



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KAWANY DE FARIA FORATO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTE ANTI-MC  
APLICADO À QUALIDADE DE ÁGUAS**

---

Londrina  
2023



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---



**Centro de Ciências Agrárias  
Depto. De Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência de  
Alimentos**

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTE ANTI-MC  
APLICADO À QUALIDADE DE ÁGUAS**

**KAWANY DE FARIA FORATO**

---

Londrina  
2023

KAWANY DE FARIA FORATO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTE ANTI-MC  
APLICADO À QUALIDADE DE ÁGUAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka.  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano.

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Forato, Kawany de Faria.

DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTE ANTI-MC APLICADO À QUALIDADE DE ÁGUAS / Kawany de Faria Forato. - Londrina, 2023.  
88 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Segurança de alimentos e água - Tese. 2. Imunobiotecnologia - Tese. 3. Hibridomas - Tese. 4. Microcistina - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

KAWANY DE FARIA FORATO

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTE ANTI-MC  
APLICADO À QUALIDADE DE ÁGUAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Emilia Kiyomi Kuroda  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia Reika Takabayashi  
Yamashita  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

**SUPLENTE**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiane Dias Lopes  
US Department of Agriculture, USDA

---

Prof. Dr. Lycio Shinji Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de novembro de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a Deus, pelo dom da vida e por cada dia.

À professora Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka pela oportunidade, confiança e orientação na realização deste trabalho. À professora Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano, pela contribuição e coorientação do trabalho.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por todo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos do Departamento, por sempre auxiliarem e ajudarem no que era necessário.

A Dr<sup>a</sup>. Cássia Reika Takabayashi Yamashita, pelas orientações, ajuda, e visitas ao LIM para esclarecimento e melhor auxílio.

A minha família, especialmente meus pais, Marcos José Forato e Cristiane F. de Faria Forato, por todo amor, compreensão, e apoio sempre, e em todas as decisões. A eles minha eterna gratidão, reconhecimento, e todo meu amor.

Ao grupo de pesquisa do LIM, pelo acolhimento, troca de conhecimento e apoio durante o decorrer do trabalho.

Aos meus amigos de departamento, pela ajuda, companhia, e momentos de descontração.

À CAPES (Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro à pesquisa e concessão de bolsa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Microcistinas, toxinas produzidas principalmente pelo gênero de cianobactéria *Microcystis spp*, são heptapeptídeos, análogos de estrutura variável de ocorrência em águas eutrofizadas, com destaque a MC-LR (microcistina leucina-arginina) pela frequência e toxicidade. A detecção rápida de toxinas naturais em água, com ênfase em cianotoxinas, constitui importante tópico na segurança de alimentos e água, por apresentar potencial carcinogênico e/ou hepatotóxico, causando perigo à saúde humana e animal. Biossensores constituem a essência da nanobiotecnologia rápida por apresentarem inúmeras vantagens e aplicações em diversas áreas, inclusive na segurança de alimentos e água. As características de sensibilidade e especificidade de imunorreagentes, em especial com o uso de Anticorpo Monoclonal (AcM), agregam precisão e confiabilidade aos testes, expandindo aplicabilidade. O trabalho visou produzir AcM anti-MC-LR através do cultivo de hibridomas linhagem MC 8-3, e, paralelamente, empregar dois métodos analíticos, imunológico (ELISA) e cromatográfico (*High-performance liquid chromatography - photodiode array/HPLC-PDA*) no monitoramento de 6 lagos na região de Londrina, Apucarana e Cambé, entre outubro de 2022 e fevereiro de 2023, quanto a ocorrência de MC-LR (n=51). Além disso, foram realizadas análises de contaminação microbiológica da água procedendo determinação de coliformes totais e termotolerantes (n=6) e ocorrência de cianobactérias (n=6). O cultivo celular produziu AcM com atividade anti-MC-LR. A quantificação de MC-LR por HPLC variou de ND a  $6,98 \mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto por ELISA de ND a  $6,26 \mu\text{g.L}^{-1}$ . A amostra com maior contaminação ocorreu em lago com cianobactérias, indicando uma possível contaminação pontual do lago. Ambos os métodos se mostraram eficazes na detecção e quantificação de MC-LR, embora o método imunológico apresentou-se com maior sensibilidade, quantificando a toxina em maior número de amostras. Apesar da maioria das amostras não apresentarem níveis de MC-LR superior ao permitido pela Organização Mundial de Saúde - OMS de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , vale ressaltar que a ocorrência de cianobactérias sugere possibilidade de novas contaminações, expondo população da região a risco.

**Palavras-chave:** anticorpo monoclonal; biossensores; microcistina; cianobactérias.

## ABSTRACT

Microcystins (MCs), toxins mainly produced by the cyanobacteria *Microcystis spp.* These toxins are variable heptapeptides that occur in eutrophicated water bodies, in which MC-LR (leucine-arginine) is the type that's most frequent and toxic. Rapid detection of natural toxins in water, emphasizing cyanotoxins, is an important topic in everyday food and water safety, because of its carcinogenic and hepatotoxic potential, that represents danger for human and animal health. Biosensors are the essence of quick nanobiotechnology for representing various advantages and applications in different areas, including food and water. The immunoreagents profile of sensibility and specificity, especially Monoclonal Antibody (AcM), promotes precision and reliability to tests, and it allows wide applicability. This work aims to produce AcM anti-MC-LR by cultivating hybridomas lineage MC 8-3, and in parallel, to use two analytical methods, immunochemical (ELISA) and chromatographic (*High-performance liquid chromatography - photodiode array/HPLC-PDA*) to monitor 6 lakes in the regions of Londrina, Apucarana and Cambé, between October 2022 and February 2023, regarding contamination by MC-LR (n=51). Furthermore, the samples were analyzed about water microbiologic contamination, as for total and thermotolerant coliforms (n=6), and presence of cyanobacteria (n=6). The quantification of MC-LR varied from ND to 6,98  $\mu\text{g.L}^{-1}$  measure by HPLC, and from ND to 6,26  $\mu\text{g.L}^{-1}$  when measure by ELISA. The sample with major contamination coincides with the lake where it was observed cyanobacteria. This indicates a punctual contamination in the lake's water. Both methods were efficient in the detection and quantification of MC-LR, however, ELISA was more sensitive by quantifying the toxin in a larger amount of the samples. Despite most samples not having contamination levels above the allowed by the OMS of 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , it is worth mentioning that the occurrence of cyanobacteria suggest the possibility of new contaminations occur, putting the population of the region at risk.

