

## Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico

S. M. Sanches<sup>1</sup>, E.M. Vieira<sup>2</sup>, E. L. Prado<sup>3</sup>, F. Benetti<sup>4</sup>, A. M. M. Takayanagui<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-902, Ribeirão Preto – SP.

<sup>2</sup>Instituto de Química de São Carlos, USP, Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13560 -970, São Carlos - SP.

<sup>3</sup>Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-902, Ribeirão Preto – SP

<sup>4</sup>Instituto de Química de São Carlos, USP, Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13560 -970, São Carlos - SP.

<sup>5</sup>Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-902, Ribeirão Preto – SP.  
eny@iqsc.usp.br

**Resumo:** Algumas cepas de algas, em especial as cianobactérias, podem produzir toxinas como as microcistinas, as quais podem ocasionar intoxicação e morte de seres humanos e de animais. A literatura reporta a ocorrência de um acidente em uma clínica de hemodiálise de Caruaru, Pernambuco, aonde vieram a falecer 60 pacientes que faziam hemodiálise, devido à presença da toxina microcistina-LR na água. Nesse estudo foi desenvolvido e validado um método analítico, para a determinação e quantificação da microcistina-LR. A cromatografia líquida de alta performance com detector de UV foi empregada como técnica analítica para a determinação de microcistina-LR. Os parâmetros selecionados para a validação do método foram: linearidade, curva analítica, precisão, sensibilidade e ensaios de recuperação. A curva analítica foi construída com sete pontos a partir do padrão. O método apresentou uma linearidade no intervalo de 0,05 a 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e o coeficiente de correlação foi superior a 0,99. Com base nestes resultados conclui-se que o método é eficiente e pode ser empregado, em futuras análises, para o monitoramento da microcistina-LR em água utilizada em clínicas de hemodiálise.

*Palavras-chave:* água; validação; microcistina-LR.

### Introdução

A água é de vital importância para todos os seres vivos, porém a porcentagem de água potável ainda existente no Planeta, está se tornando insignificante comparada ao volume de água não potável disponível. Mesmo assim, o uso irracional da mesma continua ocorrendo em todo o mundo.

No Brasil não é diferente, principalmente porque possui uma vasta bacia hidrográfica, o que dá a falsa impressão de que se pode usá-la indiscriminadamente, sem risco de não haver oferta [1].

A qualidade da água se tornou uma questão de interesse para a saúde pública no final do século XIX e início do século XX, sendo ante-

riormente associada apenas a aspectos estéticos e sensoriais, tais como a cor, o gosto e o odor [1]. Entretanto na Grécia Antiga utilizavam-se técnicas como, a filtração, a exposição ao sol e fervura, para melhorar a qualidade da água [2].

A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre a qualidade de água e inúmeras enfermidades que cometem os seres humanos, especialmente aquelas não atendidas por serviços de saneamento [3].

No Brasil, as péssimas condições sanitárias verificadas em muitas das bacias hidrográficas densamente e desordenadamente ocupadas, resultam na degradação generalizada das águas e, dos

recursos hídricos [3]. É realidade comum o lançamento de esgotos domésticos *in natura*, efluentes industriais ricos em nutrientes, carreamento de fertilizantes utilizados na lavoura e dejetos oriundos da criação de animais domésticos criados nas mediações de cursos de água, ou em locais sem infra-estrutura adequada.

Como conseqüência ocorre a eutrofização, de águas e estas se tornam propícias à proliferação excessiva de algas o que vem a comprometer a sua qualidade e conseqüentemente, restringindo a sua utilização para abastecimento público [4].

Algumas cepas de algas, em especial as do grupo cianofíceas ou cianobactérias, podem produzir toxinas, devido à morte ou lise celular e podem lesar o fígado (hepatoxinas), e o sistema nervoso (neurotoxinas), ou somente irritar a pele [5].

As cianobactérias causam gosto e odor desagradáveis na água, porém o maior problema está no fato de que essas produzem toxinas, denominadas de microcistinas [6].

Segundo Chen et al., 1996 as microcistinas são muito resistentes a altas temperaturas e mantêm a toxicidade mesmo após a fervura, podendo levar indivíduos a uma maior incidência de câncer hepático, é até mesmo a morte [7].

Na cidade de Caruaru, estado de Pernambuco, em 1996 ocorreu uma tragédia, na qual foram vitimadas mais de 50 pessoas sob tratamento por meio de hemodiálise, na qual foi utilizada água contaminada com a microcistina-LR. A microcistina encontrada na água utilizada na hemodiálise possui uma ação mais potente quando aplicada diretamente na corrente sanguínea, do que quando ingerida [3].

