33
3.1 Parâmetros analisados do cultivo	33
3.2 Parâmetros abióticos e bióticos das amostras ambientais	36
3.3 Resultados dos testes do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> (LAL)	40
3.3.1 Teste LAL n° 1	40
3.3.2 Teste LAL n° 2	40
3.3.3 Teste LAL n° 3	41
3.3.4 Teste LAL n° 4	41
3.3.5 Teste LAL n° 5	41
3.3.6 Teste LAL n° 6	42
3.3.7 Teste LAL n° 7	42
3.3.8 Teste LAL n° 8	43
4. Resultados do tratamento estatístico	44
4. DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÕES .	53
6. REFERÊNCIAS	54

## **Listas de Abreviaturas**

LAL - Limulus Amebocyte Lysate

LPS - Lipopolissacarídeo

EU - Unidade de endotoxina

LWR - Lal reagent water

S – Salinidade

Céls.mL<sup>-1</sup> – células por mL

T - Temperatura

## Listas de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros modificados durante o desenvolvimento e adaptação da metodologia utilizada para os testes LAL.	32
Tabela 2. Parâmetros analisados das sub-amostras dos cultivos de <i>Microcystis</i> RST9501 crescendo em diferentes salinidades (0; 1; 2,5 e 5).	34
Tabela 3. Resultados dos parâmetros das amostras ambientais e da concentração de endotoxinas (LPS)	35
Tabela 4. Coeficientes de determinações (r) de correlações de Pearson entre os parâmetros analisados.	45
Tabela 5. Coeficientes de determinações (r) de correlações não paramétricas de Spearman entre os parâmetros analisados.	46



## Listas de Figuras

Figura1. Fotomicrografia, em microscópio óptico, de colônia de <i>Microcystis aeruginosa</i> .	11
Figura 2. Mapa da Lagoa dos Patos com destaque para a região estuarina	12
Figura 3. Ocorrência de floração de <i>Microcystis</i> na Praia de São Lourenço do Sul, RS (21/02/2006), uma das amostragens realizadas para este trabalho.	14
Figura 4. Estrutura da membrana celular das bactérias Gram-negativas (Adaptado de Madigan & Brock Biology ).	15
Figura 5. Imagem de satélite da região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, com os locais das amostragens.	23
Figura 6. Mapa dos resultados das amostras ambientais com a apresentação dos parâmetros de identificação celular, estimativa da abundância celular e concentrações de endotoxinas.	38
Figura 7. Estimativa da concentração de endotoxina (LPS) das amostras ambientais. Os locais e datas de coletas referentes a cada amostra estão descritos na Tabela 3. Os valores representam a concentração média de LPS (EU.mL <sup>-1</sup> ) das análises em duplicata, e as barras indicam o desvio padrão.	41
Figura 8. Estimativa da concentração de LPS das sub-amostras dos cultivos de <i>Microcystis</i> RST9501 crescidos em diferentes salinidades. Os valores representam a concentração média de LPS (EU.mL <sup>-1</sup> ) das sub-amostragens em duplicata. Os desvios-padrão, apesar de plotados, foram muito baixos, por isso não podem ser visualizados no gráfico.	42
Figura 9 – Estimativa da concentração de endotoxinas (LPS) das sub-amostras contendo apenas sais dissolvidos, dos resultados dos testes LAL 7 e 8.	43
Figura 10 – Estimativa da concentração de endotoxinas (LPS) das sub-amostras dos cultivos com concentrações celulares conhecidas, dos resultados dos testes LAL 7 e 8.	44
Figura 11 – ANOVA entre os locais amostrados. O programa utilizado (Estatística 6.0) para esta análise não incluiu a coleta realizada em São Lourenço do Sul por ter uma única amostragem, enquanto que os demais locais possuem, no mínimo, duas amostragens.	45

## Resumo

Florações de cianobactérias têm sido freqüentemente encontradas nas águas do estuário da Lagoa dos Patos (RS). Um das principais cianobactérias de ocorrência local é o gênero *Microcystis*. As células de *Microcystis* têm tolerância a baixas salinidades, porém com o aumento abrupto da salinidade, as células podem sofrer lise. Muitas vezes, em função da hidrodinâmica local, essas florações de cianobactérias podem atingir a região da Praia do Cassino, possibilitando o contato com banhistas. Devido à natureza Gram-negativa da composição da parede celular das cianobactérias, esse contato com as células pode resultar em na ocorrência de casos de irritação epicutânea e reações alérgicas. O agente causador é o lipídeo A (endotoxina), encontrado no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das cianobactérias. Com o objetivo de detectar concentrações ambientais de LPS das florações de cianobactérias foi utilizado o método cromogênico cinético de ponto final do teste do Lisado do Amebócito de *Limulus polyphemus* (teste LAL). O teste LAL foi realizado em amostras de água de superfície coletadas nas regiões de São Lourenço do Sul, Praia do Laranjal (Pelotas), Museu Oceanográfico da FURG, Yacht Club do Rio Grande e Praia do Cassino (Rio Grande), entre os meses de dezembro de 2005 e março de 2006. Nestas amostras também foram estimados a abundância celular dos principais grupos do fitoplâncton, a concentração de clorofila-a, e medida a salinidade local no momento da coleta. Para avaliar a possível interferência dos sais nos resultados do teste LAL, também foram realizados cultivos da cianobactéria *Microcystis* crescendo em diferentes salinidades, onde também foram estimados a abundância celular, e as concentrações de clorofila-a, LPS e microcistinas. Os ajustes metodológicos realizados no teste LAL durante o trabalho resultaram em uma sensibilidade para sua aplicação nas amostras ambientais. As maiores concentrações de endotoxinas detectadas nas amostras ambientais (109,5 EU.mL<sup>-1</sup>, 71,8 EU.mL<sup>-1</sup> e 93,7 EU.mL<sup>-1</sup>) se correlacionaram positivamente com as maiores abundâncias celulares (aproximadamente 600.000 células.mL<sup>-1</sup>, 400.000 células.mL<sup>-1</sup> e 300.000 células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), todas com a presença da cianobactéria *Microcystis*.

Palavras-chaves: Cianobactérias, lipopolissacarídeo (LPS); quantificação de endotoxinas; teste LAL.

## Abstract

Cyanobacterial blooms have been frequently observed in the waters of the Patos Lagoon estuary (RS). One of the main cyanobacterium of local occurrence is the genus *Microcystis*. The *Microcystis* cells present some tolerance to low salinity, but with the rapid salt increase the cells may suffer breakdown. Usually due to the local hydrodynamics these blooms may reach the recreational waters of the Cassino Beach, exposing swimming bathers to its contact. Due to the Gram-negative nature of the cyanobacterial cell membrane, this contact with the cells may result in case occurrences of epicutaneous irritation and allergic reactions. The causing agent is the lipid A (endotoxin), found on the lipopolysaccharide (LPS) of the external membrane of cyanobacteria. With the objective to detect environmental concentrations of LPS from cyanobacterial blooms, it was used the kinetic chromogenic endpoint method of the *Limulus polyphemus* Amebocyte Lisate test (LAL test). The LAL test was performed in surface water samples collected from the regions of São Lourenço do Sul, Laranjal Beach (Pelotas), FURG's Oceanographic Museum, Yacht Club Rio Grande, and Cassino Beach (Rio Grande) between December 2005 and March 2006. In these samples it was also estimated the cellular abundance of the main phytoplanktonic groups, the chlorophyll-a concentration, and measured the local salinity. To evaluate the possible interference of salinity in the LAL test results, it was also cultivated the cyanobacterium *Microcystis* growing in different salinities. From these cultures it was estimate the cellular abundance, and chlorophyll-a, LPS and microcystin concentrations.. The methodological adjustments performed in the LAL test during this work resulted in a sensitivity for its application in environmental samples. The highest endotoxin concentrations detected in the environmental samples ( $109.5 \text{ EU.mL}^{-1}$ ,  $71.8 \text{ EU.mL}^{-1}$  and  $93.7 \text{ EU.mL}^{-1}$ ) have positively correlated with the highest cell abundances (approximately  $600,000 \text{ cells.mL}^{-1}$ ,  $400,000 \text{ cells.mL}^{-1}$  and  $300,000 \text{ cells.mL}^{-1}$ , respectively), all of them with the presence of the cyanobacteria *Microcystis*.

Key-words: Cyanobacteria, lipopolysaccharide (LPS), endotoxin quantification, *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) test.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Cianobactérias

Cianobactérias são microrganismos procariontes que surgiram há mais de 3,5 bilhões de anos. Possuem clorofila-a e ficobiliproteínas (ficoeritrina e ficocianina) como pigmentos acessórios, que participam nos processos de fotossíntese, com um sistema fotossintetizante semelhante ao das algas e demais vegetais. Podem viver em condições extremas, com amplas variações de temperatura e salinidade, resistindo a períodos de seca, colonizando ambientes marinhos, lagos hipersalinos, estuarinos ou de água doce, e ainda ambientes terrestres, desérticos e gelados (Fogg *et al.*, 1973; Wynn-Williams, 2000). Quanto à sua morfologia, podem apresentar-se sob forma unicelular, colonial ou filamentosa. Além do fato de serem um dos principais grupos de produtores primários do ambiente aquático, responsáveis por grande parte da fixação do carbono inorgânico, algumas espécies ainda são fixadoras de nitrogênio atmosférico, contribuindo para a incorporação desse nutriente nos ciclos biogeoquímicos.

## 1.2 *Microcystis*

Dentre as cianobactérias, o gênero *Microcystis*, pertencente à Ordem Chroococcales, é composto por organismos unicelulares aquáticos, fotossintetizantes e no ambiente, normalmente são observados na forma de colônias. Suas células possuem um tamanho de célula que varia entre 3 a 7 µm de diâmetro (Fig. 1), são esféricas e algumas espécies possuem vesículas gasosas, responsáveis pela flutuabilidade positiva nas águas (Botes *et al.*, 1982; Komárek *et al.*, 2002).



Figura 1. Fotomicrografia, em microscópio óptico (100x), de colônia de *Microcystis aeruginosa*. Fonte: [www.icb.ufmg.br/~rmpec/img\\_t3.jpg](http://www.icb.ufmg.br/~rmpec/img_t3.jpg), acessado em 16/07/2007.

### 1.3 Florações de *Microcystis* na Lagoa dos Patos

#### 1.3.1 Área de estudo: Lagoa dos Patos

A Lagoa dos Patos é uma laguna costeira com 10.350 Km<sup>2</sup> que possui uma bacia de drenagem com uma área de aproximadamente 200.000 Km<sup>2</sup> (Asmus, 1998). A região do estuário representa 10% da área total da lagoa, e seus limites estão entre o Canal da Barra do Rio Grande, ao sul, e a Ilha da Feitoria ao norte (Castello, 1978; Fig. 2). Esse sistema estuarino foi classificado, segundo Kjerfve (1986), como do tipo estrangulado em sua desembocadura, devido ao estreito canal que faz sua ligação com o mar. Ao longo da Lagoa existem mais de 3.000.000 de habitantes que se distribuem em atividades pesqueiras, agropecuária, industriais, navegação, lazer e recreação (Yunes *et al.*, 1994).

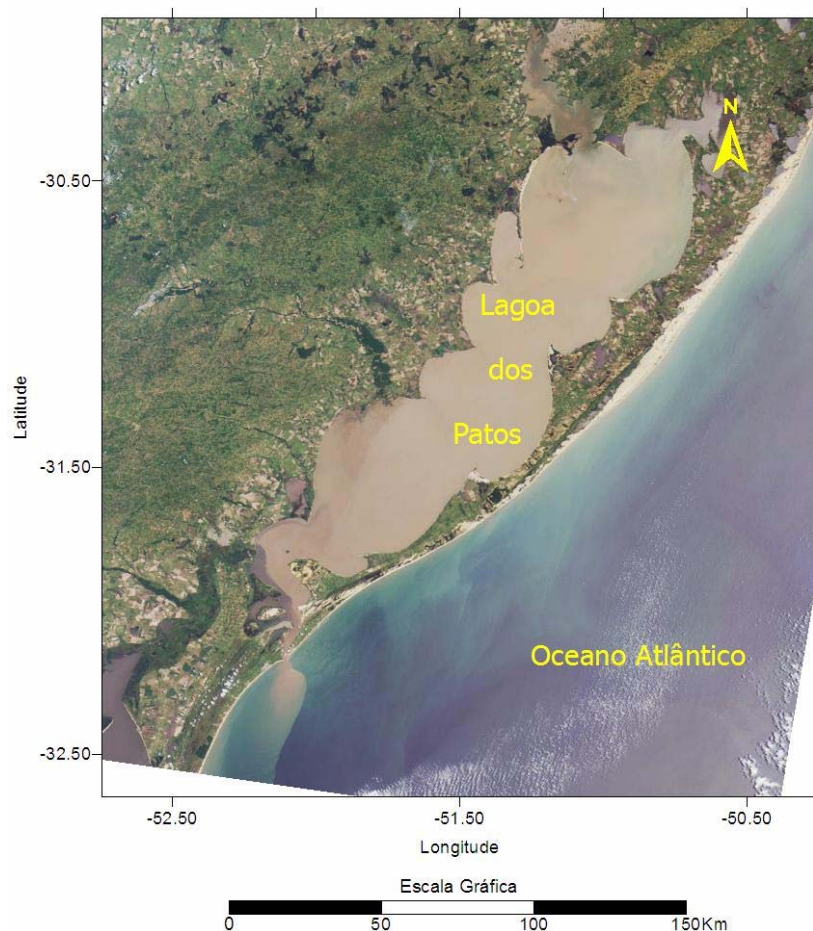


Figura 2. Mapa da Lagoa dos Patos com destaque para a região estuarina. Adaptado de [www.scielo.br/img/revistas/rbg/v23n2/a02fig01.gif](http://www.scielo.br/img/revistas/rbg/v23n2/a02fig01.gif), acessado em 15/07/07.

### 1.3.2 Florações de *Microcystis*

Sob determinadas condições ambientais, alguns gêneros de cianobactérias se desenvolvem rapidamente formando florações (Fig. 3). Essas condições incluem: pH de neutro a alcalino, causando alteração na permeabilidade da membrana celular, fator que favorece as cianobactérias (Shapiro, 1990; Morales *et al.*, 2002); temperatura da água elevada, que facilita a assimilação das formas iônicas dissolvidas; baixa turbulência da coluna d'água, com períodos de estagnação e estratificação da temperatura na coluna de água (Yunes *et al.*, 1998). Nessas condições as células de cianobactérias se reproduzem mais rapidamente, e a disponibilidade de formas nitrogenadas ionizadas ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) garantem sua sobrevivência na água.

Dentre as cianobactérias que causam florações, o gênero *Microcystis* é encontrado frequentemente na Lagoa dos Patos, com ocorrência sazonal (Yunes *et al.*, 1994; Odebrecht *et al.*, 1987). O gênero *Microcystis* é conhecido pela sua toxicidade e, quando presentes, suas toxinas pertencem ao grupo das microcistinas (Cood, *et al.*, 2004).

Pela hidrodinâmica local das águas estuarinas e da praia adjacente, as florações de *Microcystis* são carregadas do interior do estuário para região da Praia do Cassino (Matthiensen, 1996) fazendo com que grandes quantidades de células estejam presentes na zona de rebentação da praia. A disponibilidade de nutrientes das águas continentais e de aportes lançados no estuário e nos sangradouros da praia contribui para a manutenção desta elevada abundância na região costeira. No entanto, em ambiente estuarino, a integridade das células de cianobactérias depende da concentração salina do meio, sendo passíveis de lise por choque osmótico. No processo de lise das células o material intracelular, assim como fragmentos de membrana e as microcistinas são liberados para o meio. Resultados obtidos com choques salinos na cepa de *Microcystis* RST9501, isolada da região estuarina da Lagoa dos Patos, evidenciam o papel inibitório da salinidade sobre o crescimento desse gênero, sugerindo que suas florações, quando transportadas para região costeira da Lagoa dos Patos, sofrem declínio pelo aumento da salinidade (Salomon, 1999; Matthiensen *et al.*, 1999). No estuário da Lagoa dos Patos há variações de salinidade de até 20 unidades num período de 1 hora (Calliari, 1980). As maiores salinidades são encontradas nos meses de verão e as menores entre a primavera e outono (Kantin & Baumgarten, 1982). A ocorrência de florações na região

costeira e o encontro de águas com maior salinidade, sugerem que as células de *Microcystis* possuem mecanismos de adaptação a diferentes salinidades (Silva *et al.*, 2004; Odebrecht *et al.*, 2002).



