

## DETERMINAÇÃO DE TOXINA MICROCISTINA EM ÁGUAS NATURAIS COM O USO DE IMUNOSSENSOR DESCARTÁVEL

Jocimara Camargo da Silva<sup>1</sup>

Kamily da Matta Navarro<sup>2</sup>

Angelo L. Gobbi<sup>3</sup>

Renata Kelly Mendes<sup>4</sup>

Eixo temático: Saúde, Segurança e Meio Ambiente

### RESUMO

As cianobactérias representam uma séria ameaça à saúde pública devido à capacidade de liberação de toxinas em águas, como a microcistina, que causam efeitos deletérios aos consumidores, podendo levar a óbito. Assim, iniciou-se uma procura por métodos sensíveis e confiáveis para a determinação dessas espécies de maneira rápida, seletiva e eficaz, destacando-se o uso dos imunossensores, que utilizam anticorpos como reconhecedores. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de imunossensores miniaturizados e descartáveis para a determinação dessa toxina em águas naturais.

**Palavras Chave:** Microcistina; toxina; imunossensor.

### INTRODUÇÃO

A eutrofização das águas superficiais se refere a um distúrbio, que tem causado grande preocupação mundial, e é causada pelo aumento excessivo de nutrientes nas águas, especialmente o fósforo e o nitrogênio, que estimulam o crescimento acelerado de algas, denominadas de cianobactérias (ou algas azuis) (VENEU *et al.*, 2015). Essas algas produzem toxinas deletérias à saúde dos consumidores, sendo as mais frequentes a LR-microcistina. A microcistina é extremamente tóxica e atua bloqueando as fosfatases hepáticas, causando danos ao fígado, com conseqüente hemorragia, podendo ser letal (RAMOS *et al.*, 2016).

O Brasil foi o primeiro país a estabelecer limites de tolerância para microcistinas em águas, através da Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, sendo estabelecido valor

---

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), Faculdade de Química, 13082-970, Campinas, SP, Brasil

<sup>1</sup>Aluna de Iniciação Científica e graduanda do curso de Química na PUC-Campinas–jocimaracamargo@gmail.com.

<sup>2</sup>Aluna de Iniciação Científica e graduanda do curso de Química na PUC-Campinas– kamily\_pac@hotmail.com.

<sup>3</sup>Pesquisador Laboratório de Microfabricação, LNNano, CNPEM, Campinas, SP, Brasil–angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br

<sup>4</sup>Professora Pesquisadora da PUC-Campinas - renatavalente@puc-campinas.edu.br



14º Congresso Nacional de

**MEIO AMBIENTE** **POÇOS DE ÁGUAS**  
**TERMAIS E MINERAIS**

26 a 29 SET 2017

2º Simposio de Águas Termais,  
Minerais e Naturais de Poços de Caldas

máximo de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  em águas destinadas ao abastecimento público (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Apesar de sua toxicidade, o monitoramento de cianotoxina em águas ainda é uma prática pouco comum devido, principalmente, a falta de métodos simples e de baixo custo (RAMOS *et al.*, 2016). Neste contexto, os biossensores são alternativas interessantes, uma vez que possuem alta seletividade, sensibilidade, respostas rápidas e simples (MENDES *et al.*, 2017). Os biossensores são uma sub-classe dos sensores químicos que possuem como elemento de reconhecimento uma molécula biológica, como os anticorpos e, nesse caso, são denominados de imunossensores.

Recentemente, o uso de suportes miniaturizados para a construção dos dispositivos tem sido preferido, uma vez que podem ser utilizados pequenos volumes de amostra (10-20  $\mu\text{L}$ ) com baixa geração de resíduos.

Neste contexto, o objetivo de trabalho é detectar microcistina em águas naturais contaminadas, usando imunossensores miniaturizados e descartáveis, baseados em anticorpo anti-microcistina imobilizado sobre nanocompósitos híbridos compostos por nanopátulas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertos com quitosana.

## **METODOLOGIA**

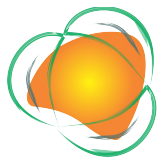
Primeiramente, foram colocados 50 $\mu\text{L}$  de nanopátulas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em um frasco e adicionou-se 25 $\mu\text{L}$  de quitosana 4,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ , para formação do nanocompósito. Então, após lavagem, foram adicionados 50 $\mu\text{L}$  do anticorpo anti-microcistina ao sistema, para o processo de imobilização do elemento de reconhecimento. Finalmente, o nanocompósito modificado com a biomolécula foi gotejado sobre um eletrodo miniaturizado de ouro e usado como imunossensor na detecção de microcistina.