O Ministério da Saúde editou a portaria nº 518, de 25 de março de 2004, a qual estabeleceu o valor máximo de microcistinas permitido na água de abastecimento público em  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , porém para águas de abastecimento de hospitais que realizam hemodiálise, esse valor tem que ser igual à zero [8].

Portanto, torna-se necessário o monitoramento de microcistinas em água destinada à população e ao uso em serviços de saúde pública, para evitar todos os riscos potenciais adversos à saúde humana.

Os principais objetivos deste trabalho foram o de desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação da microcistina-LR em água destinada aos serviços de saúde pública e verificar a qualidade da água utilizada na Central de Hemodiálise do hospital Escola da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto-SP.

## Material e métodos

### Procedimento

#### *Validação do método para a determinação da microcistina-LR*

Para assegurar-se da credibilidade dos dados nas análises quantitativas da microcistina-LR, deve-se fazer a validação do método. No presente trabalho considerou para a validação analítica do método os fatores, curva analítica e linearidade, sensibilidade, precisão e fator de recuperação.

#### *Seleção do comprimento de onda utilizado em HPLC-UV*

Foi obtido um espectro de absorção do padrão da microcistina-LR, que compreendeu uma varredura de 200 a 800 nm. Utilizou-se um Espectrofotômetro de UV/Visível da marca Hitachi, modelo U3501.

#### *Condições cromatográficas ideais para a determinação da microcistina-LR em água utilizada em serviços de saúde pública*

As determinações analíticas da microcistina-LR foram feitas na Central de Análises Químicas do Instituto de Química de São Carlos-USP empregando um cromatógrafo com detector de arranjo de diodos, da marca SHIMADZU CBM-10A. Foi utilizada uma coluna de fase reversa de aço inoxidável ( $\text{C}_{18}$ ), da marca Rexchrom S5-100-ODS, de 15 cm de comprimento, diâmetro interno de 4,6 mm e o tamanho de partícula de  $5 \mu\text{m}$ . As condições cromatográficas ideais para a análise da microcistina foram: Detector UV-Vis; Fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume injetado de  $20,0 \mu\text{L}$ ; comprimento de onda a 238 nm; temperatura ambiente, fase móvel acetonitrila/água 35-65%, com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), método isocrático.

#### *Preparo da curva analítica e linearidade*

Após determinar as condições cromatográficas ideais para a análise de microcistina-LR construiu-se a curva analítica. Esta foi preparada a partir de um padrão da marca Supelco na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  com seis pontos, onde cada ponto foi feito em triplicada, com as respectivas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5;  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todos os pontos da curva analítica foram preparados utilizando o solvente metano/água 80-20%. Estas soluções foram analisadas em ordem crescente de concentração e nas especificações descritas no item condições cromatográficas ideais para a determinação da microcistina-LR em água utilizada em serviços de saúde pública.

### Precisão

Para a determinação da precisão, cada ponto foi feito em quintuplicata, em três níveis de concentrações: 0,3; 2,0 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estes valores foram selecionados por possuírem concentrações dentro da faixa linear utilizada, porém as concentrações foram diferentes das utilizadas na curva de calibração.

### Extração em fase sólida e ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação foram feitos em quintuplicata, em três níveis de concentração: 2,0; 4,0 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Inicialmente fez-se o acondicionamento do adsorvente C 18 com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água destilada. Após o acondicionamento, adicionou-se separadamente em cada cartucho de C 18 10 mL de cada amostra, controlando-se o fluxo em aproximadamente 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Deixou-se o adsorvente secar por 2 h. Os cartuchos foram lavados com 10 mL de metanol 10%, e na fase final eluídos com 10 mL de metanol grau HPLC. As frações obtidas foram concentradas sob corrente de nitrogênio, e analisadas em um cromatógrafo em fase líquida, utilizando as condições já pré-estabelecidas no item condições cromatográficas ideais para a determinação da microcistina-LR em água utilizada em serviços de saúde pública.