Figura 3. Ocorrência de floração de *Microcystis* na Praia de São Lourenço do Sul, RS (21/02/2006), uma das amostragens realizadas para este trabalho.

Quando em floração, as *Microcystis* dominam o fitoplâncton (Stewart *et al.*, 2006). As florações podem desequilibrar os níveis tróficos da cadeia alimentar (Hallegraeff *et al.*, 1998; Yasumoto *et al.*, 1996; Havens *et al.*, 2003), e a proliferação demasiada de espécies nocivas de cianobactérias pode acabar eliminando níveis tróficos superiores aos da cianobactérias, em um determinado local (Anderson *et al.*, 1998; Reguera *et al.*, 1996; Komárek, 2003). Por exemplo, em zonas costeiras hipertróficas que estão sujeitas a florações de cianobactérias ou dinoflagelados, ambos têm baixa taxa de geração e são pouco palatáveis ao zooplâncton. Dominam em número de espécies e sobrepõe-se em um ambiente, como acontece no Lago Paranoá, em Brasília, e outros ambientes aquáticos espalhados pelo mundo (Vasconcelos & Pereira, 2001).

#### 1.4 Lipopolissacarídeos e Toxinas de cianobactérias

Na composição Gram-negativa da parede celular das cianobactérias há um agente alergênico, que relaciona a ocorrência de casos de irritação epicutânea e alergias ao contato de banhistas com células de florações de cianobactérias. O agente causador é um lipopolissacarídeo (LPS), presente na porção externa da parede celular das cianobactérias, que contém o lipídeo A (também chamado “endotoxina”), que é um

glicofosfolípido, também responsável pelos mecanismos de patogenicidade das demais células bacterianas Gram-negativas (Fig. 4; Brock & Madigan, 2003).

Os LPS são endotoxinas pirogênicas, ou seja, endotoxinas que causam febre e outros sintomas (cefaléia e náuseas, complicações a longo prazo e comprometimento do organismo) quando injetadas no sangue ou fluido cerebrospinal (Bommer & Ritz, 1987; Harding *et al.*, 1990). Porém estudos indicam que os lipopolissacarídeos produzidos por cianobactérias são menos tóxicos que os de outras bactérias como, por exemplo, os pertencentes do gênero *Salmonella* (Raziuddin *et al.*, 1983; Chorus & Bartram, 1999).

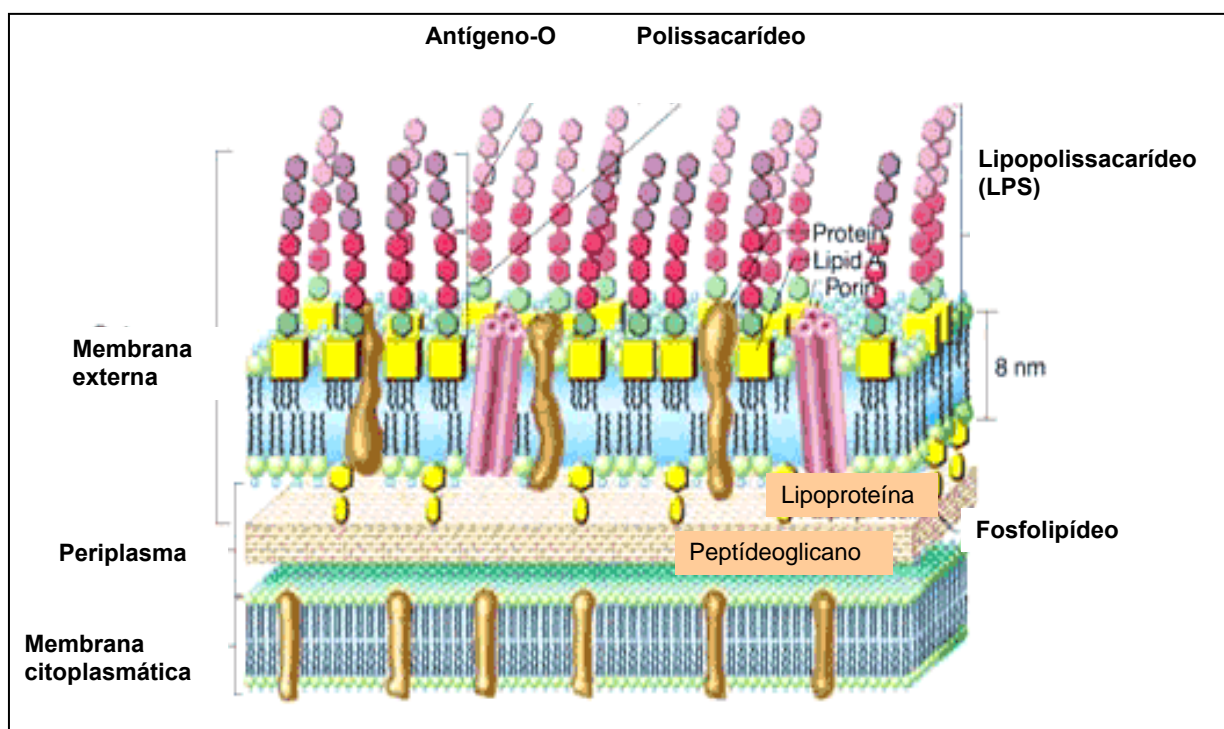


Figura 4. Estrutura da membrana celular das bactérias Gram-negativas (Adaptado de Brock & Madigan, 2003)

No verão de 2003 houve o registro da ocorrência de cerca de 20 casos de irritação epicutânea e dermatite alérgica de contato no Posto de Saúde do Balneário Cassino, Rio Grande, RS. No verão de 2005 houve a repetição de mais 6 casos. Esses casos correlacionaram-se positivamente com florações que aconteceram no interior da Lagoa dos Patos (regiões de salinidade menor) e a elevada abundância celular foi carregada para fora do estuário e se depositou na Praia do Cassino (Silva, 2005 (a)).



Foram realizados bioensaios de alergenicidade e foi constatado o potencial alergênico e irritante deste material (Silva, 2005 (a)).

As florações tóxicas ou nocivas de cianobactérias (FNC) são responsáveis por efeitos adversos, podendo causar danos à saúde de muitas pessoas durante o uso das águas para recreação e consumo. As toxinas alergênicas, como as das cianobactérias, requerem uma avaliação do seu grau de toxicidade para um melhor gerenciamento (monitoramento) no uso das águas impactadas por organismo que produzem esse tipo de substância. Os sintomas causados por essas toxinas alergênicas vão desde irritação na pele, alergia, erupções cutâneas, formação de bolhas e inchaço. Porém as reações alérgicas na pele que são associadas com a presença de cianobactérias na água, são pouco frequentes na literatura científica específica (Stewart *et al.*, 2006). Também há relatos de humanos com reações alérgicas e asma durante banho em área recreacional com a presença de cianobactérias (Falconer, 1999).

Algumas toxinas de cianobactérias como as microcistinas são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte de mamíferos por parada respiratória após poucos minutos de exposição, e normalmente são alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos. De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos (Carmichael, 1994).

É importante o estudo das vias de exposição (dérmica, oral e inalatória) das toxinas em águas recreacionais, para assegurar que os banhistas não sofram danos à sua saúde com o contato direto (contato da pele com água contaminada) e indireto (inalação de sprays).

## 1.5 Legislação

O limite de células determinado para cianobactérias, segundo a Portaria N° 518 do Ministério da Saúde de março de 2004, para águas de mananciais abertos destinado ao consumo humano, é de 20.000 cél.mL<sup>-1</sup>. Porém já foram diagnosticados efeitos adversos a partir de 50.000 cél.mL<sup>-1</sup> em águas durante exposição recreacional em balneários costeiros afetadas por florações, com os sintomas semelhantes aos de gripe, com vômitos, diarreia, febre, irritações nos olhos e ouvidos (Pilotto *et al.*, 1997).

De acordo com a legislação brasileira as águas são classificadas quanto ao seu uso. A classificação das águas é prevista na Resolução CONAMA nº 20 de 1986, revogada pela Resolução CONAMA nº. 357, de 17 de março de 2005, quando teve revisão realizada pelo enquadramento da FEPAM. Essa revisão está em vigor até a atualidade e prioriza a saúde humana: “com objetivo de defender os níveis de qualidade e controlar a poluição nos níveis de classificação estipulados, e de atender as necessidades da comunidade, considera-se que a saúde e o bem estar humano, bem como o equilíbrio aquático, não devem ser afetados como consequência da deterioração da qualidade das águas”.

No que se refere a águas estuarinas, estas são classificadas como salobras pertencentes à classe C, águas destinadas a:

- a) proteção das comunidades aquáticas;
- b) recreação de contato primário e secundário;
- c) navegação.

Em relação aos parâmetros biológicos, são estabelecidos, para tais águas, apenas limites quantitativos para coliformes fecais. Na classificação destas águas não se menciona a presença de algas ou de cianobactérias, bem como os fatores e as vias de risco de exposição, como contato cutâneo na atividade pesqueira e inalação de sprays lançados por motores de embarcações.

A classificação das águas de balneários é prevista pela Resolução do CONAMA nº 274 de 29 de novembro de 2000. O Artigo 2º descreve: “as águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário) terão sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria”.

A recente publicação da Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005 possui modificações quanto à balneabilidade. A resolução 357 estabelece que a balneabilidade de contato primário (banho, natação, mergulho e pesca) deve se enquadrar nas classes I e II, classificando o estuário que possui três tipos de águas (doce, marinha e salobra). Como se observa no Capítulo III, Artigos 8º, 3º e 4º: “Para as classes I e II de ambientes de água doce, destinadas ao contato primário, a concentração permitida de densidade de cianobactérias é de até 50.000 cél.mL<sup>-1</sup> e clorofila-a de até 30 µg.L<sup>-1</sup>”. As águas da classe III permitem densidades de até 100.000 cél.mL<sup>-1</sup>, porém em seu uso não está previsto o contato primário com banhistas e pescadores.

Para os níveis de compostos pirogênicos, torna-se crucial considerar os limites de liberação para os produtos farmacêuticos. Em 18 de janeiro de 1980, o Bureau of Drugs publicou um ensaio cujo título é *Guidelines for Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Test for Human and Veterinary Injectable Drugs and Medic Devices*. Este documento estabelece  $50,0 \text{ pg.mL}^{-1}$  ( $0,5 \text{ ng.Kg}^{-1}$ ) de endotoxinas como limite final de liberação de produtos farmacêuticos não intratecais (dentro do canal vertebral). Posteriormente, foi proposto a redução para  $35,0 \text{ pg.mL}^{-1}$  (Pearson, 1985).

Considerando as evidências científicas,  $100 \text{ pg.mL}^{-1}$  é um limite de liberação aceitável para parenterais (substâncias injetadas intravenosa), de acordo com o teste de pirogênio em coelhos, segundo a United States Pharmacopeia (2000). Conseqüentemente, foi sugerida a reavaliação do *Bureau of Drugs* no sentido do estabelecimento de  $100 \text{ pg.mL}^{-1}$  ( $1,0 \text{ ng.Kg}^{-1}$ ) como limite final de liberação para endotoxinas em parenterais de grande volume, como os utilizados para nutrição (Pearson, 1985).

Atualmente os limites considerados aceitáveis para endotoxina bacteriana são: para produtos farmacêuticos e biológicos  $5,0 \text{ EU Kg}^{-1}$  (Endotoxin Unit, ou Unidade de Endotoxina,  $5,0 \text{ EU.mL}^{-1}$  equivale a  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$ ); radiomarcadores  $2,5 \text{ EU.Kg}^{-1}$ ; parenterais de grande volume  $0,5 \text{ EU.mL}^{-1}$ ; água para injeção  $0,25 \text{ EU.mL}^{-1}$ ; drogas intratecais  $0,2 \text{ EU.mL}^{-1}$ ; correlatos até  $200 \text{ EU. mL}^{-1}$  e correlatos intratecais  $0,06 \text{ EU. mL}^{-1}$  (United States Pharmacopeia, 2003).

A contaminação microbiana com ênfase nas bactérias Gram-negativas, seja no uso (mangueiras, cateteres, seringas e agulhas) do tratamento do paciente, ou seja, no processo de lavagem destes e outros materiais utilizados em clínicas e hospitais, poderá estar acarretando a contaminação dos materiais hospitalares com endotoxinas. A esterilização poderá destruir os microrganismos viáveis, mas não terá ação sobre lipopolissacarídeos residuais ou endotoxinas presentes. A característica de esterilidade não protege o paciente da ampla ação biológica do pirogênio (Gordon, 1988).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são citados os LPS nas águas para hemodiálise, produção de fármacos e na indústria de alimentos. Toda água destinada para estes fins deve ser livre de pirogênios. Estas águas devem possuir valores de no máximo  $2,0 \text{ EU.mL}^{-1}$ , considerando uma análise mensal no reservatório de água que sirva para os destinos citados acima.

Na Portaria nº518, da ANVISA de 2004, considera a necessidade de redefinir os critérios mínimos para o funcionamento e avaliação dos serviços públicos e privados que realizam diálise em pacientes portadores de insuficiência renal crônica e que deve se verificar a qualidade da água tratada para diálise toda vez que houver suspeitas de manifestações pirogênicas.

#### 1.6 Avaliação e monitoramento das águas da região costeira da Lagoa dos Patos

Observando os casos de irritação epicutânea relatados em 2003 no Posto de Saúde do Balneário Cassino, os bioensaios realizados por Silva (2005(a)), e o relato da ocorrência das florações de *Microcystis*, surgiu a necessidade de implementar uma ferramenta de trabalho (método) que possibilitasse uma avaliação das águas da região do estuário da Lagoa dos Patos e a praia do Cassino, levando-se em conta as diversas variantes ambientais que poderiam se tornar interferentes (e.g. salinidade).

#### 1.7 Quantificação de LPS – Teste do Lisado do Amebócito de *Limulus*

##### 1.7.1 Histórico

Em 1885, Howell descreveu a coagulação do sangue de *Limulus polyphemus* (caranguejo ferradura) na presença de bactérias Gram-negativas. Bang, em 1950, descobriu que bactérias Gram-negativas marinhas, quando em contato com o sangue de *Limulus*, formavam um coágulo. Após, nos anos 1960, Levin determinou que essa reação (coagulação) fosse enzimática e as enzimas que reagiam ficavam alojadas nos grânulos dos amebócitos. A coagulação é iniciada (ativada) pelos LPS (Bang & Frost, 1953), e pode ser demonstrada extracelularmente (*in vitro*) pelo método de gelificação cinético turbidimétrico.

O teste LAL tem sido utilizado basicamente para detectar a presença das estruturas das bactérias Gram-negativas, o LPS purificado e/ou preservado, desde sua introdução no início dos anos 70, para quantificar endotoxinas em produtos parenterais e soluções para hemodiálise. Usado para pesquisa em diversas áreas (indústria de semicondutores, fármacos, meios de cultura de tecidos, alimentos e águas em geral) e aplicações clínicas e ambientais (Rapalla *et al.*, 2002). Em 1983, o LAL foi o primeiro

teste *in vitro*, que substitui o teste *in vivo*, da febre em coelhos (teste do pirogênio; United States Pharmacopeia, 1994) para substâncias tóxicas.