**Key-words:** monoclonal antibody; biosensors; microcystin; cyanobacteria.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	–	Modalidades de ELISA .....	23
<b>Figura 2</b>	–	Estrutura química da microcistina (MC).....	27
<b>Figura 3</b>	–	(A) A) <i>Bloom</i> de <i>Microcystis</i> spp. em Taihu, China, imagem de satélite. (B) <i>Bloom</i> de <i>Microcystis</i> spp. em Lago Agawam, Nova York, EUA. (C e D) Microscopia morfológica de colônias de <i>Microcystis</i> spp .....	30
<b>Figura 4</b>	–	Lago Igapó II, Londrina.....	33
<b>Figura 5</b>	–	Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina .....	34
<b>Figura 6</b>	–	Parque Jaboti, Apucarana .....	35
<b>Figura 7</b>	–	Lago Schmidt, Apucarana .....	36
<b>Figura 8</b>	–	Lago Conde, Cambé .....	37
<b>Figura 9</b>	–	Etapas experimentais para cultivo de Hibridoma.....	40
<b>Figura 10</b>	–	Etapas i-ELISA.....	45
<b>Figura 11</b>	–	Delineamento Experimental para análise amostras de água.....	46
<b>Figura 12</b>	–	Área de estudo – Londrina .....	47
<b>Figura 13</b>	–	Área de estudo – Cambé.....	47
<b>Figura 14</b>	–	Área de estudo – Apucarana .....	48
<b>Figura 15</b>	–	Lago Conde, Cambé.....	49
<b>Figura 16</b>	–	Lago Igapó II, Londrina.....	49
<b>Figura 17</b>	–	Lago Igapó III, Londrina.....	50
<b>Figura 18</b>	–	Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina .....	50
<b>Figura 19</b>	–	Lago Schmidt, Apucarana .....	51
<b>Figura 20</b>	–	Lago Jaboti, Apucarana.....	51
<b>Figura 21</b>	–	Etapas de pré-concentração da amostra.....	53
<b>Figura 22</b>	–	Metodologia Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes NMP .....	55
<b>Figura 23</b>	–	Cultivo 1 - Hibridoma MC 8-3 - Densidade e viabilidade celular .....	57
<b>Figura 24</b>	–	Cultivo 2 - Hibridoma MC 8-3 - Densidade e viabilidade celular .....	58
<b>Figura 25</b>	–	Atividade anti-MC-LR por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma linhagem MC 8-3 em meio H-SFM .....	60
<b>Figura 26</b>	–	Curva analítica de calibração pré-concentrada na faixa de	

trabalho 0,3 a 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ , por HPLC-PDA.....	62
<b>Figura 27</b> – Cromatograma de HPLC-PDA de padrão de MC-LR, e amostras 1 e 2, referente ao lago 1 em outubro 2022 .....	64
<b>Figura 28</b> – Curva analítica de calibração do ELISA <i>QuantiPlate Kit for Microcystins</i> .....	65
<b>Figura 29</b> – Achados sugestivos de <i>Microcystis</i> , visualização da amostra 1 (outubro, Lago 1), em microscopia ótica, em aumento de 4, 10, e 40x.....	75
<b>Figura 30</b> – <i>Microcystis aeruginosa</i> visualizada em microscopia ótica .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Adaptação de Hibridoma em cultivo celular com meios de cultura RPMI e H-SFM.....	42
<b>Tabela 2</b> – Codificação de amostras, considerando lago coletado e período.....	61
<b>Tabela 3</b> – Monitoramento de MC-LR por HPLC-PDA .....	63
<b>Tabela 4</b> – Monitoramento de MC-LR por ELISA <i>QuantiPlate Kit for Microcystins</i> .....	66
<b>Tabela 5</b> – Monitoramento de MC-LR no Lago 1.....	67
<b>Tabela 6</b> – Comparação dos resultados obtidos por HPLC-PDA e ELISA <i>Quantiplate Kit for Microcystin</i> .....	69
<b>Tabela 7</b> – Número mais provável (NMP) de unidades formadoras de colônias de coliformes totais / termotolerantes por mL dos lagos estudados.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ADDA	3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico
Ag	Antígeno
AcM	Anticorpo Monoclonal
BSA	Albumina de soro bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etileno diamina ácido tetra acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EUA ou USA	Estados Unidos da América
FM	Fase Móvel
HEPES	Ácido Hidroxietil Piperazineetanesulfônico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HMF	5-hidroximetil-2-furfural
H-SFM	<i>Hybridoma Serum Free Medium</i>
IC-50	50% da máxima ligação de anticorpos
i-ELISA	ELISA indireto
Ig	Imunoglobulina
IgG-HRP	Conjugado Anti-IgG de camundongo com horseradish peroxidase
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LD	Limite de detecção
LST	Lauril-Sulfato-Triptose
LQ	Limite de quantificação
MC	Microcistina
MC-LR	Microcistina-Leucina-Arginina
MDHA	N-metildehidroalanina
NMP	Número mais provável
SEMA	Secretaria Municipal do Ambiente
SFB	Soro Fetal Bovino

OMS	Organização Mundial da Saúde
OTA	Ocratoxina A
PBS	Tampão fosfato de sódio salina
PBST	Tampão fosfato de sódio salina- com Tween 0,05%
PDA	Detector de arranjo de diodos
PET	Polietileno tereftalato
PR	Paraná
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TMB ou TBMZ	3, 3', 5, 5'- Tetrametilbenzidine
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VB	Verde Brilhante