### Coleta e análise da amostra de água utilizada na central de hemodiálise do Hospital Universitário da Escola de Medicina de Ribeirão Preto quanto à presença da Microcistina-LR

As amostras de água foram coletadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados, mantidos em isopor com gelo e transportadas ao laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos - USP, onde foram armazenadas em geladeira a 4 °C. Fez-se a pré-concentração das amostras em 200 vezes, utilizando-se o processo de extração em fase sólida (SPE). A extração das amostras foi feita em triplicata, e analisadas em um cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos, da marca SHIMADZU CBM-10A

## Resultados e discussão

### Espectro de UV e cromatograma do padrão da microcistina-LR

Obteve-se o espectro de absorção do padrão da microcistina-LR Figura 1, na região de 200 a 800 nm. O comprimento de onda correspondente a absorção máxima do analito em estudo, que foi selecionado para a determinação analítica empre-

gando-se um cromatógrafo em fase líquida com detector de UV-Vis, foi de 245 nm.

Na Figura 2 esta apresentada o cromatograma do padrão da microcistina-LR. Diferentes condições foram testadas para se obter uma boa separação e resolução do pico referente à microcistina-LR. A melhor condição foi acetonitrila/água 35/65 (v/v), e o tempo de retenção do solvente e da microcistina-LR foram respectivamente de 1,768 e de 6,663 minutos.

Verifica-se pelo cromatograma que o pico cromatográfico referente a microcistina-LR está bem definido.

### Linearidade da curva analítica a ser usada para a determinação da microcistina-LR em água utilizada em serviços de saúde

A linearidade é a região do sistema de detecção no qual o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do analito.

Para determinar a região linear como resposta analítica do detector para a microcistina-LR estudada, no intervalo de 0,05 a 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foi construída uma curva analítica, no eixo y área do pico cromatográfico e no eixo X a respectiva concentração da microcistina-LR.

Na Tabela 1 são apresentadas as áreas médias dos picos obtidas em função da concentração, equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (r) da curva analítica obtida para a microcistina-LR.

A curva analítica obtida para a microcistina-LR Fig.(3) foi linear, apresentando coeficiente de correlação (r) superior a 0,99, Tabela 1, sendo que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária [9] recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial um valor acima de 0,90 [10].

Este coeficiente de correlação foi satisfatório, o que demonstra que a resposta do detec-

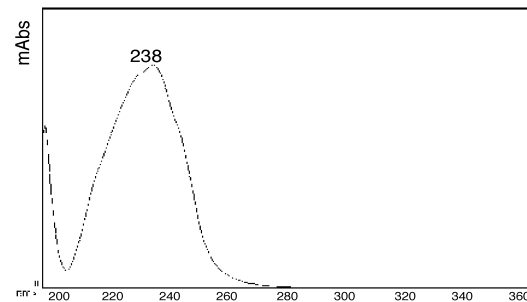
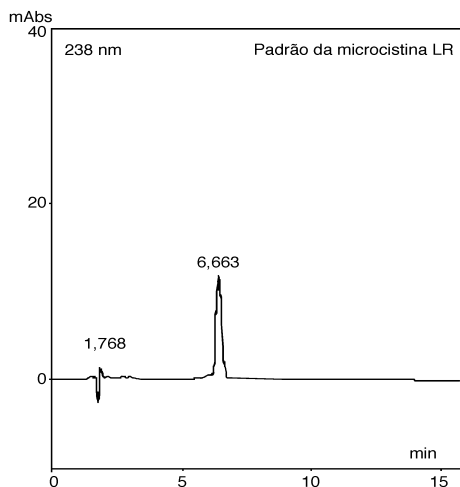


Figura 1. Espectro de UV do padrão da microcistina-LR.



**Figura 2.** Cromatograma do padrão da microcistina-LR.

tor foi linear nos intervalos de concentração empregados nesse estudo [11].

Na Figura 3 está representada a curva analítica para a microcistina-LR.

*Sensibilidade da técnica analítica para a determinação da microcistina-LR presente em amostras de água utilizadas em serviços de saúde.*

Da equação da reta, pôde-se estimar a sensibilidade da técnica, definida como  $dy/dx$ , que apresentou valor de 32888,77913, que é considerado como de sensibilidade alta.

Do ponto de vista prático, a sensibilidade é o coeficiente angular da curva analítica. Segundo Ribani [11] uma técnica sensível é aquela que uma pequena diferença de concentração do analito causa uma grande variação no valor do sinal analítico.

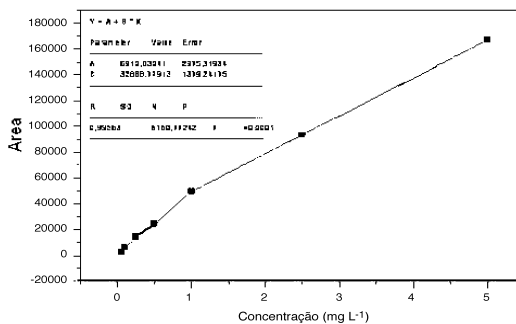
### Precisão do método

A precisão em validação de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Neste estudo a precisão do método foi avaliada referente ao nível de repetibilidade. A repetibilidade apresenta a concordância entre os resultados de medidas sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições que são chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em curto intervalo de tempo [11].