### 1.7.2 Princípio biológico

A ativação das enzimas é dada por uma cascata proteolítica, que ao seu término quebra o peptídeo, ou coagulígeno. Na quebra liberam produtos insolúveis, o coagulígeno que se une por interação iônica, formando um substrato cromogênico, paranitroanilina (*p*-Na). Na reação há a liberação de *p*-Na, que possui a cor amarela, e absorve a luz a 405 nm de comprimento de onda. Assim surgiu o princípio biológico do teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL), que quantifica LPS de bactérias Gram-negativas (Morote *et al.*, 2002).

### 1.7.3 Aplicações do Teste

Atualmente, continua sendo utilizado para vários fins, como monitoramento nas estações de tratamento de água, quantificação de LPS purificado (Abdulla *et al.*, 2006; Lindsay *et al.*, 2006) avaliar concentrações de LPS em cultura de bactérias e na confecção de padrões de endotoxina (Muck *et al.*, 1999; Vasconcelos & Pereira, 2001; Silva D., 2005 (b)). O teste LAL permite desenvolver trabalhos em áreas de interesse ambiental e avaliação de riscos toxicológicos associados à saúde humana (Conrad *et al.*, 2006).

## 1.8 Objetivos

O trabalho tem como objetivo geral implementar o teste LAL para análise de LPS de cianobactérias no ambiente.

Dentre os objetivos específicos estão: otimizar o método para as concentrações de LPS observadas nas amostras de águas interiores do estuário da Lagoa dos Patos e da Praia do Cassino, e avaliar o efeito da variação da salinidade nos resultados do teste LAL.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cultura em laboratório

Foram realizados cultivos da cianobactéria *Microcystis* RST9501 em meio BG11 + NaNO<sub>3</sub> (Stanier *et al.*, 1971), em quatro salinidades diferentes (0; 1; 2,5 e 5), de acordo com Ripka *et al.* (1979). A cultura de *Microcystis*, originária do Banco de Culturas de Cianobactérias da Unidade de Pesquisas em Cianobactérias (UPC), da FURG, foi inoculada numa proporção de 5 a 10%, e a colheita foi realizada aproximadamente dois meses depois da inoculação. Durante o cultivo foram retiradas sub-amostras (metodologia descrita abaixo) para monitoramento do crescimento celular.

O cultivo foi realizado em Erlenmeyers com volume de 500 mL, tipo *batch*, em câmara de cultivo (Fanem 347FG, Brasil) sem aeração, com luminosidade de 60  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  incidindo na superfície dos frascos, em temperatura controlada de 25°C  $\pm$  2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

#### 2.1.1 Coleta das sub-amostras da cultura em laboratório

O material do cultivo foi coletado em triplicata em frascos Eppendorfs (Plastibrand®, EUA) com 1mL de volume, para cada salinidade. As sub-amostras foram submetidas à centrifugação a 10000 g por 10 min (Eppendorf - 5415 C, EUA), o sobrenadante (conteúdo extracelular) foi separado do pellet (conteúdo intracelular). Esses diferentes compartimentos foram armazenados a -20°C até a análise de quantificação de microcistinas.

Foram coletadas amostras em triplicata com volume de 50 mL em tubos plásticos (Nalgene®, EUA), centrifugadas (10000g por 10min; centrífuga Eppendorf, 5415C, EUA). Os materiais intracelular e extracelular foram separados e armazenados a -20 °C até a análise de lipopolissacarídeos. Após concentração em volumes de 50 mL as amostras do material intracelular foram congeladas, liofilizadas (Edwards MicroModulyo, Inglaterra) e armazenadas a -20° C até as análises.

Foram coletados em Eppendorfs (Plastibrand®, EUA) volumes de 1mL, em quadruplicata para a estimativa da concentração celular, e em triplicata para a estimativa

da clorofila-*a*. As amostras destinadas à quantificação celular foram fixadas em Solução de Lugol e Transeau.

### 2.1.2 Quantificação de microcistinas das sub-amostras do cultivo

A quantificação das microcistinas das sub-amostras do cultivo celular foi realizada em triplicata no material intracelular e extracelular de cada uma das diferentes salinidades (0; 1; 2,5 e 5). As sub-amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, sendo que a análise da concentração de microcistina do material extracelular foi realizada diretamente no meio de cultura e, nas amostras do material intracelular (*pellet*) foi adicionado 1 ml de metanol absoluto, e sonificadas (Ultrasonic processor GE 50, EUA) durante um minuto a 50 kHz, antes da análise.

A quantificação das variantes de microcistinas foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Performance Shimadzu® SCL 10 Avp, Japão). Foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> (25 cm, 250 x 4,6 mm de diâmetro, 5µ de tamanho de poro; Phenomenex – Luna, EUA). A corrida cromatográfica foi realizada em 55 minutos num gradiente linear 30-100-30% de água e acetronitrila (fases móveis), contendo 0,05% de ácido trifluoracético em ambos os solventes. As condições da corrida foram: temperatura de forno de coluna de 40°C, pressão de 127 kgf.m<sup>-2</sup> e fluxo de 1ml.min<sup>-1</sup>, segundo metodologia de Harada *et al.* (1995).

### 2.2 Locais de coleta das amostras ambientais

As amostras de água foram coletadas em cinco pontos na região estuarina da Lagoa dos Patos: Praia de São Lourenço do Sul (31°22'32"/51°57'12"), píer do Museu Oceanográfico (32°01'34"/52°06'19"), píer do Yacht Club (32°01'31"/52°06'27"), píer da Praia do Laranjal, Pelotas (31°45'19"/52°13'13") e Praia do Cassino (32°11'11"/52°09'11") (Fig. 4). As escolhas dos pontos das amostragens obedeceram a uma necessidade de priorizar análises em águas costeiras de balneários em épocas de alta presença de banhistas. Os locais foram acessados pelas margens com a viatura da UPC, FURG.

Foram realizadas dez amostragens: duas no píer do Museu Oceanográfico, duas no píer do Yacht Club, duas no píer da Praia do Laranjal, três na Praia do Cassino e uma

amostragem na Praia de São Lourenço do Sul. O período de amostragem foi realizado entre os meses de dezembro de 2005 a março de 2006.

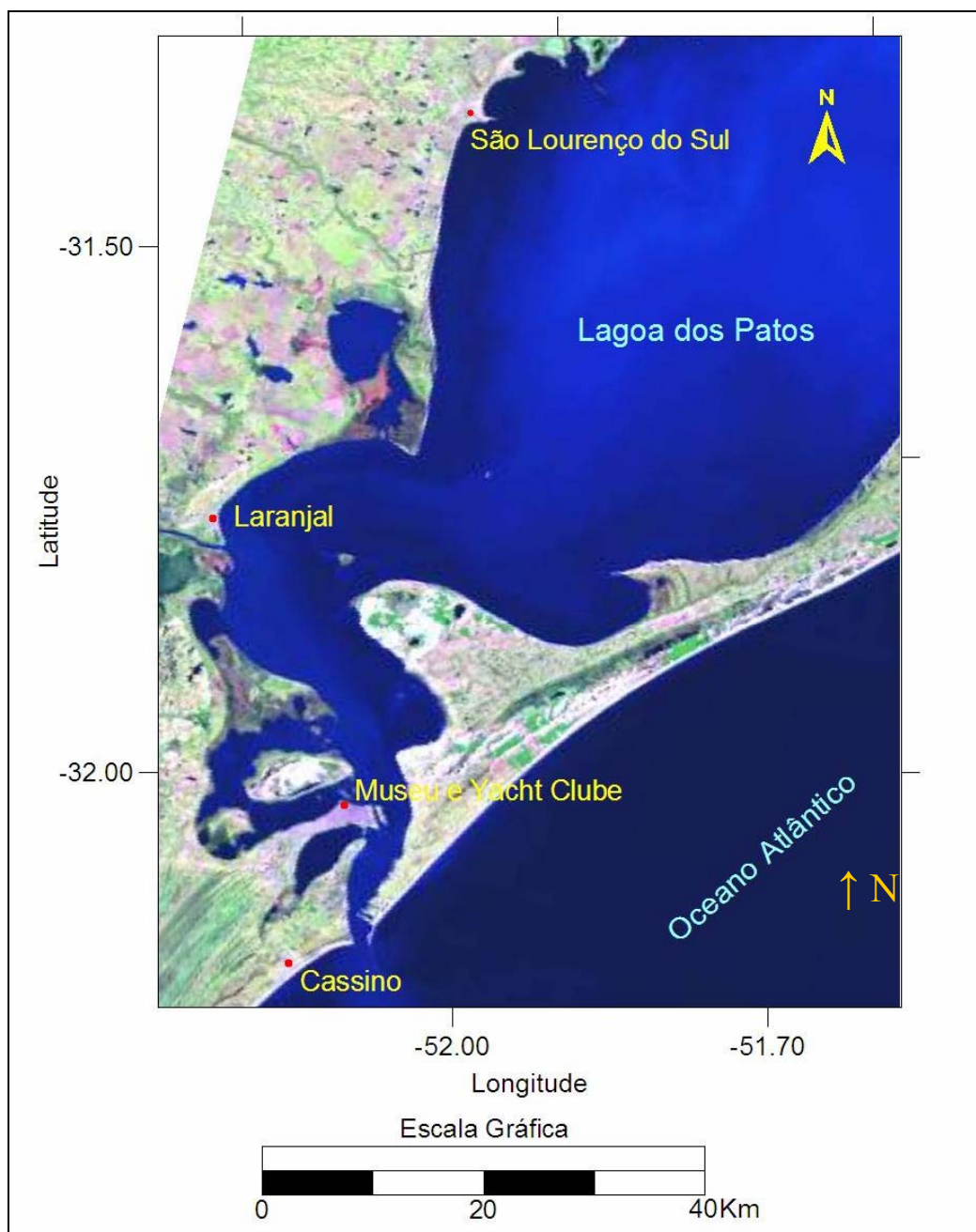


Figura 5. Imagem de satélite da região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, com os locais das amostragens.



### 2.2.1 Coleta das amostras ambientais

Amostras de água de superfície foram coletadas com balde e armazenadas em garrafas plásticas esterilizadas, mantidas refrigeradas e no escuro até seu transporte para o laboratório. Foram retiradas alíquotas de 100 mL para a estimativa da concentração ambiental de clorofila-*a* (metodologia descrita na seção 2.3). Também foram coletadas amostras para identificação dos principais grupos taxonômicos do fitoplâncton e quantificação celular (metodologia descrita na seção 2.4). O restante das amostras ambientais foi armazenado visando análise de lipopolissacarídeos.

Na presença de colônias de cianobactérias visíveis na água, o material foi concentrado, em laboratório, com funil de separação, em caso de cianobactérias com flutuabilidade positiva, ou por centrifugação, em caso de cianobactérias com flutuabilidade negativa. Após concentração em volumes de 100 mL as amostras foram congeladas, liofilizadas (Edwards MicroModulyo, Inglaterra) e armazenadas a -20° C até as análises.

As medidas dos parâmetros de temperatura e salinidade das amostras de água foram realizadas *in situ*. Foram utilizados, respectivamente, um termômetro de mercúrio (Incoterm, Brasil) e um refratômetro de salinidade (Meiji Labax, Japão).

### 2.3 Estimativa da concentração de clorofila-*a*

A estimativa da concentração de clorofila-*a* das amostras ambientais foi feita pela filtração de 100 mL de amostra em bomba de vácuo (Edwards, Inglaterra) através de filtros Whatman GF/C 45 mm de diâmetro. O filtro foi armazenado em frascos de vidro âmbar em 50 mL de metanol absoluto (SIGMA®, EUA), por um período de 24 horas a 4°C. Após esse período, o material foi homogeneizado, coletado 1 mL em Eppendorf e centrifugado (1000g por 10 min). A leitura da absorbância do extrato da amostra foi realizada em espectrofotômetro (Cary 50-UV, Austrália) em 663 nm de comprimento de onda, em cubetas de quartzo de 1 cm de trajeto óptico.

A estimativa da concentração de clorofila-*a* das sub-amostras dos cultivos celulares de diferentes salinidades foi realizada em volumes de 1mL, que foram centrifugados (1000g por 1 min), o sobrenadante foi separado do *pellet* e descartado, e o mesmo volume (1 mL) de metanol absoluto foi adicionado aos *pellets*. A extração e

leitura em espectrofotômetro seguiram o mesmo protocolo utilizado para as mostras ambientais (Mackinney,1941).

O cálculo das concentrações de clorofila-*a* (Cl-*a*), expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ou  $\text{mg.L}^{-1}$ , foi obtido a partir da fórmula:

$$\text{Cl-}a = \frac{\text{Abs } 663\text{nm} \times 12,63 \times \text{volume de metanol (mL)}}{\text{Volume de amostra (mL)}}$$

#### 2.4 Identificação dos principais grupos fitoplanctônicos ambientais e quantificação da abundância celular

As amostras ambientais foram fixadas em soluções de Lugol (10 g KI + 5 g I<sub>2</sub> em 100 mL de água destilada) e Transeau (formol:etanol:água, na proporção de 1:3:6) para posterior identificação e contagem (APHA, AWWA, WPCF, 2001).

A identificação dos principais grupos fitoplanctônicos presentes nas amostras de água coletadas do ambiente foi realizada em microscópio óptico (Studar Lab, Hungria) com aumento de 400x. As referências utilizadas para a identificação foram: Sant'Anna *et al.* (2006), Desikachary (1959), Ricard (1986), Sournia (1986), Chrétienno-Dinet (1990), Menezes & Bicudo (2005).

A abundância celular ambiental foi estimada por microscopia óptica em câmaras de Sedgewick-Rafter (1 mL) (Graticules Limited, Inglaterra), onde foram contados entre 40 e 50 campos visuais; e em hemocitômetro de Neubauer de 0,1  $\mu\text{L}$  (Labex, Brasil) em aumento de 200x.

As amostras ambientais coletadas que apresentaram a presença de colônias visíveis da cianobactéria *Microcystis* sp. foram submetidas a digestão celular à quente (90°C) em solução de hidróxido de sódio 0,03M por 90 minutos (Reynolds & Jaworski, 1978; Box, 1981). Uma vez digeridas, as células puderam ser visualmente quantificadas por microscopia óptica. Um outro método de estimativa da quantificação celular utilizado para as amostras ambientais com presença de colônias muito densas da cianobactéria *Microcystis* sp. foi através da quantificação do número de colônias, e a estimativa do número das células por colônia, a partir da medida do diâmetro da colônia e do diâmetro das células (NRA/UK, 1992). Através da fórmula da área da elipse (forma geométrica que melhor representou as colônias no hemocitômetro) foi calculada a área da colônia de *Microcystis* sp.. Foram realizadas cinco contagens para medir a área das

colônias, e estimado o diâmetro médio de uma célula através da medida do diâmetro de 20 células de *Microcystis* sp., utilizando-se para o cálculo final a média aritmética dos diâmetros celulares e coloniais.

Devido à grande abundância celular, as amostras dos cultivos foram diluídas (20 a 100 vezes), dependendo da necessidade, para sua quantificação. Foi utilizado o hemocitômetro de Neubauer para as contagens das amostras do cultivo. Os cálculos foram feitos pela fórmula:  $n^{\circ} \text{ células.mL}^{-1} = \text{cel. contadas} \times 1000/n^{\circ} \text{ campos visuais contados}$ . Foi contado um número médio de 200 campos visuais, de forma que o erro amostral não ultrapassasse os 5% (Stein, 1973).

## 2.5 Preparo das amostras utilizadas no teste LAL

Dependendo do objetivo, as sub-amostras dos cultivos e as amostras ambientais necessitaram de diferentes metodologias de preparo antes das análises das estimativas das suas concentrações de lipopolissacarídeos.

Para se verificar a relação da abundância celular com concentração de LPS, as concentrações celulares de 1.000.000, 500.000, 100.000, 50.000 e 10.000 células.mL<sup>-1</sup>, foram preparadas coletando-se sub-amostras do cultivo de *Microcystis* sp. crescendo em salinidade zero. As sub-amostras foram diluídas em 10 e 20 vezes com água destilada, para contagem em hemocitômetro de Neubauer. Uma vez quantificadas, foram realizadas novas diluições para ajustar às concentrações celulares citadas acima.