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	16
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>3.1</b>	<b>Anticorpos policlonais/monoclonais</b> .....	17
<b>3.2</b>	<b>Tecnologia de hibridoma e produção de AcM</b> .....	18
3.2.1	Cultivo de Hibridoma e estabilidade.....	19
<b>3.3</b>	<b>Imunobioferramentas</b> .....	20
3.3.1	<i>ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> .....	21
3.3.2	Avanços biotecnológicos em imunoenaios .....	24
<b>3.4</b>	<b>Microcistinas</b> .....	25
3.4.1	Cianobactérias.....	29
3.4.1.1	Gênero <i>Microcystis spp</i> .....	29
3.4.2	Análise microbiológica – Coliformes .....	31
<b>3.5</b>	<b>Lagos</b> .....	32
3.5.1	Lago Igapó.....	32
3.5.2	Parque Municipal Arthur Thomas .....	33
3.5.3	Apucarana – Lago Jaboti.....	34
3.5.4	Lago Schmidt.....	35
3.5.5	Lago Conde Cambé.....	36
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>4.1</b>	<b>Materiais e equipamentos</b> .....	38
<b>4.2</b>	<b>Cultivo de Hibridoma</b> .....	40
4.2.1	Controle de viabilidade celular .....	42
4.2.2	Congelamento celular .....	43
4.2.3	Purificação parcial de AcM anti-MC-LR .....	44
4.2.4	Titulação dos AcM por <i>i-ELISA</i> .....	44
<b>4.3</b>	<b>Análise das amostras de água</b> .....	46
4.3.1	Coleta das amostras – Área e período do estudo.....	46

4.3.2	Análise em <i>HPLC-PDA</i> .....	52
4.3.2.1	Preparo da amostra – Pré-concentração da cianotoxina .....	52
4.3.2.2	Método cromatográfico .....	53
4.3.2.3	Curva de calibração .....	54
4.3.3	Análise microbiológica – Coliformes .....	54
4.3.4	Identificação de cianobactérias.....	55
4.3.5	<i>ELISA</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática .....	56
<b>4.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>5.1</b>	Cultivo de Hibridoma MC .....	<b>57</b>
<b>5.2</b>	Contaminação de lagos por MC-LR.....	<b>61</b>
5.2.1	Codificação das amostras.....	61
5.2.2	Análise por Cromatografia Líquida ( <i>HPLC-PDA</i> ) .....	61
5.2.3	<i>ELISA</i> – <i>QuantiPlate Kit for Microcystins</i> .....	65
<b>5.3</b>	Análise microbiológica - Coliformes .....	<b>72</b>
<b>5.4</b>	Identificação de cianobactérias.....	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As técnicas imunoquímicas se destacam entre as bioferramentas avançadas da atualidade, caracterizadas pela sensibilidade, especificidade e uniformidade à resposta de Anticorpos (Ac), capaz de detectar analito em níveis residuais. Soma-se ainda, a ampla aplicabilidade dessa tecnologia, abrangendo desde terapia, diagnóstico, vigilância, na saúde pública, e segurança de alimentos e água, permitindo análises rápidas, de alta precisão e confiabilidade.

As cianotoxinas são contaminantes comuns de água, produzidas por cianobactérias em florações de corpos d'água, como exemplo as microcistinas, grupo produzido principalmente pelo gênero *Microcystis*. Estes metabólitos secundários são heptapeptídeos de cadeia monocíclica, cuja variabilidade estrutural decorre de diferentes resíduos de aminoácidos, originando análogos com heptatoxicidade e carcinogenicidade variável. A molécula MC-LR (microcistina leucina-arginina) é o análogo mais tóxico e de ocorrência frequente. A OMS – Organização Mundial de Saúde regulariza o valor de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistinas para potabilidade da água.

A ocorrência de microcistina geralmente está associada a águas eutrofizadas, em ambiente propício para proliferação de cianobactérias potencialmente toxigênicas. Conseqüentemente, o monitoramento de águas é importante etapa primária para evitar exposição animal e humana à contaminação, tendo em destaque os métodos rápidos baseados em imunoenaios e técnicas imunoquímicas para avaliação prática e previsão imediata *in loco* perante risco visando medidas de controle.

Não obstante, a aquisição de imunorreagentes a baixo custo, disponível para amplo uso, tem sido o gargalo que dificulta a disseminação de bioferramentas destinadas à triagem e controle de qualidade ao setor produtivo e ambiental. A produção em larga escala, aliada a escolha de Anticorpos Monoclonais (AcM) para compor o biossensor de alta seletividade e sensibilidade em imunotécnicas são etapa fundamentais e, tornariam plausíveis se viabilizar/implementar domínio de tecnologias básicas de assegurar o contínuo

abastecimento de empreendimentos biotecnológicos. I.e., biorreagentes estáveis com fornecimento garantido através de cultivo de células produtoras de AcMs estáveis, no caso os hibridomas aptos a produzir níveis contínuos e inesgotáveis de imunorreagentes. O fato liberaria o Brasil da importação de kits de elevado custo e, viabilizaria o acesso à utilização de técnicas imunológicas nacionais para monitoramento de contaminação em alimentos e água, no contexto de segurança exigente.

## 2. OBJETIVO

- O trabalho visou recuperação, ativação e proliferação celular de hibridoma linhagem MC 8-3, produção de AcM anti-MC-LR, e avaliação da contaminação de cianotoxina Microcistina-LR em águas recreacionais da região de Londrina, no período de outubro de 2022 a fevereiro de 2023, comparando os resultados obtidos através de duas metodologias: HPLC e ELISA.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Cultivar hibridoma linhagem MC 8-3 e produzir AcM anti-MC-LR e purificar por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e diálise de proteína em membrana, e avaliar a atividade anti-MC-LR de AcM por i-ELISA.
- Detectar/quantificar a ocorrência de cianotoxina MC-LR em lagos das cidades de Londrina, Cambé e Apucarana, pelo método de HPLC-PDA e ELISA.
- Comparar a contaminação de água por MC no período de outubro/2022 a fevereiro/2023.
- Determinar a contaminação por coliformes totais e termotolerantes e ocorrência de cianobactérias das amostras de fevereiro/2023

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Anticorpos Policlonais e Monoclonais

Anticorpos (Ac) são imunoglobulinas (Ig) secretadas por linhagens linfocitárias do tipo B em resposta do sistema imune, sob contato com substâncias estranhas ao organismo de animais vertebrados (antígeno, Ag). O fragmento Fab da conformação estrutural de Ac é responsável pelo reconhecimento antigênico, composto por dois domínios de cadeia leve e dois de cadeia pesada, denominado região amino-terminal variável (V) com característica de hipervariabilidade. O fragmento Fc, constante e denominado de região carboxi-terminal (C), sem participação no reconhecimento do Ag, interage com receptores Fc de células e moléculas imunes, mediando funções biológicas de Ac (Abbas, 2019).