A International Conference on Harmonization [12] e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária [9], sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado no procedimento empregado, três níveis, três repetições para cada um, ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado [11].

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos ( $n=5$ ), ao nível de repetibilidade, sendo portanto,



**Figura 3.** Curva analítica para a microcistina-LR.

**Tabela 1.** Concentrações da microcistina – LR empregadas, área média, equação de regressão linear e coeficiente de correlação (r).

Concentração da microcistina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Área média	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (r)
0,05	2662,00	Y= 6910,83041 + 32888,77913 X	r= 0,99563
0,10	6021,00		
0,25	13959,67		
0,50	24329,33		
1,00	49755,67		
2,50	93538,00		
5,00	167264,67		

**Tabela 2.** Resultados do estudo da precisão do método para a determinação da microcistina-LR.

Composto	Concentração adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração média obtida ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV (%)
Microcistina-LR	0,30	0,33	8,96
	2,00	2,41	4,74
	4,00	3,98	0,71

feita em um curto intervalo de tempo. Na Tabela 2 encontra-se apresentado os resultados da precisão.

Para o estudo da precisão, os intervalos dos coeficientes de variação são considerados adequados até  $\pm 20\%$ , dependendo da complexidade da amostra. Para este método os coeficientes de variação variaram de 0,71 a 8,96% (Tabela 2), e foram inferiores aos valores apresentados por Ribani et al, (2004), sendo portanto, considerado preciso, e dentro da faixa aceitável para a validação de métodos analíticos [11]. Para aumentar a precisão do método deve-se aumentar o número de replicatas.

#### Ensaio de Recuperação

A Tabela 3 apresenta a porcentagem de recuperação da microcistina-LR em água, para os três níveis de fortificação estudados: 0,3; 2,0 e 4,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Os ensaios de recuperação foram feitos em quintuplicata.

Analisando-se a Tabela 3, observa-se que houve uma recuperação boa, isso indica que o método empregado é apropriado para a análise da microcistina-LR presente em água utilizada em hemodiálise, pois o valor está dentro dos limites aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos que é de 70 a 120% [13]. Porém dependendo da complexidade da amostra, a faixa de recuperação pode ser de 50 a 120% [13].

As porcentagens de recuperação obtidas evidenciaram que o método pode ser considerado exato e preciso. A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos ( $n=5$ ), apresentando valores de 0,34 a 4,21%, inferiores a 20% para este método, sendo considerado preciso [11].

**Tabela 3.** Porcentagens de recuperação da microcistina-LR em amostras de água coletadas na Central de Hemodiálise do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP.

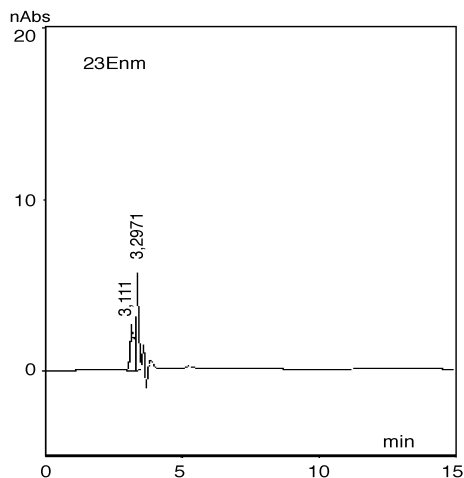
Nível de fortificação ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Recuperação (%)*	CV (%)
0,3	91 (89 – 94)	0,34
2,0	80 (78 – 81)	1,26
4,0	93 (90 – 98)	4,21

#### Análise da água utilizada na Central de Hemodiálise do Hospital Escola de Ribeirão Preto-SP

Antes da análise das amostras, as mesmas foram pré-concentradas em colunas de extração em fase sólida C 18 em 200 vezes. Este procedimento foi feito em triplicata.

Na Figura 4 encontra-se o cromatograma referente a amostra de água do Hospital Escola de Ribeirão Preto-SP.

Analisando-se o cromatograma observa-se apenas os picos referentes aos solventes no tempo de retenção 3,111 e 3,2971, e não é observado nenhum pico na região de 5,8 min que é o tempo de retenção da microcistina-LR. Isso indica que a microcistina-LR não está presente na amostra de água coletada na Central de análise do Hospital Escola de Ribeirão Preto-SP.