Para se verificar a influência da salinidade na estimativa da concentração de LPS pelo método adotado, amostras salinas foram preparadas com água apirogênica (Ripka *et al.*, 1979), nas salinidades de 5, 10, 15, 25, 30 e 35. As amostras salinas foram separadas em triplicatas de 1 mL e mantidas sob refrigeração (4°C) até análise de quantificação de LPS. Também foram preparadas amostras com água apirogênica mantida nos recipientes utilizados nas coletas das amostras ambientais, para se eliminar possíveis contaminações dos frascos de coleta, e amostras contendo apenas meio de cultura BG11 (sem células), para funcionar como o “branco” das análises de LPS dos cultivos de laboratório. As amostras com o meio de cultura BG11 foram separadas em triplicatas de 1 mL e mantidas sob refrigeração (4°C) até análise.

As amostras ambientais e as sub-amostras dos cultivos foram submetidas ao congelamento e descongelamento lento quatro vezes para rompimento físico da

membrana celular, e foram centrifugadas (10000g por 10min) antes das análises, utilizando-se o sobrenadante para evitar interferências na leitura ótica das absorbâncias.

## 2.6 Teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL)

### 2.6.1 Materiais e reagentes utilizados especificamente para o teste LAL

Microplaca de 96 poços (Pyroclean®, Cape Cod Inc, EUA); tubos de borosilicato (Cape Cod Inc, EUA); ponteiras apirogênicas (Pyroclean®, Cape Cod Inc, EUA); Eppendorfs (Plastibrand®, EUA); Lisado de Amebócito de *Limulus polyphemus* e Solução Reconstituente (tampão) (Pyrochrome®, Cape Cod Inc, EUA); controle de endotoxina padrão (Cape Cod Inc, EUA); LAL Reagent Water – água apirogênica (Cape Cod Inc, EUA); solução de ácido acético 50% (Merck, Alemanha).

### 2.6.2 Preparo das sub-amostras dos cultivos

As amostras foram liofilizadas, congeladas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise de quantificação de LPS. A partir do liofilizado, preparou-se soluções de  $0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , diluídas em água apirogênica. Previamente a análise as amostras sofreram descongelamento lento e foram submetidas ao banho de ultrassom (Marconi USC – 700, Brasil) na frequência 100 Hz durante 10 min, e logo após foram centrifugadas (10.000 g, 10 min), e os sobrenadantes foram diluídos em 25 e 50 vezes. E as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min) novamente antes da análise.

Após o preparo descrito na seção 2.5, as sub-amostras dos cultivos com diferentes abundâncias celulares em salinidade zero foram separadas em triplicatas de 1 mL, congeladas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise de quantificação de LPS. Antes da análise, as amostras foram novamente centrifugadas (10.000 g, 10 min).

### 2.6.3 Preparo das amostras ambientais

As amostras de água coletadas do ambiente para a quantificação dos LPS foram congeladas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem liofilizadas (Edwards Modulyo, Inglaterra). A partir do liofilizado foram feitas soluções na concentração inicial de 10 mg de material

liofilizado por mL. As amostras foram submetidas ao banho de ultrassom (Marconi USC – 700, Brasil) na frequência 100 Hz durante 10 min, e logo após foram centrifugadas (10.000 g, 10 min), e os subrenadantes foram diluídos em 25 e 50 vezes. As amostras foram novamente centrifugadas (10.000 g, 10 min) imediatamente antes de seu uso.

#### 2.6.4 Preparo da curva-padrão

As diluições do liofilizado do LPS padrão (de *Escherichia coli*) usado para a construção da curva, de concentração inicial de 2 EU.mL<sup>-1</sup>, foram feitas com a água apirogênica, resultando em concentrações de 0,5; 0,25; 0,12; 0,06 e 0,03 EU.mL<sup>-1</sup>. As diluições foram realizadas em tubos (10x75 mm) apirogênicos de borosilicato (Cape Cod Inc, EUA). Após as diluições as soluções foram agitadas em vórtex (Marconi 162, Brasil) por 30 segundos antes de serem pipetadas (50 µL) para os poços das microplacas.

#### 2.6.5 Reconstituição do Lisado

O lisado (liofilizado de extrato aquoso de amebócitos do *Limulus polyphemus*) foi reconstituído em seu próprio frasco de origem com 3,2 mL de solução tampão (dextran, EDTA, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, regulador e substrato de *p*-nitroanilina) e agitado manualmente com cuidado até sua dissolução, cinco minutos antes do uso.

#### 2.6.6 Reação

A reação foi realizada em uma microplaca descartável apirogênica com 96 poços, onde após acrescentar 50µL de amostra foi adicionado um volume de 50µL da solução Pyrochrome. Após a mistura, a microplaca foi agitada levemente durante, 30 segundos, e incubada a 37°C em banho termostático (Banho Dubnoff, EUA) ou em estufa (Biopar, Tecnal, Brasil) durante os períodos de 30, 40 e 45 min. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com 10 µL de solução de ácido acético 50%. O ácido acético foi diluído em vidro esterilizado com água apirogênica na proporção 1:1.

A leitura foi realizada em leitor de placas (EL X 800 Bio-Tek® Instruments, EUA) em 405 nm de comprimento de onda. As concentrações de endotoxina das amostras foram calculadas com base nas equações das retas-padrão, sendo o valor aceito  $R^2 > 0,98$ , segundo as recomendações do método (FDA, 1987; U.S.Pharmacopeia, 2003).

## 2.7 Descrição metodológica dos testes

Ao todo foram realizados oito testes LAL, onde houve alterações significativas na metodologia (“evoluções metodológicas”) para se buscar uma melhor adequação e uma quantificação mais precisa e confiável dos LPS das amostras ambientais e sub-amostras de cultivo. O parâmetro utilizado para validação da metodologia dos testes LAL (*endpoint* metodológico) foi a linearidade ( $R^2$ ) da curva padrão. Os testes estão descritos em detalhes e cronologicamente (de 1 a 8), e suas modificações estão resumidas na Tabela 1.

### 2.7.1 Teste LAL nº 1

O primeiro teste (teste piloto) serviu para adequação metodológica e manuseio dos materiais, e também como ajuste do tempo e condições de incubação. Todas as amostras (padrões e controle positivo) foram realizadas em duplicatas, exceto os brancos (controles negativos) que foram realizados em quadruplicatas. As reações foram interrompidas após 30 e 45 minutos de incubação, sendo que ambos os tempos de incubação foram testados na mesma microplaca. A construção da curva padrão foi realizada com diluição de LPS purificado em água apirogênica (LRW) em tubos de borosilicato, com concentrações de 0,5; 0,25; 0,125; 0,06125 e 0,03125 EU.mL<sup>-1</sup>. As diluições foram realizadas a partir da concentração inicial de 2 EU.mL<sup>-1</sup>. Após, os padrões foram transferidos para a microplaca de 96 poços, onde ocorreu a reação.

O LAL foi reconstituído misturando-se o lisado com 3,2 mL de uma solução tampão, com cuidado para evitar formação de bolhas. O volume final de amostras e reagente LAL é de 200 µL. A incubação foi realizada em um banho termostático não circulante, com aproximadamente dois litros de água destilada e temperatura de 37°C. A microplaca foi colocada com o fundo encostado na água.

As incubações foram interrompidas aos 30 min e aos 45 min com solução de ácido acético 50%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 405nm de comprimento de onda (Lindsay *et al.*, 1989).

#### 2.7.2 Teste LAL nº 2

A partir do segundo teste foram incluídas análises de amostras ambientais, que foram previamente liofilizadas. A partir do liofilizado das amostras foi feita uma solução inicial, com concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  e as soluções trabalho de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Para execução do teste LAL nº 2 foi adotado o protocolo de validação descrito anteriormente no primeiro teste. As amostras foram analisadas em duplicatas e os brancos em quadruplicatas.

Após reconstituir-se o LAL, misturando o lisado liofilizado com 3,2 mL de uma solução tampão, foi utilizado um vórtex para misturar o lisado e a solução tampão, e o tempo de incubação foi fixado em 45 min.

#### 2.7.3 Teste LAL nº 3

No terceiro teste foram repetidas as análises das amostras ambientais realizadas anteriormente, bem como o protocolo anterior com exceção da agitação forte realizada em vórtex. Esse teste foi realizado com agitação manual para reconstituição do lisado de *Limulus*. As amostras e padrões foram feitos em duplicata e os brancos em quadruplicatas.

#### 2.7.4 Teste LAL nº 4

Neste quarto teste foram novamente repetidas as amostras ambientais. A partir do liofilizado, foi feita uma solução inicial de concentração  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , porém com soluções trabalho mais diluídas, de  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ . O LAL foi reconstituído com forte agitação, e após foi aplicado sobre as amostras (brancos, padrões e amostras ambientais) na microplaca.

### 2.7.5 Teste LAL n° 5

No quinto teste foi utilizado parte dos procedimentos dos testes anteriores, porém foi testada incubação seca em estufa, mantida a 37°C, com a diminuição de cinco minutos no tempo de incubação, e diminuição da agitação na reconstituição do LAL. A agitação da reconstituição foi feita manualmente, com espera de cinco minutos antes do seu uso. As amostras ambientais foram repetidas e também foram realizadas as análises das sub-amostras dos cultivos celulares em salinidade com diluição de 25 vezes com água destilada.

### 2.7.6 Teste LAL n° 6

Em vista dos resultados obtidos no teste LAL n° 5, tanto de linearidade da curva padrão ( $R^2 = 0,9884$ ) quanto de reprodutibilidade das duplicatas e triplicatas, o protocolo de validação descrito no quinto teste foi adotado para os posteriores.

No sexto teste foram analisadas as sub-amostras do cultivo celular de salinidade zero, com concentrações celulares previamente conhecidas (10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1 milhão e 4 milhões de células.mL<sup>-1</sup>). E foram repetidas as sub-amostras do cultivo de *Microcystis* com salinidades (0; 1; 2,5 e 5).diluídas 50 vezes com água destilada. As amostras foram devidamente pipetadas na microplaca, de acordo com um mapa utilizado para identificar a posição das amostras e dos padrões da curva de calibração. A agitação foi manual e o tempo de dissolução foi maior que o de costume (acima de 5 min).

### 2.7.7 Teste LAL n° 7

No sétimo teste também foram analisadas as sub-amostras do cultivo celular de *Microcystis* RST9501 crescendo em salinidade zero com concentrações de células previamente conhecidas (10.000, 50.000, 100.000, 500.000 e 1 milhão de células.mL<sup>-1</sup>).

Foram também incluídas análises das amostras de água apirogênica armazenadas em frascos plásticos esterilizados (branco), amostras contendo apenas meio de cultura BG11 (sem células) e as amostras salinas (5; 10; 15; 25; 30 e 35). O volume utilizado para as amostras salinas foi de 25 µL, acrescido de um padrão de endotoxina de 0,03



EU.mL<sup>-1</sup> também com 25µL. O que diluiu as amostras com salinidades, diminuindo a salinidade pela metade (2,5; 5; 7,5; 12,5; 15 e 17,5). As amostras foram realizadas em triplicatas, com exceção dos brancos que foram feitos em quadruplicatas.

### 2.7.8 Teste LAL n° 8

No oitavo e último teste LAL foram realizadas as repetições das amostras de concentração de células em salinidade zero e das amostras salinas (5; 10; 15; 25 e 30). Neste teste o volume utilizado para as amostras salinas foi de 50µL, sem acréscimo de padrão de endotoxina.

Tabela 1. Parâmetros modificados durante o desenvolvimento e adaptação da metodologia utilizada para os testes LAL.

<i>Teste LAL</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Agitação</i>	<i>Tipo de incubação</i>	<i>Linearidade da curva padrão(R<sup>2</sup>)</i>
1	30 e 45 minutos	moderada	Banho-termostático	R <sup>2</sup> = 0,7511
2	45 minutos	forte	Banho-termostático	R <sup>2</sup> = 0,0256
3	45 minutos	moderada	Banho-termostático	R <sup>2</sup> = 0,9618
4	45 minutos	forte	Banho-termostático	R <sup>2</sup> = 0,4643
5	40 minutos	leve	Estufa seca	R <sup>2</sup> = 0,9884
6	40 minutos	Leve	Estufa seca	R <sup>2</sup> = 0,9806
7	40 minutos	Leve	Estufa seca	R <sup>2</sup> = 0,9919
8	40 minutos	Leve	Estufa seca	R <sup>2</sup> = 0,9933

### 2.8 Tratamento Estatístico

Foi realizado o Teste Anova (uma via) para avaliar a relação entre os locais amostrados. Também, com os parâmetros de endotoxina (variável dependente), salinidade, temperatura e abundância celular, foi realizada a Correlação de Pearson (paramétrica) e de Spearman (não-paramétrica). Foram realizadas regressões lineares múltiplas entre a salinidade, temperatura, abundância celular e a concentração de endotoxina. Os tratamentos foram realizados com o software livre Estatística 6.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Parâmetros analisados do cultivo

A estimativa da concentração de clorofila-a das sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* RST9501, crescendo em diferentes salinidades (0; 1,0; 2,5 e 5,0), variaram de 6,41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para salinidade zero e 2,55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para salinidade cinco. A abundância celular também variou conforme a salinidades dos cultivos; quanto maior a salinidade, menor o número de células por volume. A variação foi de 810.000 céls. $\text{mL}^{-1}$  em salinidade zero a 190.000 céls. $\text{mL}^{-1}$  na maior salinidade (Tabela 2). No cultivo em salinidade 1,0 houve uma redução no número de células em relação ao cultivo em salinidade zero, sendo esta de aproximadamente cento e dez mil células da salinidade zero para a salinidade 1,0 (13,5% menos células por mL). Do cultivo em salinidade zero para o cultivo em salinidade 2,5 a abundância celular diminuiu em 430.000 células (redução de 53,1%). E para o cultivo em salinidade 5,0 a abundância celular diminuiu em 620.000 células por mL (diminuição de 76,5%).

A quantificação de microcistinas foi realizada no material intracelular e extracelular das sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* RST9501, nas diferentes salinidades (0; 1,0; 2,5 e 5,0). As maiores concentrações de microcistinas foram observadas no cultivo crescendo em salinidade zero (1,2  $\text{mg.L}^{-1}$ ; Tab. 2), com cerca de 30% a mais de toxina que a média das outras salinidades, sendo que apresentou cerca de 54,8% de suas toxinas no material intracelular. Nos cultivos com salinidade 1,0, 2,5 e 5,0 as concentrações de microcistinas no material intracelular diminuíram para 51,9%, 35,8% e 34,9%, respectivamente, conseqüentemente aumentando a concentração das microcistinas extracelulares (dissolvidas no meio). Nas salinidades 2,5 e 5,0 o maior percentual da concentração de microcistinas já se encontra presente no material extracelular.

As concentrações de LPS observadas acompanharam a tendência dos demais parâmetros, ou seja, as concentrações diminuíram conforme o aumento da salinidade dos cultivos de *Microcystis* RST9501. Observa-se na Tabela 2 as variações das estimativas das concentrações de microcistinas, da abundância celular, das estimativas

das concentrações de clorofila-a, e das concentrações de LPS dos resultados do teste LAL, nos cultivos crescendo em diferentes salinidades.

Tabela 2. Parâmetros analisados das sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* RST9501 crescendo em diferentes salinidades (0; 1; 2,5 e 5).