Entre as funções biológicas de Acs, a neutralização de patógenos e toxinas vem a constituir as imuno-ferramentas de destaque na área biomédica, pela capacidade de detectar moléculas alvo de interesse. A alta seletividade de ligação a determinado Ag específico, promovido pela região de hipervariabilidade, atinge baixos limites de detecção do analito, ao nível de nano a picograma, tornando-se ideal para aplicações diversas como farmacêutica (diagnóstico e/ou terapia), testes de drogas e, biossensores (Parrey *et al.*, 2020, Meirelles *et al.*, 2006).

A produção de anticorpos Policlonais é induzida inoculando imunógeno em animal, gerando imunoglobulinas com especificidade àquele determinado Ag e, são produzidos por diferentes clones de linfócito B (Meirelles *et al.*, 2006). Os Acs Policlonais adquiridos podem ser prontamente usados, ou purificados por técnicas cromatográficas, a exemplo da coluna de afinidade. Visto que apresentam afinidade por diversos epítomos, resultando em ampla heterogeneidade de ligação, é aplicado há décadas em pesquisas, assim como reagente terapêutico. Embora a natureza policlonal e diversidade sejam consideradas vantagens pela boa estabilidade perante alterações ambientais, as principais restrições decorrem da dependência de organismo vivo para produção e, conseqüentemente variabilidade na

resposta imune de cada animal, seja pelo título, com qualidade não-reprodutiva do lote de produto resultante.

O AcM surgiu como solução para contornar restrição e, destina-se a fins biotecnológicas farmacêuticos exigentes requerendo produção reprodutiva em elevada escala, sendo a possibilidade implementada pela técnica de cultivo de hibridoma produtor de AcM, descrito por Köhler e Milstein, em 1975 (Heilmann *et al.*, 2005; Maverakis *et al.*, 2015; Sakaguchi *et al.*, 2021). O AcM, produzido por hibridoma artificialmente gerado pela tecnologia de fusão celular e selecionado, viabiliza o desenvolvimento de ferramentas biossensores capazes de reconhecer e identificar precisamente o Ag alvo com reprodutividade e repetitividade assegurada, estabelecendo a uniformidade de resposta programada e, agregando maior confiabilidade aos resultados. A referida característica é a maior vantagem dos AcM em comparação a Anticorpos Policlonais, apresentando variabilidade de resposta frente a um mesmo antígeno. Apesar do surgimento atual de procedimentos avançados de produção de AcM com elevado rendimento, a técnica de hibridoma ainda é considerada a mais favorável devido a preservação de funções inatas das células imunes, bem como a informação de pareamento do AcM produzido (Newsrx, 2020).

### **3.2 Tecnologia de Hibridoma e produção de AcM**

A tecnologia de hibridoma é a técnica desenvolvida por Köhler e Milstein, em 1975, e que possibilita produção de AcM, cuja variação de resposta é mínima, a especificidade é bem definida e viabiliza produção contínua. A aplicabilidade do produto adquirido é ampla nas áreas de bioquímica, biologia molecular e biomedicina (Parrey *et al.*, 2020).

Para isso, as células B de camundongo ou rato são estimuladas *in vivo* com antígeno de interesse, e com o estímulo do sistema imune, há a produção de Ac. Posteriormente, linfócitos B do linfonodo ou baço do animal são isolados e fusionados *in vitro* com célula de mieloma, tumores malignos do sistema imune,

produzindo a célula híbrida denominada hibridoma (Heilmann *et al.*, 2005). Ao fundir células de mieloma com linfócitos de camundongo imunizado com Ag conhecido, é possível adquirir hibridomas produtores da imunoglobulina de interesse (Milstein, 1980). O cultivo *in vitro* de hibridomas é possível em meios de cultura com ou sem suplementação de soro fetal bovino, com controle de parâmetros como pH e temperatura (Freshney, 2010).

As linhagens de linfócitos B, embora provenientes de uma mesma célula tronco, naturalmente apresentam grande heterogeneidade na resposta imunológica, e os anticorpos produzidos são denominados policlonais, pela capacidade de reconhecimento e ligação a diversos epítopos. Já os anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de célula progenitora, são idênticos e tem especificidade por determinado epítipo apenas, e caracterizados por grande uniformidade (Bruce, 2002).

Dessa forma, podem ser utilizados para detecção, purificação ou caracterização de certa substância de interesse, e tem ganhado destaque no mercado de biomoléculas nos últimos anos. Biossensores são substâncias biológicas como anticorpos, enzimas, DNA, células ou microrganismos que agem como biorreceptores no reconhecimento e captura de um alvo de interesse, geralmente acoplados a um sistema fisicoquímico de reação que permitirá o sinal de resposta. Dentre as possibilidades de aplicações dos AcM como imunossensores se destacam o imunodiagnóstico, terapia, identificação de tumores, segurança de alimentos e água (Parrey *et al.*, 2020; Coronado-Apodaca *et al.*, 2023).

### 3.2.1 Cultivo de Hibridoma e Estabilidade

A proliferação das células de hibridoma apresenta quatro fases de crescimento padrão de células animais, sendo fase lag, fase de crescimento, fase estacionária e fase de declínio. A fase lag é determinada pelos fatores de crescimento, é dependente da viabilidade das células, densidade celular do inóculo e demais características do cultivo. Na segunda etapa, fase de crescimento, ocorre o aumento

expressivo da densidade celular, e é representada por uma curva exponencial, na qual ocorre intensa multiplicação celular, compreendendo as duas fases do ciclo celular, interfase e fase mitótica. Após essa etapa, ocorre a fase estacionária, na qual a densidade celular é mantida, visto que a quantidade de novas células geradas pela multiplicação é equivalente à quantidade de células morrendo, devido ao esgotamento de nutrientes, aumento de metabólitos tóxicos, dentre outros fatores. Por fim, a fase declínio, caracterizada principalmente pela morte celular e baixa viabilidade de células (Butler, 2005; Freshney, 2010).

O meio de cultura utilizado no cultivo celular deve promover os nutrientes necessários para o crescimento celular, como carboidratos, aminoácidos, vitaminas e sais orgânicos. Além disso, o meio de cultura pode ser suplementado com soro fetal bovino (SFB), para fornecimento de fatores de crescimento e hormônios, tampão, antibiótico, antifúngico e indicadores de pH (Alves; Guimarães, 2010).