Para as medidas com o dispositivo, adicionou-se 1 $\mu\text{L}$  de uma solução contendo microcistina livre (Ag) e microcistina marcada com a enzima peroxidase ( $\text{Ag}^*$ ), em proporções variadas conforme as necessidades de estudos. Este tipo de ensaio é denominado competitivo e possui como característica a alta especificidade. O sistema miniaturizado foi encaixado em um adaptador e conectado a um micropotenciostato PGSTAT 101 da AUTOLAB (Metrohm).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No ensaio competitivo usa-se antígeno (microcistina) conjugado com peroxidase ( $\text{Ag}^*$ ) e a microcistina livre (Ag), que competem pela ligação com o anticorpo imobilizado. O anticorpo tem mais afinidade pela Ag e, portanto, quanto mais microcistina tem no meio menos  $\text{Ag}^*$  fica retido na superfície do imunossensor. A peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (substrato da enzima) gerando corrente elétrica. Assim, se menos  $\text{Ag}^*$  estiver retida no sensor, menor será a geração de corrente e o sinal diminuirá. Dessa forma, este dispositivo avalia a diminuição da resposta com o aumento da concentração de toxina no meio.

## **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**



14º Congresso Nacional de

**MEIO AMBIENTE** **POÇOS DE ÁGUAS**  
**TERMAIS E MINERAIS**

26 a 29 SET 2017

2º Simposio de Águas Termais,  
Minerais e Naturais de Poços de Caldas

Antes de aplicar o sensor na determinação de toxina em águas naturais, há necessidade de se encontrar as condições ótimas de resposta do dispositivo. As condições avaliadas foram: pH do meio e o melhor tempo de interação entre antígeno livre e marcado.

Os pHs avaliados foram: 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0, e o dispositivo apresentou melhor resposta de corrente elétrica em pH 6,5, devido a se referir ao pH ótimo da enzima peroxidase que efetivamente contribui para a geração de sinal.

Para a otimização de melhor tempo de interação antígeno livre/marcado e anticorpo, foram avaliados três tempos de mergulho distintos: 20, 30 e 45 min. Os resultados obtidos indicaram que 30 min foi o melhor tempo de interação, pois foi o que apresentou maior fluxo de corrente.

### **DETERMINAÇÃO DE MICROCISTINA EM ÁGUAS NATURAIS**

Para a determinação de microcistina em águas naturais, foi construída uma curva de calibração, cuja região linear encontrada foi de 6,0 a 12,8 ppt (n=4) com um  $R^2$  de 0,9935 ( $y(A) = - 1.10^{-8}(\text{ppt}) x + 4.10^{-7}$ ) com um limite de detecção em torno de 1 ppt.

A amostra usada se refere a água de uma lagoa da cidade de Campinas que foi intencionalmente contaminada com 10,9 ppt da toxina. Após medida com o imunossensor, encontrou-se a concentração de 10,88 ppt, com erro de 0,2%.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De uma forma geral, o imunossensor obteve bom desempenho nas análises e resposta precisa e exata na detecção de microcistina em amostras de águas naturais. Dessa forma, o dispositivo proposto pode ser aplicado na determinação do poluente em águas, sem a interferência das outras substâncias presentes na amostra. Cabe ressaltar que o dispositivo possui vantagens interessantes, como rapidez nas medidas e baixa geração de resíduos, uma vez que utiliza pequenos volumes de amostra.

### **REFERÊNCIAS**

- MENDES, R.K.; *et al.* Determination of chlorophenol in environmental samples using a voltammetric biosensor based on hybrid nanocomposite. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 28, p. 1212-1219, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria\\_518\\_2004.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf)> Acesso em: 02 de julho de 2017.
- RAMOS, C.P.S.; *et al.* Cianobactérias e microcistina em águas de rio destinadas ao abastecimento de centro industrial de Caruaru, PE, Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate** v.4, n.1, p. 27-35, 2016
- VENEU, D.M.; *et al.* Tratamento de água eutrofizada através dos processos de pré-oxidação, coagulação e floculação. **Engevista** v. 17, n. 2, p. 175-186, 2015.