<i>Salinidade</i>	<i>Cl-a (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</i>	<i>Contagem celular (<math>\text{cél.s.mL}^{-1}</math>)</i>	<i>Microcistina intracelular (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</i>	<i>Microcistina extracelular (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</i>	<i>Microcistina Total (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</i>	<i>LPS (<math>\text{EU.mL}^{-1}</math>)</i>
0	6,41 ( $\pm 0,235$ )	810,000 ( $\pm 1,000$ )	684,07 ( $\pm 0,002$ )	563,00 ( $\pm 0,001$ )	1247,07	198,65 ( $\pm 0,004$ )
1	5,73 ( $\pm 0,247$ )	700,000 ( $\pm 0,530$ )	458,00 ( $\pm 0,004$ )	423,00 ( $\pm 0,002$ )	881,00	135,93 ( $\pm 0,0001$ )
2,5	3,35 ( $\pm 0,146$ )	380,000 ( $\pm 0,478$ )	301,20 ( $\pm 0,004$ )	538,49 ( $\pm 0,004$ )	839,69	121,27 ( $\pm 0,006$ )
5	2,55 ( $\pm 0,148$ )	190,000 ( $\pm 0,489$ )	302,58 ( $\pm 0,003$ )	561,30 ( $\pm 0,002$ )	863,88	106,62 ( $\pm 0,0001$ )

### 3.2 Parâmetros abióticos e bióticos das amostras ambientais

A temperatura foi medida próxima às margens dos locais de coleta e variou de 18°C a 23°C nos meses amostrados. Entre as coletas as temperaturas mais elevadas foram registradas nos meses de fevereiro e março de 2006, e as mais baixas foram entre os meses de dezembro de 2005 e janeiro de 2006 (Tabela 3).

As maiores salinidades foram encontradas no ponto de coleta da Praia do Cassino, nas amostras dos meses de janeiro, fevereiro e março. As salinidades registradas nas três amostragens foram, respectivamente, de 35, 30 e 32. No ponto de coleta da Praia do Laranjal a salinidade apresentou valores de zero para o mês de janeiro e de 5 para o mês de fevereiro. As amostragens realizadas no Museu Oceanográfico não apresentaram variações na salinidade, sendo ambas as amostragens em salinidade zero. O ponto de amostragem do Yacht Club, especialmente muito próximo ao do Museu Oceanográfico, registrou salinidade 10 no dia 14 de março de 2006 e salinidade 25 oito dias depois (22/03/2006). No ponto de coleta de São Lourenço do Sul a salinidade também foi zero para o mês de fevereiro (Tabela 3).

As estimativas das concentrações de clorofila-a das amostras ambientais apresentaram menor valor ( $0,005 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na Praia do Laranjal, durante o mês de janeiro de 2006, e o maior ( $31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em São Lourenço do Sul, durante a floração observada no final do mês de fevereiro de 2006. Nos demais períodos e pontos de coleta as concentrações de clorofila-a apresentaram, no geral, valores baixos (Tabela 3).

A abundância celular foi estimada em função da concentração dos grupos de organismos identificados. Os principais grupos fitoplanctônicos observados foram as cianobactérias (Divisão Cyanobacteria), diatomáceas (Classe Bacillariophyceae) e clorofíceas (Classe Chlorophyceae). Nestes três grupos, os principais representantes foram os gêneros *Microcystis*, *Coscinodiscus* e *Pediastrum*, respectivamente.

Nas amostras de água de superfície do ponto de coleta próximo ao Museu Oceanográfico foram observadas colônias da cianobactéria do gênero *Microcystis*, com densidade celular de  $600.000 \text{ céls.mL}^{-1}$  no início do mês de dezembro de 2005 (06/12), e de  $400.000 \text{ céls.mL}^{-1}$  na metade do mesmo mês (16/12). No mês de Janeiro de 2006, nas amostras de água coletadas na Praia do Laranjal, a predominância foi de células do grupo das diatomáceas, com concentrações celulares  $33,6 \text{ céls. mL}^{-1}$ . No mês seguinte (fevereiro de 2006) a concentração de diatomáceas permaneceu constante ( $36 \text{ cél.mL}^{-1}$ ), e pôde ser observado a presença de células da cianobactérias ( $370 \text{ céls.mL}^{-1}$ ). Foram

realizadas três amostragens na praia do Cassino. No dia 24/01/06 foram observadas densidades celulares de 172 céls.mL<sup>-1</sup> de diatomáceas. No dia 14/02/06 foram observadas 540 céls.mL<sup>-1</sup> de cianobactérias (*Microcystis*) e 2 células de clorofíceas (*Pediastrum*). E no dia 22/03/06 foram identificadas 194 céls. mL<sup>-1</sup> de diatomáceas (*Coscinodiscus* sp.). Foram realizadas duas amostragens no mês de março na região do Yacht Club de Rio Grande. Na amostragem do dia 14/03/06 foram identificadas 102 cél.mL<sup>-1</sup> de diatomáceas e 3 células.mL<sup>-1</sup> de clorofíceas. Na amostragem realizada no dia 22/03/06, foram identificadas 557 cél.mL<sup>-1</sup> de *Microcystis* sp. com colônias já senescentes (amareladas) e 2 células.mL<sup>-1</sup> de clorofíceas. Na amostragem realizada na Praia de São Lourenço do Sul foi observado uma floração da cianobactéria *Microcystis*, com aproximadamente 300.000 céls.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros das amostras ambientais e da concentração de endotoxinas (LPS).

<i>Amostras</i>	<i>Data da Coleta</i>	<i>Local</i>	<i>T</i> (°C)	<i>S</i>	<i>Cl-a</i> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<i>Cianobactérias</i> ( $\text{cél.s.mL}^{-1}$ )	<i>Diatomáceas</i> ( $\text{cél.s.mL}^{-1}$ )	<i>Clorofíceas</i> ( $\text{cél.s.mL}^{-1}$ )	<i>LPS (EU.mL<sup>-1</sup>)</i>
1	05/12/2005	Museu Oceanográfico	18	0	NR	600.000 ( $\pm 1,000$ )			109,5 ( $\pm 0,004$ )
2	16/12/2005	Museu Oceanográfico	19	0	NR	400.000 ( $\pm 0,578$ )			71,8 ( $\pm 0,004$ )
3	23/01/2006	Laranjal	20	0	0,018		33,6 ( $\pm 0,004$ )		39,0 ( $\pm 0,002$ )
4	24/01/2006	Cassino	19	35	1,021		172 ( $\pm 0,012$ )		28,1 ( $\pm 0,020$ )
5	14/02/2006	Laranjal	22	5	0,005	370 ( $\pm 0,10$ )	36 ( $\pm 0,001$ )		46,0 ( $\pm 0,020$ )
6	14/02/2006	Cassino	23	30	0,007	540 ( $\pm 0,014$ )		2 ( $\pm 0,001$ )	86,4 ( $\pm 0,008$ )
7	21/02/2006	São Lourenço	23	0	31	299.000 ( $\pm 0,548$ )			93,7 ( $\pm 0,001$ )
8	14/03/2006	Yacht Club	23	10	2,80		102 ( $\pm 0,021$ )	3 ( $\pm 0,001$ )	7,5 ( $\pm 0,1$ )
9	22/03/2006	Yacht Club	22	25	NR	557 ( $\pm 0,006$ )		2 ( $\pm 0,000$ )	82,9 ( $\pm 0,082$ )
10	22/03/2006	Cassino	21	32	NR		194 ( $\pm 0,004$ )		30,6 ( $\pm 0,138$ )

Para melhor identificação das amostragens ambientais realizadas, colocamos os dados das coletas sobre os pontos amostrados. Cruzando os dados de data das coletas, ou seja, os dias amostrados com identificação, abundância das células e concentração de (endotoxinas) LPS detectado nas amostras (Fig.6).

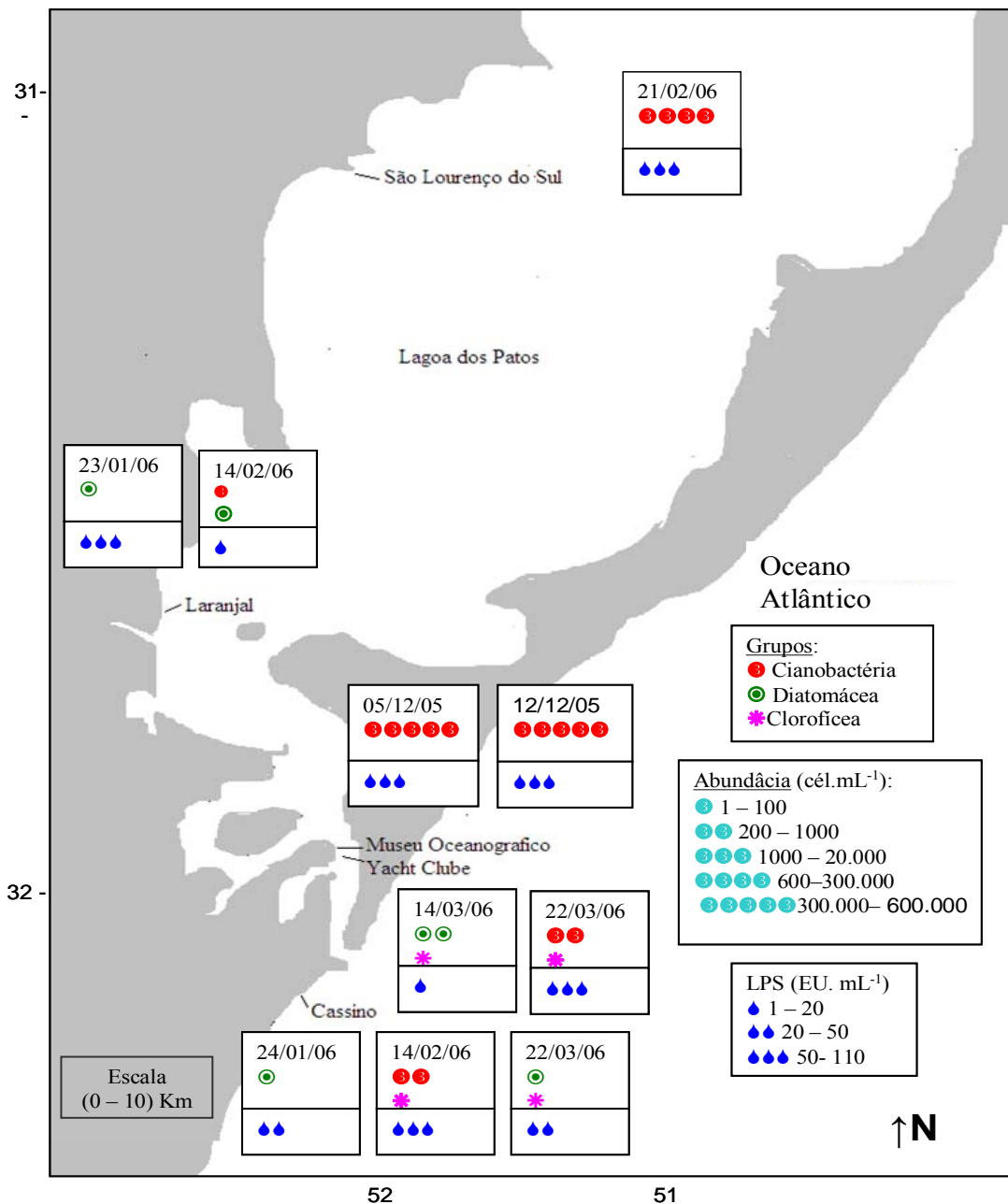


Figura 6. Mapa dos resultados das amostras ambientais com a apresentação dos parâmetros de identificação celular, estimativa da abundância celular e concentrações de endotoxinas.



### 3.3 Resultados dos testes do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL)

Durante a execução dos testes LAL (1 ao 8) foram realizados ajustes na metodologia dos testes para obter uma linearidade de 0,980. Os melhores resultados obtidos na adequação e otimização do método foram: 1) a substituição do banho termostático pela incubação a seco (estufa), garantindo uma temperatura de incubação mais constante e sem possíveis interferentes na leitura, pelo contato do fundo da placa com o meio líquido da incubação; 2) a diminuição do tempo de incubação de 45 minutos para 40 minutos (apesar desse fator não ter sido testado isoladamente em um único experimento); 3) a substituição da agitação forte (vórtex) e agitação moderada (à mão) pela agitação lenta, reduzindo a perda da sensibilidade do reagente LAL. As combinações das alterações citadas acima resultaram em uma linearidade aceitável pelo método, conforme já demonstrado na Tabela 1 da seção Materiais e Métodos.

Abaixo estão descritos em detalhes os resultados dos testes LAL realizados, como descritos na seção Materiais e Métodos, onde é possível se observar detalhadamente os passos das alterações metodológicas e os resultados obtidos com a evolução da metodologia.

#### 3.3.1 Teste LAL nº 1

Os primeiros testes foram realizados com objetivo de ajustar o tempo de incubação e manusear os reagentes e equipamentos. Neste primeiro teste, a concentração maior de endotoxina ( $0,5 \text{ EU.mL}^{-1}$ ) apresentou um valor de absorbância inferior ao valor da metade de sua concentração ( $0,25 \text{ EU.mL}^{-1}$ ) nos dois tempos de incubação testados (30 e de 45 minutos). Os resultados não apresentaram um valor aceitável para curva padrão, recomendado no método. A leitura foi realizada quinze minutos após a reação ser interrompida, o que pode ter interferido nos resultados, tendo um possível decréscimo na absorbância por ser um teste colorimétrico (Roslansky, 1991). Decorrido o tempo de incubação de 45 minutos, a reação foi interrompida e imediatamente realizada a leitura.

#### 3.3.2 Teste LAL nº 2

No segundo teste, os resultados das concentrações obtidas da curva padrão foram muito próximos, sendo este teste o que apresentou o pior resultado ( $R^2 = 0,0256$ ; Tabela 1). Estes resultados foram insatisfatórios, havendo uma homogeneização nos valores. Para a

reconstituição do reagente LAL é necessário cuidado para diluir o lisado na solução tampão; a agitação foi demasiada e provavelmente o reagente perdeu a sensibilidade analítica (Novitsky, 1984). Em consequência, os cálculos das concentrações de endotoxinas para as amostras não foram realizados.

### 3.3.3 Teste LAL nº 3

O terceiro teste mostrou um resultado melhor para a curva padrão, que foi mais próximo do aceitável, recomendado pelo método. Porém, novamente, a concentração de 0,5 EU.mL<sup>-1</sup> apresentou um valor de absorvância menor que a concentração de 0,25 EU.mL<sup>-1</sup>. Na avaliação da linearidade da curva padrão ( $R^2 = 0,9618$ ) este ponto foi excluído do cálculo. O ideal seria utilizar no mínimo cinco pontos para o cálculo da equação da reta, portanto este resultado também se mostrou insatisfatório.

### 3.3.4 Teste LAL nº 4

No quarto teste os resultados das concentrações de LPS para a construção da curva padrão ficaram, novamente, homogêneos, com valores próximos, resultando em um baixo  $R^2$ . Assim como no teste LAL nº 2, a agitação forte não foi adequada, resultando em linearidade insatisfatória. As concentrações de endotoxina para as amostras não foram calculadas em virtude do resultado das concentrações da curva padrão.

### 3.3.5 Teste LAL nº 5

Frente às inconstâncias nos resultados, no quinto teste LAL alguns parâmetros metodológicos foram radicalmente alterados. Foi utilizada uma incubadora seca (estufa), uma diminuição no tempo de incubação (40 min), e a adoção de agitação lenta durante a reconstituição do reagente LAL. Com isso, obteve-se uma curva padrão (com valores satisfatórios para todas as concentrações de LPS da curva) que apresentou um  $R^2$  aceitável para o método ( $R^2 = 0,9884$ ; Tabela 1). Desta forma o cálculo das concentrações de endotoxinas presentes nas amostras foi realizado. As concentrações de endotoxina (LPS) das amostras ambientais podem ser observadas na Figura 6 (e Tabela 3).

Os maiores valores encontrados foram para as amostras coletadas na região do Museu Oceanográfico, em dezembro de 2005 (109,5 EU.mL<sup>-1</sup>), seguido das amostras da floração de

São Lourenço do Sul e da água da Praia do Cassino, em fevereiro de 2006, e das amostras da região do Yacht Club de Rio Grande, em março de 2006. O valor mais baixo encontrado para as análises de LPS das amostras ambientais também foi na região do Yacht Club de Rio Grande, em março de 2006, numa amostragem anterior (8 dias antes; vide Tabela 3).