Dentre os desafios da produção de anticorpos monoclonais está a instabilidade proteica, visto que ela pode ser tanto de natureza química, como desaminação, oxidação e hidrólise; como de natureza física, tais como alterações conformacionais, adsorção a superfícies, associação e agregação (Arosio *et al.*, 2011). Fatores externos influenciam na estabilidade dos anticorpos monoclonais como agitação, mudança de pH, congelamento e descongelamento. Tais fatores, considerados stress ambiental, aumentam a susceptibilidade dos anticorpos monoclonais a sofrerem a agregação proteica, podendo ser reversível ou irreversível. A associação intermolecular das proteínas compromete a estabilidade coloidal (Kheddo *et al.*, 2014).

### **3.3 Imunobioferramentas**

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) constitui imunobioferramenta inovadora introduzida na década de 70, com diversas vantagens perante como custo-benefício, rapidez, simplicidade e segurança aos operadores, além de alta sensibilidade e especificidade para ser empregado na análise de

alimentos na detecção do analito de interesse (Yao *et al.*, 2020). Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para o desenvolvimento de AcM, visando a redução dos custos de imunorreagentes, e conseqüentemente, permitindo maior utilização da técnica por diversos países. Kits comerciais de ELISA podem ter custo elevado, impossibilitando o uso mais frequente nas análises de países subdesenvolvidos. Dessa forma, a produção laboratorial de AcM através de hibridomas possibilita aplicação de imunotécnicas mais frequentemente e maior acessibilidade (Rossi *et al.*, 2012).

### 3.3.1 ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

O ensaio de imunoabsorção enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) é um método de análise quantitativa da reação antígeno-anticorpo baseado na intensidade da mudança de coloração obtida através do uso de uma enzima ligada ao seu substrato. É possível identificar um baixo número de moléculas em diferentes matrizes, visto que a técnica apresenta boa especificidade, baixo limite de detecção e pouca interferência (Aydin, 2015; Li *et al.*, 2016).

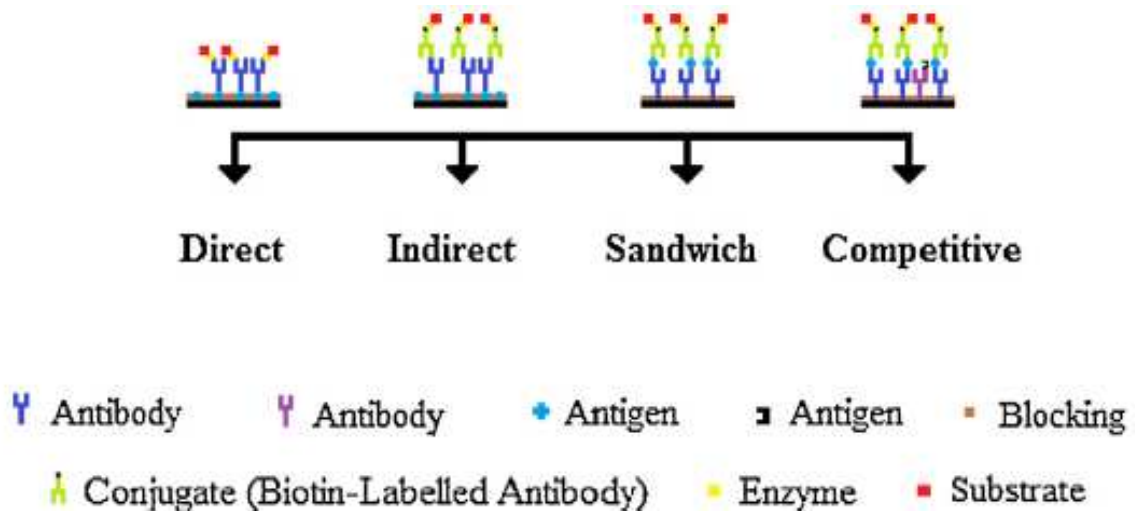
Nesse método são utilizadas microplacas de material rígido como poliestireno, polivinil e polipropileno, que é usado como fase sólida para adsorção do analito e/ou do anticorpo. Dentre as enzimas utilizadas estão a beta galactosidase, glicose oxidase, peroxidase e fosfatase alcalina, e com isso há variação da coloração gerada como resposta, bem como a forma na qual resposta deve ser lida. A cada etapa de adição de reagente faz-se a lavagem para remoção dos antígenos e anticorpos não ligados. Ao atingir o tempo de reação entre enzima e substrato, utiliza-se solução de parada de reação como hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura do resultado pode ser realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda adequado, que depende da natureza do conjugado utilizado (Aydin, 2015).

Tendo em consideração que as propriedades de cada substância analisada são variáveis, têm sido desenvolvidos diferentes modalidades de ensaio ELISA, com objetivo de aumentar a especificidade das análises. O ELISA direto foi o primeiro desenvolvido, que visa a detecção quantitativa de antígenos de alto peso molecular. A detecção ocorre com o anticorpo ou com o antígeno marcado com a enzima e posterior ligação ao substrato, que gera o sinal que é mensurado (Aydin, 2015). Já o ELISA indireto, foi desenvolvido baseado na metodologia direta, e originalmente com objetivo de detecção de IgG suína (Lindstrom; Wager, 1978). O método indireto utiliza antígeno fixo na placa que formará complexo com anticorpo presente na amostra posteriormente adicionada, chamado anticorpo primário. A identificação do Ac primário ocorre pela adição de Ac secundário conjugado à enzima que o reconhece e se liga ao Ac após período de incubação, que dará o resultado após adição do substrato cromógeno da enzima (Aydin, 2015).

Outra modalidade é o ELISA sanduíche, que utiliza 2 AcM, de captura e de bloqueio, com objetivo de detectar antígenos que são realmente específicos ao anticorpo se ligando fortemente, e que após a incubação e lavagem não podem ser removidos. A coloração é mensurada normalmente após a adição de substrato da enzima, na qual a aparição de cor significa um resultado positivo. O nome sanduíche é utilizado pelo fato de o antígeno de interesse ficar localizado entre dois anticorpos nessa técnica, e é a mais sensível dentre os outros tipos de ELISA desenvolvidos.