**Figura 4.** Cromatograma da água coletada na Central de Hemodiálise do Hospital Escola de Ribeirão Preto-SP.

## Conclusões

Atualmente há uma crescente preocupação com a presença da toxina microcistina-LR em água, e seus possíveis impactos à saúde, visto que esta pode ocasionar a intoxicação e morte de pessoas. Fato este ocorrido, em uma clínica de hemodiálise de Caruaru, Pernambuco, aonde vieram a falecer 60 pacientes que faziam hemodiálise. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos para o monitoramento desta toxina.

O método desenvolvido e empregado mostrou-se eficiente estando de acordo com as normas estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores (ANVISA, INMETRO e ICH). Cabe ressaltar que durante o desenvolvimento e avaliação de um método, os procedimentos analíticos devem ser submetidos à validação estatística com o

objetivo de conhecer suas limitações e confiabilidade dos resultados obtidos para a aplicação do método para amostras que se deseja analisar.

A água utilizada para a diluição dos sais utilizada na Central de Hemodiálise do Hospital Escola de Ribeirão Preto encontra-se livre sença da microcistina-LR, indicando que o sistema utilizando para o tratamento da água, antes de sua deionização mostrou-se eficiente.

## Agradecimentos

S. M. Sanches agradece a Capes pela bolsa de doutorado concedida.

Recebido em: 12/07/2007

Aceito em: 05/10/2007

S. M. Sanches, E.M. Vieira, E. L. Prado, F. Benetti, A. M. M. Takayanagi. Study of the presence of the microcystin-LR toxin in water utilized haemodialysis clinic and validation of an analytical method.

---

**Abstract:** Some strains of seaweed, especially of the cyanobacterial type, can produce toxins as such microcystins, which are responsible for the intoxication and death of animals and humans. Literature report on the occurrence of accidents at a haemodialysis clinic in Caruaru, Pernambuco, Brazil, 60 haemodialysis patients died due to the presence of this toxin in the water. This study developed and validated of an analytical method, to quantified microcystin-LR using the High-Performance Liquid chromatography with detector UV. The following parameters were chosen: linearity, calibration curve, precision, sensibility and assays of recovery. The calibration curve, obtained with seven points, and the correlation coefficients in the were higher than 0.99. The method obtained an linearity in the interval between 0.05 to 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and the correlation coefficients more than 0.99. Based on these results, the method is considered efficient and can used to monitor microcystins in water. utilized in clinics of haemodialysis.

*Keywords:* water; validation; microcystin-LR.

---

## Referências

- [1] M. B. Freitas, C. M. Freitas, *Ciência & Saúde Coletiva*. 10 (2005) 993.
- [2] Usepa (United States Environmental Protection Agency). 1999. 25 years of the safe drinking water act: history and trends. Disponível em < [www.epa.gov/safewater/consumer/trendrpt.pdf](http://www.epa.gov/safewater/consumer/trendrpt.pdf).
- [3] J. A. B. MACÊDO, *Águas e Águas*, CRQ-MG, Belo Horizonte, 2004, 977p.
- [4] L. P. H. Ferreira. Remoção da biomassa algal e determinação da concentração de microcistina pelo método Elisa em ensaios de coagulação, sedimentação, filtração e adsorção. São Carlos; 2004. 130p. Dissertação (Mestrado) - EESC - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [5] T. A. M. Msagati, B. A. Siane, D. D. Shushu., *Aquatic toxicology*. 78 (2006) 382.
- [6] I. Moreno, G. Repetto, E. Carbalal, A. Gago, A. M. Cameán, *Intern.J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005) 461.
- [7] W. W. Carmichael, *J. Appl. Bacteriol.* 72 (1992).445.

- [8] BRASIL. (Ministério da Saúde). Portaria n° 518/2004, de 25 de Março de 2004: estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.
- [9] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); 2003, Resolução RE n.899, de 29/05/2003.
- [10] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial(INMETRO); 2003, *Orientações sobre validação de métodos de ensaios*, DOQ-CGCRE-008.
- [11] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. & JARDIM, I. C. S. F., 2004, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova.* ,27(5): 771-780.
- [12] Internacional Conference on Harmonization (ICH), Q2A: *Validation of Analytical Procedures: Definitions and terminology*, Q2A (CPMP/ICH/381/95),1995.
- [13] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 10 de junho de 2007.