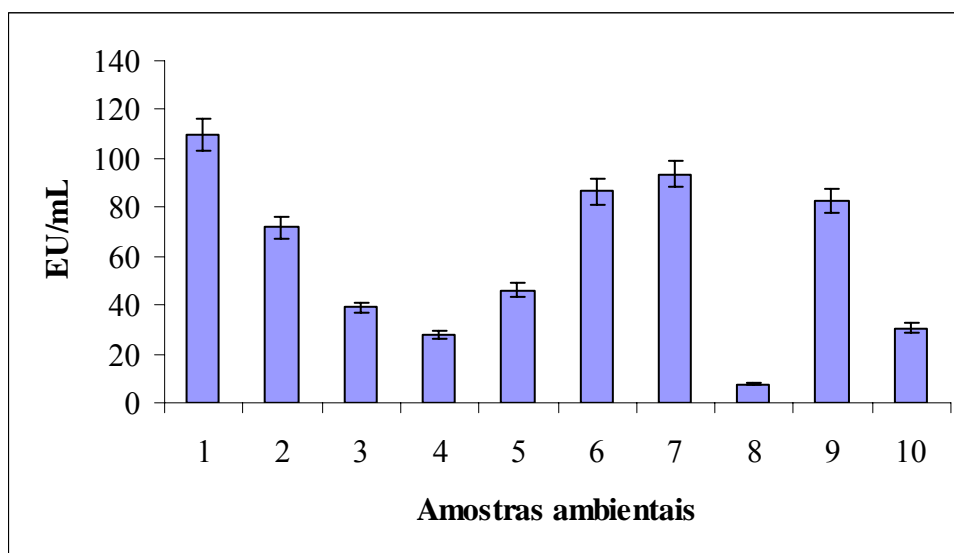


Figura 6. Estimativa da concentração de endotoxina (LPS) das amostras ambientais. Os locais e datas de coleta referentes a cada amostra estão descritos na Tabela 3. Os valores representam a concentração média de LPS ( $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) das análises em duplicata, e as barras indicam o desvio padrão.

### 3.3.6 Teste LAL nº 6

Devido ao bom resultado obtido com a curva padrão do teste LAL nº 5, o sexto teste foi repetido com exatamente o mesmo procedimento metodológico. Juntamente com a curva padrão ( $R^2 = 0,9806$ ; Tabela 1), neste teste foi realizada a análise das sub-amostras dos cultivos celulares crescidos em salinidade zero, de diferentes concentrações celulares (10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1 milhão e 4 milhões células. $\text{mL}^{-1}$ ).

Na quantificação de endotoxinas (LPS) presentes nas sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* RST9501, a maior concentração ( $198,65 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi observada no cultivo crescendo em salinidade zero, justificada pela maior abundância celular (Figura 7 e Tabela 2). A concentração de endotoxina na salinidade 1 é aproximadamente  $136 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , pouco menor que a concentração apresentada na salinidade zero. Na salinidade 2,5 a concentração de endotoxina é de aproximadamente  $121 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$  e na salinidade 5,0 a concentração de

endotoxina é de aproximadamente  $106 \text{ EU.mL}^{-1}$ . A concentração de LPS para as sub-amostras dos cultivos foi inversamente proporcional à salinidade: quanto maior a salinidade, menor a abundância celular e menor a concentração de LPS nas sub-amostras, conforme a Figura 7.

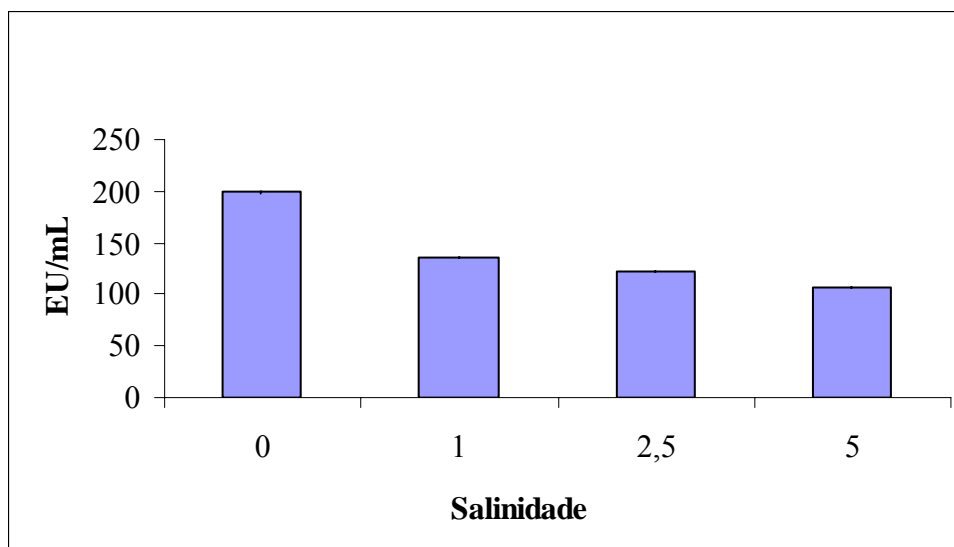


Figura 7. Estimativa da concentração de LPS das sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* RST9501 crescidos em diferentes salinidades. Os valores representam a concentração média de LPS ( $\text{EU.mL}^{-1}$ ) das sub-amostragens em duplicata. Os desvios-padrão, apesar de plotados, foram muito baixos, por isso não podem ser visualizados no gráfico.

### 3.3.7 Teste LAL n° 7

No teste LAL n° 7 as análises foram realizadas nas sub-amostragens com salinidades 2,5; 5,0; 7,5; 12,5; 15,0 e 17,5 e nas concentrações celulares de 10.000, 50.000, 100.000, 500.000 e 1 milhão de células. $\text{mL}^{-1}$ , essas crescidas em meio com salinidade zero. A curva padrão apresentou  $R^2 = 0,9919$  (Tabela 1). As concentrações de endotoxina das sub-amostras com salinidade e da abundância de células apresentaram valores com variações pequenas. Os valores das concentrações de endotoxinas para as sub-amostras com salinidade variaram de  $0,6 \text{ EU.mL}^{-1}$  para a menor salinidade e  $1,4 \text{ EU.mL}^{-1}$  para a maior salinidade.

Neste teste LAL também foram analisadas as sub-amostras das diferentes abundâncias celulares conhecidas em salinidade zero. Na concentração celular de  $10.000 \text{ céls.mL}^{-1}$  a concentração de endotoxina foi  $1,07 \text{ EU.mL}^{-1}$  e para a concentração de 1 milhão células. $\text{mL}^{-1}$  a concentração foi de  $1,82 \text{ EU.mL}^{-1}$ . As concentrações de endotoxinas das sub-amostras

quantificadas neste teste para as concentrações celulares aumentaram conforme aumentou-se o número de células presentes nas amostras.

Também foram analisadas amostras de meio de cultivo (BG11) sem células de *Microcystis*. A média de endotoxina quantificada das amostras (triplicata) foi de 1,5 EU.mL<sup>-1</sup>. Esta concentração pode ser explicada pelo fato do próprio meio BG11 ser composto por sais dissolvidos (Ripka *et al.*, 1979) e da utilização de água destilada (não-apirogênica) para sua manufatura.

### 3.3.8 Teste LAL nº 8

No oitavo e último teste também foram realizadas as análises das sub-amostras com apenas sais dissolvidos (5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 30,0 e 35,0) e com as amostras de concentrações celulares de 10.000, 50.000, 100.000, 500.000 e 1 milhão de células.mL<sup>-1</sup>. A curva padrão apresentou a melhor linearidade (R<sup>2</sup> = 0,9933). As sub-amostras com salinidade e das concentrações celulares se mantiveram com valores próximos, com pouca variação na concentração das endotoxinas, como no teste anterior. Os valores das concentrações de endotoxinas para as sub-amostras com salinidade apresentaram 1,11 EU.mL<sup>-1</sup> para menor salinidade e 1,6 EU.mL<sup>-1</sup> para a maior. Os valores das concentrações de endotoxinas para as sub-amostras com concentrações de células apresentaram 1,26 EU.mL<sup>-1</sup> para menor concentração e 1,73 EU.mL<sup>-1</sup> para a maior concentração de células.

Os resultados dos testes LAL nº 7 e 8 estão interpretados juntos nos mesmos gráficos (Fig. 8 e 9), pois as sub-amostragens analisadas se repetiram em ambos os testes. Para as sub-amostras com apenas a presença de sais foram repetidos as salinidades de 5 a 17,5).

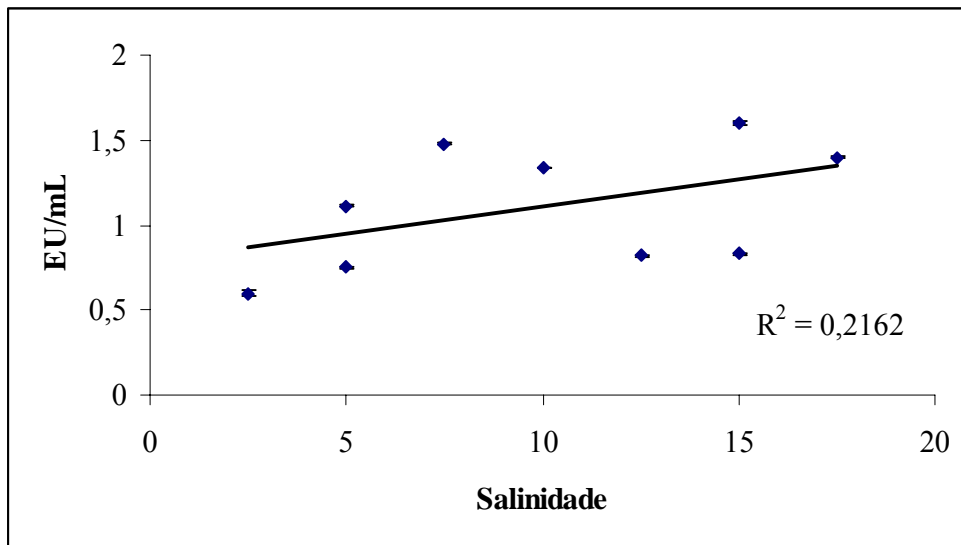


Figura 8 – Estimativa da concentração de endotoxinas (LPS) das sub-amostras contendo apenas sais dissolvidos, dos resultados dos testes LAL 7 e 8.

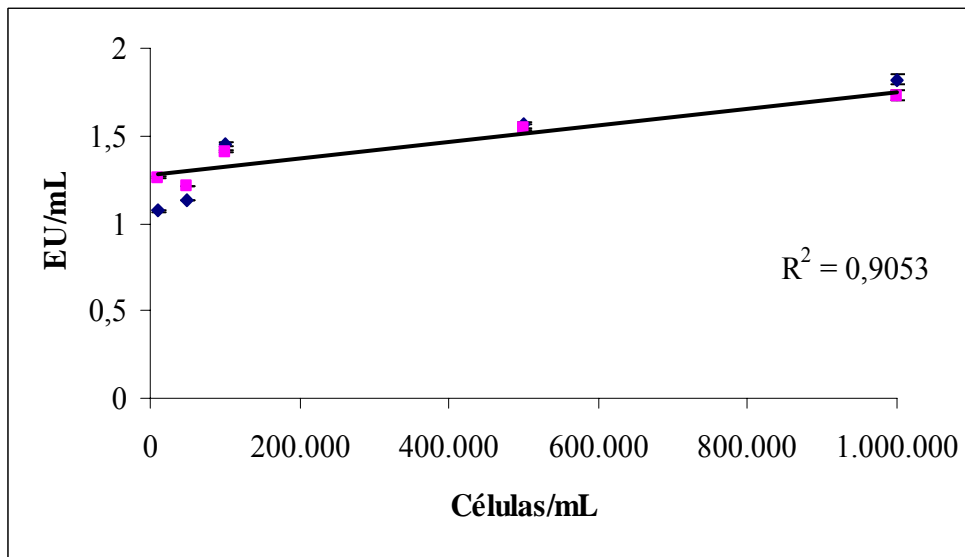


Figura 9 – Estimativa da concentração de endotoxinas (LPS) das sub-amostras dos cultivos com concentrações celulares conhecidas, dos resultados dos testes LAL 7 e 8.

#### 4. Resultados do tratamento estatístico

Foi realizado o tratamento estatístico sobre os resultados dos testes LAL para melhor interpretação dos parâmetros (local da amostragem, salinidade, temperatura, abundância de células e concentração de endotoxina das amostras), e verificação das correlações entre esses parâmetros. O tratamento considerou os meses amostrados como uma mesma estação (verão). A ANOVA demonstrou que não houve diferença estatística entre os locais amostrados. Há uma tendência que indica que as maiores concentrações de células e de endotoxinas estão na

região do Museu Oceanográfico e uma tendência que indica que há uma menor concentração de células e de endotoxinas na região da Praia do Laranjal (Figura 10).

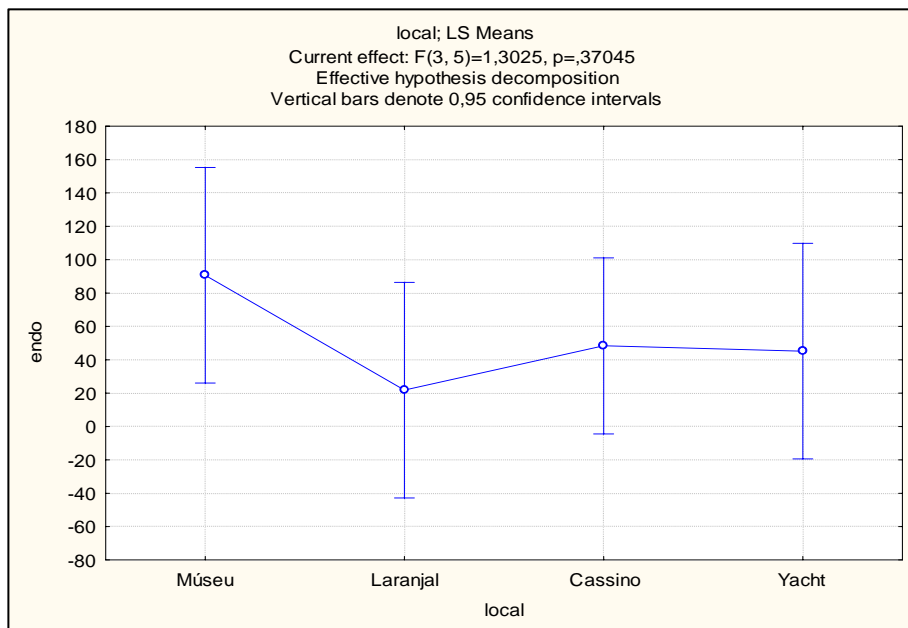


Figura 10 – ANOVA entre os locais amostrados. O programa utilizado (Estatística 6.0) para esta análise não incluiu a coleta realizada em São Lourenço do Sul por ter uma única amostragem, enquanto que os demais locais possuem, no mínimo, duas amostragens.

Foi realizada uma regressão linear múltipla com o conjunto de parâmetros (salinidade, temperatura e abundância celular) com a concentração de endotoxinas como variável dependente. Esta análise mostrou que a variação de endotoxinas é melhor explicada (62%, ou seja, com um coeficiente de determinação  $r = 0,62$ ) pela variação da abundância celular.

A correlação de Pearson apresentou uma correlação linear de ( $r = 0,67$ , 95% limite de confiança) entre os parâmetros abundância celular e concentração de endotoxinas. Essa correlação indica uma relação direta e proporcional entre a abundância celular e a concentração de endotoxinas, sendo este o parâmetro que apresenta o melhor índice de correlação significativa (Tabela 4). A variável endotoxina apresentou uma correlação negativa ( $r = -0,60$ ) com a salinidade, o que indica uma tendência da salinidade interferir na concentração de endotoxinas (via abundância celular). Também possuem uma correlação não paramétrica (de Spearman), com  $r = 0,72$  e 95% de confiança, entre os parâmetros abundância celular e concentração de endotoxinas, que reforça a relação proporcional entre a concentração de endotoxinas e abundância celular. A salinidade também apresentou, na correlação de Spearman, uma correlação negativa ( $r = -0,40$ ) em relação à concentração de

endotoxinas, com uma tendência da salinidade interferir na (diminuição) abundância celular (Tabela 5).