Além dessas possibilidades, há também o ELISA competitivo possui interpretação de resultados contrária ao habitual, na qual a maior intensidade de coloração na absorbância significa menor ligação de antígeno anticorpo, ou seja, menores concentrações presentes do analito. Isso acontece por que o antígeno ou anticorpo marcado irá competir com a molécula da amostra de interesse, e se ligará àquele que tiver maior especificidade pelo anticorpo (Aydin, 2015).

**Figura 1** - Modalidades de ELISA: Direto, Indireto, Sanduíche, Competitivo.



Fonte: Aydin (2015).

A elevada sensibilidade e especificidade obtidas nos testes de ELISA permitem a sua aplicação em diversas análises, o que tem promovido o desenvolvimento da técnica nos últimos anos. Praticidade e rapidez no tempo de análise também estão dentre as vantagens do método, além de não necessitar grande infraestrutura laboratorial ou partículas radioativas, como no radioimunoensaio (Aydin, 2015; Rossi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Dentre as limitações ou dificuldades encontradas ao empregar a técnica estão os resultados falso positivos e falso negativos, que ocorrem com maior frequência nos testes de ELISA indireto, causados por ligações não-específicas de alguns anticorpos (Waritni *et al.*, 2017; Flajs *et al.*, 2009). Tendo em vista essa questão, além do maior custo de kits de imunorreagentes comerciais para uso nessa técnica imunológica, tem sido realizadas diversas pesquisas que visam aplicação de AcM produzido por tecnologia de hibridoma para desenvolvimento de ELISA. Investimentos com objetivo de reduzir custos de imunorreagentes representam a possibilidade de incorporação de técnicas imunológicas na rotina de análise de diversos países. Essa possibilidade é promissora visto que o método de ELISA, por exemplo, é eficaz na identificação e quantificação de compostos, tais como as micotoxinas Ocratoxina A (OTA) e Aflatoxina (AF) em alimentos, que representam um grande avanço na questão da segurança de alimentos, tendo em vista o potencial mutagênico, teratogênico e hepatocarcinogênico das mesmas. Além do risco a saúde, muitas vezes são também

causa de grandes perdas econômicas, se caracterizando como um problema a nível global (Rossi *et al.*, 2012; Flajs *et al.*, 2009).

Os métodos analíticos de detecção e identificação de toxinas já bem pré-estabelecidos na literatura são cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, cromatografia de camada delgada, cromatografia acoplada a detector de fotodiodos (Wang *et al.*, 2018). Métodos de imunoenensaio como ELISA e imunocromatografia com uso de AcM constituem alternativas promissoras nessa perspectiva. A técnica de ELISA competitivo indireto com utilização de AcM foi capaz de obter resultados confiáveis e específicos, quando comparado com HPLC na detecção de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) em amostras de leite, comparado com a metodologia de HPLC (Guan, Wu, Meng, 2013).

O uso de AcM em imunoenensaio visa diminuir ao máximo interferências analíticas, bem como reduzir a incidência de resultados falso-positivos, já que há uniformidade em todas as moléculas de anticorpo produzidas (Meirelles *et al.*, 2006).

### 3.3.2 Avanços biotecnológicos em imunoenensaio

Os imunoenensaio são considerados uma das melhores opções para a detecção de analitos ou contaminantes em geral pelas características de simplicidade, rapidez e custo-benefício, utilizando anticorpos específicos como biomarcadores. No entanto, é importante o desenvolvimento e constante evolução das tecnologias a fim de tornarem os métodos cada vez mais simples, sensíveis e rápidos, para ultrapassar os limites instrumentais e químicas tradicionais, e possibilitar análises ambientais *in loco*. A aplicação destes testes é vasta e engloba desde a área da saúde como diagnósticos de doenças crônicas e/ou infecciosas; controle de segurança alimentar, com foco em toxinas e outros contaminantes; e monitoramento ambiental, como contaminação por metais pesados, componentes inorgânicos, moléculas orgânicas, pesticidas, bactérias e toxinas (Li *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2023).

Os imunoenaios normalmente geram um sinal de detecção de acordo com o marcador usado, podendo ser imunoenaios ópticos, como imunocromatografia de fluxo lateral; imunoenasiao de quimioluminescência; imunoenaios eletroquímicos; e imunoenasiao de eletroquimioluminescência (Li *et al.*, 2019).

*Microfluidics* são exemplo de plataforma para imunoenaios *in loco* com alta sensibilidade e especificidade que podem ser utilizados sem necessidade de instrumentação centralizada, rapidamente, de baixo-custo, e fáceis de utilizar com diversas aplicações. A configuração e princípio de ação destes imunoenaios pode variar e tem sofrido avanços nos últimos anos, embora a composição básica de um dispositivo de *Microfluidics* seja normalmente um substrato de papel, anticorpos para detecção do analito, e um componente para transmissão de sinal. As características de cada elemento influenciam na funcionalidade do teste, como exemplo filtração de impurezas da amostra. A sensibilidade e especificidade do método estão estritamente relacionadas com as reações ocorrendo entre os componentes, em especial anticorpo-analito e anticorpo-nanopartícula. Dessa forma, as reações em micro e nanoescala tem sido foco em estudos recentes a fim de aumentar a eficiência dos testes, buscando diminuir tempo de análise, reduzir volume de amostra e diminuir o custo de produção do dispositivo, a fim de possibilitar aplicação dos testes em maior população e regiões mais limitadas (Li *et al.*, 2019).