A temperatura apresentou relação negativa com a concentração de endotoxinas, mas não tem significância estatística, pois nas maiores abundâncias celulares a temperatura média foi de 18 °C e em abundâncias celulares menores a temperatura registrada foi superior, fato que pode ter influenciado e mascarado os resultados das análises, além do fato de ter variado pouco.

Tabela 4. Coeficientes de determinações (r) de correlações de Pearson entre os parâmetros analisados.

	<i>Células</i>	<i>Endotoxina</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Salinidade</i>
<i>Células</i>		0,67	-0,53	-0,60
<i>Endotoxina</i>	0,67		-0,16	-0,17
<i>Temperatura</i>	-0,53	-0,16		0,16
<i>Salinidade</i>	-0,60	-0,17	0,16	

Tabela 5. Coeficientes de determinações (r) de correlações não paramétricas de Spearman entre os parâmetros analisados.

	<i>Células</i>	<i>Endotoxina</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Salinidade</i>
<i>Células</i>		0,72	-0,20	-0,40
<i>Endotoxina</i>	0,72		-0,08	-0,39
<i>Temperatura</i>	-0,20	-0,08		0,16
<i>Salinidade</i>	-0,40	-0,39	0,16	



#### 4. DISCUSSÃO

Nos cultivos de *Microcystis* RST9501 crescidos em diferentes salinidades (0; 1,0; 2,5 e 5,0) foram analisados parâmetros bióticos (clorofila-a, estimativa da abundância celular e concentração de microcistinas) para avaliar sua correlação com os resultados da quantificação de LPS obtidos pela aplicação do teste LAL.

As concentrações de clorofila-a encontradas para as sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* em diferentes salinidades variaram de acordo com os resultados da abundância celular. Ou seja, o cultivo em salinidade zero apresentou a maior concentração de clorofila-a e também a maior abundância celular, e as concentrações de clorofila-a diminuem conforme diminuem a abundância de células por mL e aumenta a salinidade presente no meio. Em termos quantitativos, os percentuais de biomassa (avaliados pela estimativa da abundância celular e pela concentração de clorofila-a) dos cultivos crescendo em salinidades, quando comparados com o cultivo crescendo em salinidade zero, foram semelhantes (diminuição no número de células em 13,5%, 53,1% e 76,5% para as salinidades de 1,0, 2,5 e 5,0, respectivamente; e diminuição das concentrações de clorofila-a em 10,9%, 48,5% e 60,1% para as mesmas salinidades). A biomassa medida tendo com base a contagem celular apresenta valores sempre maiores, em relação à estimativa da concentração de clorofila-a, provavelmente devido ao maior erro amostral da metodologia (como pode ser também observado pelos maiores valores dos desvios-padrão, vide Tab. 2).

Esses resultados indicam a interferência dos sais sobre o desenvolvimento das células de *Microcystis*. No experimento realizado em laboratório, com a salinidade fixa nos cultivos de *Microcystis*, as células podem ter sofrido um processo de adaptação, entretanto foi observada a diminuição das células nas maiores salinidades. Salomon (1999) observou que com o aumento gradativo da salinidade sobre os cultivos de *Microcystis* ocorre a diminuição da biomassa e crescimento das células, indicando o efeito estressante dos sais nesses organismos. A introdução de sais em pequenas concentrações diárias nos cultivos permite que as células se adaptem melhor à alteração no meio. As células de *Microcystis* demonstram uma adaptação fisiológica às baixas salinidades, porém com o aumento abrupto da salinidade as células de cianobactérias podem romper-se (lise celular) e liberar material intracelular para o meio (Salomon, 1999; Matthiensen, 2000).

As concentrações de microcistinas totais dos cultivos de *Microcystis* RST9501 crescendo em diferentes salinidades apresentaram a maior concentração na salinidade zero. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que os percentuais da compartimentalização das

toxinas (i.e., a quantidade de toxina intra e extracelular), em cada salinidade, foram alterados. Ou seja, nos cultivos crescendo em salinidades maiores há uma maior percentagem de toxina extracelular em relação à concentração intracelular, confirmando o potencial estressante dos sais, apesar de ainda ser observado crescimento mesmo na salinidade mais elevada (5,0). Segundo Salomon (1999) as células de *Microcystis* demonstram flexibilidade fisiológica a tolerar salinidades baixas. Porém o aumento da salinidade tem reflexo sobre o metabolismo e o crescimento de uma cepa, inibindo a assimilação de nitrogênio combinado, fotossíntese, respiração, além de provocar a liberação e o acúmulo de compostos orgânicos (nitrogenados) no material extracelular das células. Se submetidas ao estresse salino as células de *Microcystis* podem entrar em declínio (sofrer lise) e liberar compostos orgânicos (intracelulares) no meio extracelular, como as microcistinas. Do mesmo modo, em um ambiente natural quando as florações de cianobactérias provenientes de um corpo d'água doce entram em contato com um corpo d'água salgado (e.g. a desembocadura de um estuário), as células começam a entrar em declínio (morrem), liberando grandes quantidades de material orgânico para água (Berg *et al.*, 1987). Porém, independentemente do estresse salino, compostos orgânicos também são liberados no meio extracelular durante o crescimento de cianobactérias (Hino, 1988), como pôde ser observado pelas concentrações relativamente elevadas de microcistinas extracelulares no cultivo de *Microcystis* crescendo em salinidade zero ( $563 \mu\text{g.L}^{-1}$ , ou aproximadamente 45%; Tab. 2).

Apesar dos parâmetros medidos nos cultivos em diferentes salinidades seguirem as mesmas tendências, i.e., as concentrações de clorofila-a, microcistinas intracelulares, LPS e abundância celular diminuirão com o aumento da salinidade (Tabela 2), o cálculo de unidade de LPS por unidade de qualquer outro parâmetro celular não permanece o mesmo. Ou seja, quando realizado o cálculo da quantidade de LPS por célula (ou por quantidade de clorofila-a, ou por quantidade de microcistina intracelular), se observa sempre um aumento na quantidade de LPS por unidade (seja qual for o parâmetro). Por exemplo, nos cultivos crescendo em salinidades 2,5 e 5,0 é observada uma diminuição pela metade da abundância de células, mas a concentração de endotoxina não apresenta essa mesma diminuição. Fato que remete à possível interferência dos sais da cultura no teste LAL. Parte da resposta em concentração de  $\text{EU.mL}^{-1}$  pode ser atribuída aos sais presentes nos meios de cultivo de *Microcystis*.

Foram realizados dois testes LAL (experimentos 7 e 8) com concentrações celulares de (10.000, 50.000, 100.000, 500.000 e 1 milhão células.mL<sup>-1</sup>) em salinidade zero. Fazendo uma regressão linear com os resultados dos dois testes LAL se obtém uma linearidade de  $R^2 = 0,905$ . Estas quantificações foram realizadas com amostras que foram congeladas e

descongeladas por quatro vezes para promover a lise das células, porém estes valores de endotoxina EU.mL<sup>-1</sup> podem representar uma parte das células das amostras, apenas as que sofreram a lise (rompimento). O tratamento dado às amostras de células pode não ter sido o mais eficaz, uma vez que a centrifugação das amostras, durante a metodologia, pode sedimentar uma boa parte do LPS contido na membrana das células. Porém, uma relação direta e linear foi encontrada, e estão de acordo com os tratamentos estatísticos das amostras ambientais (relação direta entre LPS e abundância celular).

Foram realizados também dois testes LAL com amostras contendo apenas sais dissolvidos (2,5; 5,0; 7,5; 12,5; 15,0 e 17,5), sem a presença de células de *Microcystis*. As concentrações de endotoxinas quantificadas para as diferentes salinidades sugerem que o sal possui interferência no teste. Apesar da baixa linearidade, que pode ser função de erro analítico na pesagem dos 5 diferentes sais usados no experimento (Ripka *et al.*, 1979), uma relação direta pôde ser visualizada (Fig. 8).

As coletas das ambientais realizadas para este trabalho foram amostragens pontuais, o objetivo foi garantir amostras com a presença de células de organismos, principalmente células de *Microcystis* para posterior quantificação de endotoxinas através do teste LAL cromogênico do ponto final.

As concentrações de clorofila-a foram, em geral, baixas, com exceção da amostra de 21/02 de São Lourenço do Sul (31 mg.L<sup>-1</sup>), que refletiu a condição de floração observada e confirmada na contagem celular (299.000 céls.mL<sup>-1</sup>). Nas outras ocasiões de elevadas concentrações celulares (05/12/2005 e 16/12/2005) não foi possível realizar a estimativa da concentração de clorofila-a (Tab. 3). Pôde ser observado nas amostragens que as maiores abundâncias celulares ambientais foram do grupo das cianobactérias, particularmente o gênero *Microcystis*, uma cianobactéria de água doce, portanto, sua correlação positiva com a baixa salinidade está apropriada. Como já dito antes, as células de *Microcystis* apresentam certa tolerância à salinidade, observado por um processo de osmoregulação característico aos organismos que sofrem estresse do meio pela quantidade de sal presente no ambiente (Salomon, 1999). Na região do Yacht Club de Rio Grande, no período de 22/03/06, as células de *Microcystis* coletadas apresentavam sinais de senescência (amareladas), estágio no qual as células iniciam seu declínio. Porém, provavelmente esse fator não afete o resultado do teste LAL, já que o LPS é uma molécula estável e fica preservada na composição da membrana das células de bactérias Gram-negativas (Chorus & Bartram, 1999; Black, 2002).

As células dos organismos encontradas nas amostragens foram liofilizadas antes da quantificação de endotoxinas (LAL); as amostras que tinham a salinidade entre 10 e 35

apresentavam visíveis quantidades de sais. As análises foram realizadas com as células e o sal presente na amostra. Foram realizados cálculos (regras de três) para determinar as quantidades de sais (marinhos) presentes nessas amostras. Na amostra da Praia do Cassino (22/03/06) de salinidade 35, por exemplo, temos 3,5% de sal na amostra. Da solução de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,35 mg são de sais presentes na amostra, o que provavelmente pode ter superestimado o resultado da concentração de endotoxina para esta amostra, assim como as demais amostras que possuíam quantidades significativas de sais. Todas as amostras ambientais apresentaram valores de concentrações de endotoxinas. A resposta do teste LAL para a quantificação de endotoxinas, serviu para mostrar que o teste tem sensibilidade suficiente para quantificar LPS de amostras ambientais. E sugere que o tratamento dado para as amostras antes da aplicação do teste foi adequado para posterior quantificação de endotoxinas.

As concentrações de endotoxinas encontradas para as amostras ambientais que não foram identificadas células de *Microcystis* pode ser explicada pela presença de outras bactérias Gram-negativas nas amostras, por outros possíveis parâmetros bióticos e abióticos não analisados, e pela salinidade do local. Fatos que reforçam a idéia de uma possível contaminação destas amostras, além do fato de que a salinidade superestima a concentração de endotoxinas (Dawson,1996; Dawson, 1997).

Os interferentes do método são abordados pelo FDA (1987) e USP (1994). Cada método LAL utilizado para quantificação de endotoxinas deve estar adequado para eliminar ou tratar seus interferentes (Cooper, 1990). A grande maioria das substâncias testadas, como reagentes, fármacos, hemodiálise, alimentos e água potável, pelo Teste LAL apresentam interferência, exceto quando a amostra é de água “pura”. Geralmente o teste LAL é mais sensível do que o necessário para detectar o limite de endotoxinas no produto, material ou de uma dada amostra (soluções, reagentes, vidrarias) (Twohy *et al.*, 1984). Frequentemente é possível desaparecer com a interferência diluindo a amostra a um ponto em que o fator de interferência cessa, não mais afetando o teste. A diluição é a técnica mais simples e a mais extensamente usada para superar esse tipo de interferência, sendo eficaz na maioria dos casos, não podendo ultrapassar os limites da máxima diluição válida (MDV) que é regulada de acordo com cada espécie de análise, necessitando de testes prévios (Dawson, 1996).

Basicamente existem dois tipos de interferentes: o realce e a inibição. A inibição ocorre quando um material interfere com a habilidade do reagente LAL de reagir com a endotoxina, subestimando a quantidade de endotoxina presente. O realce é a interferência que aumenta a sensibilidade do ensaio, tendo por resultado o superestimação da concentração de

endotoxina da amostra. Uma compreensão dos mecanismos da interferência pode, às vezes, ajudar ao desenvolvimento de uma estratégia.

Podemos citar algumas das interferências mais comuns e apontadas pelo próprio método. O pH da própria reação não deve ser ajustado; o pH da substância ou amostra deve ser ajustado em um pH entre 6,0 - 8,0. Entretanto, é possível que o pH do produto fique fora dessa escala, mas que o pH da mistura de reação fique dentro dela, por causa da capacidade tampão do reagente do teste LAL (Pyrochrome® é uma exceção, porque é fornecido com um amortecedor, tampão de reconstituição). No caso das amostras de cultivo e das amostras ambientais de estuários, este problema normalmente é superado, pois geralmente o pH ambiental se encontra na faixa ótima adotada pelo método. Águas mais ácidas, provenientes de rios e córregos, necessitariam de uma medição prévia antes do uso do teste, e um ajuste adequado.

Os cátions divalentes também influenciam a reatividade da endotoxina e da reação de LAL (Horner, 1999). Os cátions são atraídos a neutralizar a carga negativa de endotoxina, reservando a agregação, aumentando o potencial e diminuindo atividade, que é observada com a inibição da resposta. Os cátions divalentes são requeridos também para a sensibilidade do LAL, mas o excesso das concentrações inibe a reação. A diluição é a solução usual para este problema. São muitas as interferências sobre o teste LAL. Dependendo da análise que se deseja realizar, cabe ao experimentador saber desenvolver seu trabalho a modo de eliminar ou de conhecer melhor a ação de seus interferentes no método LAL utilizado.

Quando a interferência por sais (ou por outras moléculas pequenas) não puder ser superada pela diluição, a endotoxina pode ser separada das substâncias pela ultrafiltração. Neste trabalho esse procedimento não foi realizado para que fosse possível observar a interferência do sal das amostras ambientais e das sub-amostras do cultivo sobre o teste LAL. Mesmo descontando as concentrações de endotoxinas nos sais presentes no meio BG11 e nos experimentos com salinidades diferentes, sem a presença de células de *Microcystis*, os valores de concentrações de endotoxinas encontrados, tanto para as sub-amostras dos cultivos de *Microcystis* quanto para as amostras ambientais, são valores elevados. Principalmente onde foi encontrado as maiores concentrações de endotoxinas das amostras ambientais, como as amostras da região do Museu Oceanográfico e de São Lourenço do Sul. Elas merecem mais atenção, e são motivo de preocupação uma vez que ultrapassam e muito o número de células ( $50.000 \text{ células.mL}^{-1}$ ) permitido em águas (resolução 357 do CONAMA) com atividades de recreação, navegação e pesca. A presença de uma concentração de células de *Microcystis* maior que  $50.000 \text{ células.mL}^{-1}$  podem acarretar problemas de saúde quando estas águas são

ingeridas ou as pessoas são expostas por um tempo prolongado, como em atividades de recreação e lazer. Os sintomas destas exposições a florações de cianobactérias como a *Microcystis* vão desde febre, dores pelo corpo, náuseas, vômitos diarréias, irritações na pele como também problemas de saúde mais graves causados pelas toxinas que também estão presentes nesses organismos (Pilotto *et al.*, 1997; Yunes *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2006).

Frente a isso, a necessidade de se ter mais uma ferramenta metodológica estabelecida, como o teste LAL, para análises e/ou monitoramento de águas (estuarinas e de praias), é um passo importante para garantir a qualidade e a balneabilidade positiva de áreas recreacionais. Guardando se as devidas proporções e estando ciente dos respectivos interferentes, seu potencial de aplicação no ambiente pode ser estendido para águas de interesse para o consumo humano, podendo também este tipo de análise (quantificação de endotoxinas) ser utilizado (adaptado) para detectar a presença de LPS em organismos aquáticos como peixes, moluscos e pequenos crustáceos.

### **CONCLUSÕES:**

Com as análises dos parâmetros clorofila-a, estimativa da abundância celular, salinidade e a quantificação de endotoxinas (teste LAL), apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

Os sais (salinidade) presentes nas amostras de cultivo de *Microcystis* e nas amostras ambientais interferem no resultado do teste LAL.

O teste LAL mostrou sensibilidade analítica para quantificar a concentração de (endotoxinas) LPS das amostras ambientais.

Os ajustes feitos na metodologia, tempo de incubação de 40 minutos, incubação seca em estufa e agitação leve para a reconstituição do lisado de *Limulus*, garantem uma linearidade de 0,980 aceita pelo método.

#### **Referências:**

ABDULLA, D., GORALSKI, K.B., & RENTON K.W. 2006. The regulation of cytochrome P450 during LPS-induced inflammation in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216 (2006) 1–10.

ANDERSON, D.M., CEMBELLA A.D. & HALLEGRAEFF, G.M. 1998. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Nato Asi series G: Ecol. Science 41; 665p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - [www.anvisa.com.br](http://www.anvisa.com.br) ([www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469\\_00.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469_00.htm)), acessado em 10/03/2007.

APHA, AWWA, WPCF. 2001. Métodos normalizados para el análisis de águas potables y residuales. (Ed.) Diaz de Santos, AS Madrid. 10-310-47.

BANG, F.B. & FROST, J.L. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. *Biol. Bull*; 105:361-362.

ASMUS, M.L. 1998. A Planície Costeira e a Lagoa dos Patos. In: Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. U. Seeliger, C. Odebrecht e J.P. Castello. Editora Ecoscientia. Rio Grande – RS.

BERG, K., SKULBERG, O.M., SLULBERG, R. 1987. Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality a laboratory study. *Archv. Hydrobiol.* 30: 21-29.

BOMMER J. & RITZ, E. 1987. Water quality - a neglected problem in hemodialysis. *Nephron* ; 46: 1-6.

BOX, J.D. 1981. Enumeration of cell concentrations of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. *Brit. Phycol. J.* 153-164.

BLACK, J. G. Microbiologia – Fundamentos e perspectivas. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BROCK, T.D & MADIGAN, T.M. 2003. Biology of Microorganisms (Eds.). *Prentice Hall* New Jersey, 387-425.

CASTELLO, J.L. 1978 (coord.), Projeto Lagoa. Relatório do 1º a 15º Cruzeiro, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pp. 1-9.

CALLIARI, L. J. 1980. Aspectos sedimentológicos e ambientes da região sul da Lagoa dos Patos. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Geociências, 190p.

CARMICHAEL, W.W. 1994. The toxins of cianobactérias. *Scientific American*, 270 (1): 64-72.

CHETIENNOT-DINET, M.J. 1990. Atlas du phytoplankton marin. CNRS. Paris 262pp.

CHORUS, I. & BARTRAM, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon: London and New York, 1999.

CHORUS, I. & BARTRAM, J. 1999. Health risks caused by freshwater cyanobacteria. In: Recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health* Vol. 4 pp. 323-347



CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 020, de 18 de junho de 1986. Classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. <http://www.lei.adv.br/020-86.htm>, acessado em 12/04/2006.

CODD, G.A; MORRISON, L.F & METCALF, J.S. 2004. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24: 10p.

COOPER, J.F. 1990. Resolving LAL Interferences. *Journal of parenteral Science e Technology*, v. 29 n° 11, p. 2477-2483.

CONRAD, M. L., PARDY R.L., WAINWRIGHT N., CHILD A. & ARMSTRONG P. B. 2006. Response of the blood clotting system of the American Horsecrab, *Limulus polyphemus*, to a novel form of LPS from a green alga.

DAWSON, M. E. 1996. Preliminary Testing. *LAL Update*, 14 (1).

DAWSON, M. E. 1996. Inhibition or Enhancement Testing: Part 1. *LAL Update*, 14 (4).

DAWSON, M. E. 1997. Inhibition or Enhancement Testing: Part 2. *LAL Update*, 15 (1).

DESIKACHARY, T.V. 1959. *Cianophyta*. Indian Council of Agricultural Resech, New Delhi. 681p.

FALCONER, I.A. 1999. An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Gree Algae (Cyanobacteria) in Drinking and Recreation Water. *In: LIU, D.L & DUTKA, B.J.(Eds), Environ. Toxic.*, 14 (1): 5-12.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1980.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1987. Guideline on general principles of Process Validation, US Food and Drug Administration, Maryland, USA

FOOG, G.E.; STWART, W.P.D.; FAY, P. & WALSBY, A.E. 1973. *The blue green algae*. Academic Press. Londres.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. [www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br) , acessado em 15/04/2007.

GOULD M.J. 1988. Performing the LAL Gel-Clot Test in Facilities. *Nephrology News&Issues* (2) ,11 : 26-29.

GORDON, S.M. 1988. Pyrogenic Reactions Associated with the use of disposable hollow fiber hemodialyzers. *JAMA, J. Am. Med. Assoc. Chicago*. V.260, no 14, p.2077-2081.

HAIDER, S., NAITHANI, V., VISWANATHAN, P.N. & KAKKAR, P. 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosph.* 52:1-21.

HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M. & CEMBELLA, A.D. 1998. *Manual on Harmful Marini Microalgae*. IOC Manuals and Guides, 33. UNESCO, 551p.

- HARDING, G.B., KLEIN E., PASS, T. & MILLION C. 1990. Endotoxin and bacterial contamination of dialysis center water and dialysate: a cross sectional survey. *The International Journal of Artificial Organs* 13: 39-43.
- HAVENS, K.E., JAMES, R.T., EAST, T.L. & SMITH, V.H. 2003. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution.
- HOWELL, W.H. 1885. Observation upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43: 4-5.
- HARADA, K., KONDO, F., SUZUKI, M. & WATANABE, M.F. 1995. Structural analyses of cyanobacterial toxins. In: CODD, G.A., JEFFERIES, T.M., KEEVIL, C.W. & POTER, E. 1995. Detection Methods for Cyanobacterial Toxins. *The Royal Society of Chemistry*. pp 24.
- HINO, S. 1988. Extracellular release of organic matter associated with the physiological state of freshwater blue-green algae. *Arch. Hydrobiol.* 113 (2): 307-317.
- HORNER, R. 1999. Estudo da influência de cátions e ânions na quantificação de endotoxinas Bacterianas em fluídos de hemodiálise pelo uso do Lisado de Amebócito de *Limulus*(LAL). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, pp39.
- KANTIN, R. & BAUMGARTEN, M. G. Z., 1982. Observações hidrográficas no estuário da Lagoa dos Patos: distribuição e flutuação dos sais nutrientes. *Rio Grande, Atlântica*, 5: 76-92.
- KJERFVE, B. 1986. Comparative Oceanography of Coastal Lagoons. In: Estuarine Variability. Wolfe, D.A. (Ed.). Academic Press, New York, pp. 63-81.
- KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; SANT' ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. & SENNA, P.A., 2002. Two common *Microcystis* species from tropical América. *Criptogamie/Algologie* 23: 159-177.
- KOMÁREK, J. 2003. Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In: J. D. Wehr & R. G. Sheath (eds.). *Freshwater algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier Science (USA), 918 p.
- LEÃO, J.C., 2004. Retenção de microcistinas em organismos filtradores nativos do Estuário e Costa adjacente da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado. FURG – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, p. 90.
- LINDSAY, G.K., ROSLANSKY, P.F. & NOVITSKY, T., 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 27:947-951.
- LINDSAY, G.K., METCALF, J.S. & COOD, G.A., 2006. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia spp.* By pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 48 995-1001.
- MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140

MATTHIENSEN, A. 1996. Ocorrência, distribuição e toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (Kutz. Emend. Elenkin) no estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado. FURG – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, p.117.

MATTHIENSEN, A. 2000. Environmental and laboratory studies on the properties and fate of microcystis from the cyanobacterium *Microcystis*. Tese de Doutorado. University of Dundee, 308p.

MATTHIENSEN, A. YUNES, J.S. & CODD, G.A., 1999. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos patos, RS. *Ver. Brasil. Biol.*, 59(3):361:376.

MENEZES, M. & BICUDO, C.E.M., 2005. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil – chave para identificação e descrições. Editora Rima, 508p.

MORALES, E., RODRIGUEZ M., GARCIA, D., LORETO, C. & MARCO E. 2002. Effect of pH and CO<sub>2</sub> on growth, pigments and exopolysaccharides production from cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 *Intercience*. 27 (7): 373-378.

MOROTE, M., OTERO M., & CHAVEZ G. 2002 Validación de la Técnica L.A.L. (GEL CLOT) en los Agentes de Radiodiagnóstico y Radioisótopos. *Alasbimn Journal*, Year 4, Number (16).

MUCK, A., RAMM M. & HAMBURGER, M., 1999. Efficient method for preparation of highly purified lipopolysaccharides by hydrofobic interaction chromatography. *Biomedical Science Appl.* 732 (1): 39-46.

NOVITSKY, T. J., "Monitoring and Validation of High Purity Water Systems with the Limulus Amoebocyte Lysate Test for Pyrogens," *Pharm. Eng.* (reprinted) (Mar./Apr. 1984).

NRK. 1992. National Rivers Authority/United King. Regulations.

ODEBRECHT, C., SEELIGHER, U., COUTINHO, R., & TORGAN, L.C. 1987. Florações de *Microcystis* (cianobactérias) na Lagoa dos Patos, RS. Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e sudoeste brasileira: Síntese dos Conhecimentos. Cananéia, SP, 280-287.

ODEBRECHT, C., AZEVEDO, S.M.F.O., GARCIA, V.M.T., HUSZAR, V.L.M., MAGALHÃES, V. F., MENEZES, M., PROENÇA, L.A.O., ROGIG, L.R., TENENBAUM, D.R., VILLAC, M. C. & YUNES, J.S. 2002 Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: Estado del arte y proyectos en curso. In: SAR, EA; FERRARIO, M.E; REGUERA, B. (eds.) 2002. Floraciones algales nocivas en el cono sur Americano. Instituto Español de Oceanografía. 219-233.

PEARSON, F. C. 1985. Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation. New York: Marcel Dekker.

PINTO, T. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T. 2000. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, cosméticos e correlatos. São Paulo: Atheneu, 2000.

- PILLOTO, L.S., DOUGLAS, R.M., BURCH, M.D., CAMERON, S., BEERS, M. & ROUCH, G.J. 1997. Health effects of exposure to Cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust N Z L Public Health*. 21(6):562-566.
- RAZIUDDIN, S., SIEGELMAN, H.W., TORNABENE, T.G. 1983. Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry* 137 (1-2), 333-336.
- RAMM, M.; LOBE, M. & HAMBURGER, M. 2003. A simple method for preparation of D-ramnose. *Carbohydrate Research*. Vol. 338(1):109-112.
- RAPALLA, J.; LAHTI, K.; RASANEN, L.A.; ESALA, A.; NIEMELÄ, S.L. & SIVONEN, K. 2002. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. *Wat. Res.* 36: 2627-2635.
- REYNOLDS, C.S., & JAWORSKI, G.H.M. 1978. Enumeration of Natural Microcystis Populations. *Br. Phycol. Jour.*, 13: 269-277.
- REGUERA, B., BLANCO, J., M.L. FERNANDES & WYATT, T. 1997. Harmful Algae. Xunta de Galicia, IOC/UNESCO, 635p.
- RIPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDAN, M. & STANIER, R.Y. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *Journal Hydrobiolgy.*, 111(4):553-545.
- RICARD, M. 1986. Atlas du phytoplancton marin. Vol. 2 CNRS. França 298pp.
- ROSLANSKY, PF & NOVITSKY, TJ. 1991. Sensitivity of *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans. *J Clin Microbiol* 29:2477-2483.
- SANT'ANNA, L.C., AZEVEDO, M.T.P., AGUIJARO, L.F., CARVALHO, M.C., CARVALHO, L.R. & SOUZA, R.C.R. 2006. Identificação e Contagem de Cianobactérias Plantônicas de águas brasileiras.
- SALOMON, P.S. 1999. O efeito de salinidade sobre o crescimento e metabolismo de uma cepa de cianobactéria produtora de toxinas (*Microcystis aeruginosa* RST9501) isolada do estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado. FURG - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, p. 112.
- SILVA, L.M. 2005. Ocorrência de cianobactérias no estuário e costa adjacente á Lagoa dos Patos-Rio Grande-RS: avaliação preliminar dos riscos a balneabilidade. Dissertação de Mestrado- FURG - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, p. 116. (a)
- SILVA, L.M., MATTHIENSEN, A. & YUNES, J.S. 2004. Efeitos hematológicos para determinação de endpoints alergênicos causados por cianobactérias. Resumo do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. 231p.
- SILVA, D. 2005. Dinâmica de populações de *Microcystis* (Cyanobacteria) em pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. SP, p.158. (b)

SHAPIRO, J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO<sub>2</sub> and pH. *Verh. Internat. Verein Limmol.* 24:38-54.

SOURNIA, A. 1986. Atlas du phytoplankton marin. Vol. 1 CNRS. França. 220pp.

STANIER, R.Y., KUNISAWA R., MANDEL, M., COHEN-BAZIREG, 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 171-205.

STEWART, I.; ROBERTSON I. M.; WEBB P. M.; SCHLUTER P.J. & SHAW, G. R. 2006 Cutaneous hypersensitivity reactions to freshwater cyanobacteria-human volunteer studies. *BMC Dermatology*, 6:6.

STEWART, I., SEAWRIGHT, A.A., SCHLUTER, P.J., & SHAW, G.R. 2006. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. *BCM Dermatol.* 6:5.

STEIN, J.R. 1973. Culture Methods & Growth Measurements. Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. pp. 307-311.

TWOHY, C. W., DURAN A. P. & MUNSON, T. E. 1984. Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the *Limulus* amoebocyte lysate method. *J. Parenter. Sci. Technol.* 38:190-201.

UNESCO, 1981. Phytoplankton Manual. *Muséum National d'Histoire Naturelle*, Paris. Edited by A. Sournia, pp 172.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. Changes Medical Devices, 1994. Chapter: LAL Update 12 (4).

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000. 24<sup>a</sup> edição, United States Pharmacopeial Convention, Rockville.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA – Bacterial Endotoxins Test, 2003.

VASCONCELOS, V.M. & PEREIRA, E. 2001. Cyanobacteria diversity and toxicity in a Wastewater Treatment Plant (Portugal). *Water Research* 35:1354-1357.

WINN-WILIANS, 2000. Symbiotic Interations. In: WHITTON, B.A. & POTTS, M. (Eds.). The ecology of Cyanobacteria. Chapter 19. *Public Academic Publishers*. Netherlands. 5523-553.

YASUMOTO, T. OSHIMA, Y. And FUKUYO, Y. 1996. Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC/UNESCO, 586p.

YUNES, JS. NIENCHESKI, L.F.H. SALOMON, P.S. PARISE, M. BEATTIE, K.A. RAGGET, S.T. & CODD, G.A. 1998. Effect of nutrient balance and physical factors on

blooms of toxic Cyanobacteria in the Patos Lagoon, southern Brazil. *Verh. Internat. Verein Limmol.* 26: 1796-1800.

YUNES, J. S., NIENCHESKI, L. F. H., SALOMON, P. S., PARISE, M., BEATTIE, K. A., RAGGETT, S. L. & CODD, G. A., 1994. *Development and toxicity of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil*. IOC Workshop Report (COI/UNESCO), 101, III, 14-19.

YUNES J.S., SALOMON, P.S, MATTHIENSEN A., BEATTIE K.A, RAGGET S.L. & CODD G.A. 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in te Patos Lagoon estuary, southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*; 5:223-9.