### **3.4 Microcistinas**

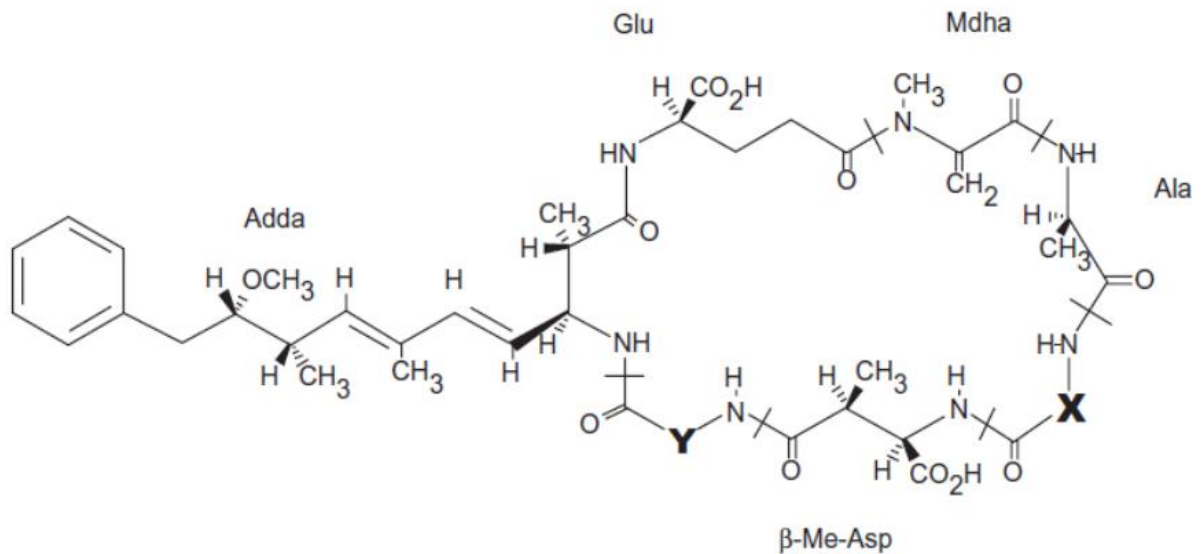
Microcistinas (MCs) são um grupo de toxinas produzidas por cianobactérias, microrganismos aeróbios fotoautotróficos. As cianobactérias são seres procariontes, do ponto de vista bioquímico e estrutural semelhantes às bactérias. O fenômeno de floração ocorre em ambientes aquáticos eutrofizados, onde o aumento de nutrientes, em especial Nitrogênio e Fósforo, proporciona grande crescimento de cianobactérias possivelmente produtoras de toxinas, como *Anabaenopsis*, *Aphanocapsa*, *Cylindrospermopsis*, *Fischerella*, *Gleotrichia*,

*Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus*, sendo *Microcystis* considerado o gênero mais comum entre eles (Zhang *et al.*, 2022).

O primeiro caso de intoxicação associado a cianobactéria tóxica foi publicado em 1878 por George Francis, e após isso, diversos episódios foram relatados por todo o mundo (Leal; Soares, 2004). O evento de floração acarreta além da dissolução da toxina na água, deposição em sedimentos, biodegradação e bioacumulação da toxina pelos organismos aquáticos, representando grave problema para os corpos d'água, ecologia marinha e saúde pública. As MCs dissolvidas na água são estáveis em baixo pH e resistentes à degradação enzimática no organismo animal, permanecendo íntegras após a passagem pelo trato gastrointestinal (Pham; Utsumi, 2018; Wang *et al.*, 2021; Massey *et al.*, 2018).

As MCs são metabólitos secundários heptapeptídeos de estrutura uniforme monocíclica que contém L-aminoácidos variáveis como leucina e alanina, leucina e arginina, tirosina e arginina, tirosina e alanina, tirosina e metionina; e N-metildehidroalanina (Mdha) e ácido 3-amino-metoxi-10-fenil-2,6,8- trimetildeca-4,6-dienóico (Adda) como aminoácidos não usuais; e de acordo com os aminoácidos que a toxina possui, tem a toxicidade variável classificada em três grupos (Leal; Soares, 2004). A grande variabilidade de aminoácidos formadores da microcistina possibilita que haja um número maior do que 240 variantes análogos à essa molécula, sendo os mais comuns MC-LR, MC-LA, MC-RR e MC-YR. A conformação denominada ciclo (D-Ala1 -X 2 -D-MeAsp3 -Z 4 - Adda5 -D-Glu6 -Mdha7) está representada na Figura 2, e é a estrutura básica da microcistina (Bortoli; Pinto, 2015; Huisman *et al.*, 2018; Pham; Utsumi, 2018; Massey *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022).

**Figura 2** - Estrutura química da microcistina (MC).



**Fonte:** Carneiro; Leite (2007).

A microcistina não apresenta fluorescência, e o espectro de absorção em luz UV das microcistinas característico apresenta um pico a 238 nm, por efeito da presença da dupla conjugada do resíduo ADDA ( $\beta$ -aminoácido ADDA), que também parece ser grande parte responsável pela toxicidade da MC. O análogo mais frequente e tóxico de microcistina encontrado na natureza é a MC-LR (Falconer, 2004; Zhang *et al.*, 2022).

Dentre as metodologias de detecção de microcistina é possível utilizar métodos físico-químicos, bioquímicos ou biológicos, como ELISA (Ensaio Imunoenzimático), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, atividade enzimática (alteração de função na enzima fosfatase), bioensaio em animais, dentre outros. No entanto, os métodos são sujeitos a limitações e interferências de análise como temperatura, concentração total de proteína, força iônica (McElhiney; Lawton, 2005; Guo *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022). O uso de biossensores na detecção da microcistina constituem ferramenta emergente e promissora com diversas vantagens quando comparado com as técnicas convencionais (Li *et al.*, 2023).

O foco da toxicidade aguda das microcistinas é o tecido hepático, e o mecanismo de toxicidade inclui necroses hemorrágicas e destruição de sinusóides

com congestão hepática e hepatomegalia, devido a ligação covalente permanente formada entre a molécula de MC com a proteína fosfatase, no citosol dos hepatócitos. Dentre os efeitos observados em estudo de toxicidade crônica estão progressiva lesão de hepatócito e necrose, filtração leucocitária, fibrose, amiloidose de hepatócitos e endotélio sinusoidal e de veias porta. Além disso, tem sido relatado que a MC-LR como motivador tumoral hepático permeado pela enzima fosfatase tipo 1 e 2, associado à inibição do desenvolvimento embrionário inicial em camundongo, e possivelmente cancerígeno a humanos (Leal; Soares, 2004; IARC, 2010; Fujiki *et al.*, 1996; Huisman *et al.*, 2018; Massey *et al.*, 2018).

A intoxicação humana ocorre mais comumente pela ingestão oral ou contato dérmico com água contaminada com cepas toxigênicas de cianobactérias, em lagos e rios; mas pode ocorrer por inalação, consumo de alimentos contaminados e hemodiálise. Dentre os sintomas observados estão irritação de pele e olho, febre, gastroenterite aguda, vertigem e fadiga, pois além do principal efeito hepático das MCs, elas também podem atingir intestino, cérebro, rins, pulmões, coração e sistema reprodutivo (Leal; Soares, 2004; Massey *et al.*, 2018). Por isso, o limite máximo de concentração de toxinas de cianobactérias em água foi definido pela OMS (Organização Mundial de Saúde), sendo igual a  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , equivalente de MC-LR, tanto para águas destinadas a consumo, como para contato direto com a pele (Brasil, 2004; Massey *et al.*, 2018).

Apesar da determinação pela OMS, muitos países ainda não possuem regulamentação para o limite máximo permitido de cianotoxinas. Outro problema é que a maioria dos países definem apenas limites para água potável, mas não para águas recreacionais. Visto que o contato dérmico também é uma via de exposição à toxicidade, isso representa perigo iminente às populações. Quando os limites são definidos, geralmente é especificado apenas microcistinas, enquanto outros grupos de cianotoxinas também potencialmente perigosas seguem sem regulamentação (Aguilera *et al.*, 2023).

### 3.4.1 Cianobactérias

Morfologicamente, as cianobactérias podem ser organismos unicelulares, filamentosos ou filamentosos ramificados multicelulares; além de serem encontradas em colônias ou individualmente. Sua reprodução é assexuada, sendo por fissão binária ou múltipla (Calijuri *et al.*, 2005; Whitton; Potts, 2012; Sant'Anna, 2006). As condições favoráveis para o crescimento das cianobactérias ocorrem em água doce e neutroalcalinas, e abundância de nutrientes, apesar de se desenvolverem em vários diferentes meios. São capazes de estocar fósforo e fixar nitrogênio atmosférico, além de não necessitarem de muita luz (Paerl; Huisman, 2009).

Os gêneros de cianobactérias toxigênicas mais comuns em todo o mundo são *Microcystis* spp, *Dolichospermum* spp, *Nostoc* spp e *Planktothrix* spp (Silva; Peleja; Melo, 2019). A ocorrência de determinados gêneros de cianobactérias em um corpo d'água varia de acordo com a correnteza da água, a temperatura e os padrões de descarte e tipo de dejetos no local. É observado também alteração dos picos de peróxido de hidrogênio extracelular disponível variando com o gênero de cianobactéria presente (Urakawa *et al.*, 2023).

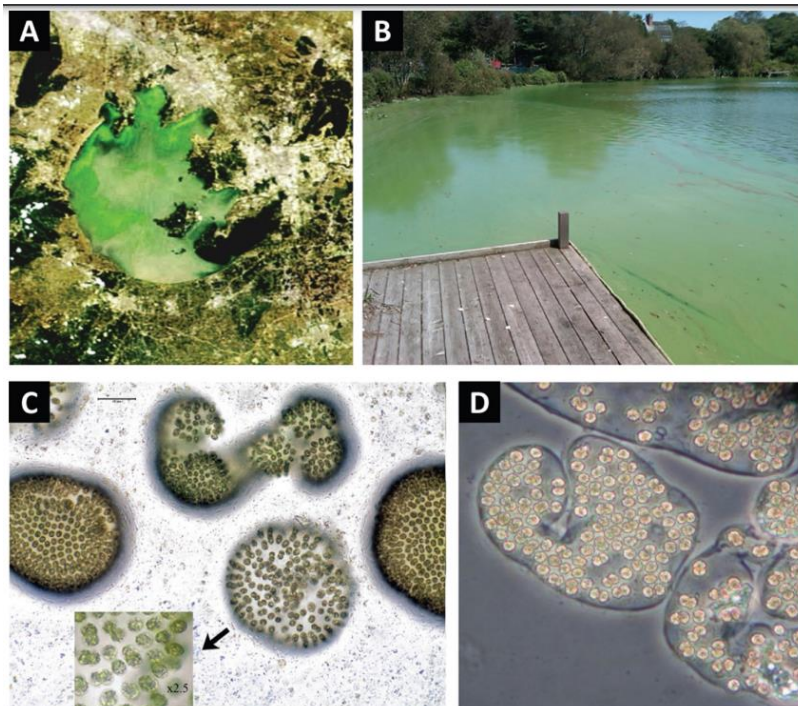
De acordo com Aguilera *et al.* (2023), os critérios utilizados na literatura para a definição de *bloom* de cianobactérias podem ser quantitativos ou apenas qualitativos. Dentre os quantitativos, a densidade de células é o indicador mais utilizado, geralmente expresso em quantidade de células por mililitro (mL) ou por litro.

#### 3.4.1.1 Gênero *Microcystis* spp

O gênero *Microcystis*, por sua plasticidade fenotípica, tem sido relatado como gênero dominante e mais detectado em corpos d'água em temperatura tropical e subtropical (Xiao; Li; Reynolds, 2018). Dentre as características desse gênero, são flutuantes, unicelulares, formato de cocos com diâmetro de 1 a 9  $\mu\text{m}$ . Em condições ambientais, exibe grande variabilidade morfológica de colônias, e formação

de densas agregações celulares (Figura 3). As espécies mais comumente observadas de *Microcystis* são *M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. firma*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis*, e *M. wesenbergii* (Harke *et al.*, 2016).

**Figura 3** – Imagens de eutrofização e microscopia de *Microcystis* (A) Bloom de *Microcystis* spp. em Taihu, China, imagem de satélite. (B) Bloom de *Microcystis* spp. em Lago Agawam, Nova York, EUA. (C e D) Microscopia morfológica de colônias de *Microcystis* spp.



**Fonte:** Harke *et al* (2016).

Determinados fatores podem induzir a formação de colônias de *Microcystis* spp., a exemplo de altas concentrações de fósforo, ocorrência de outra cianobactéria, zooplâncton, baixa temperatura e intensidade de luz. A formação de colônias agrega diversas vantagens ecológicas ao gênero *Microcystis*, como adaptação a variedade de luz, capacidade de crescimento em condições de escassez de nutrientes e proteção contra stress químico. Além disso, as colônias possibilitam rápida formação de grande biomassa, atingindo a superfície rapidamente de lagos eutrofizados e inibindo crescimento de outras espécies, garantindo o domínio do gênero. *M. aeruginosa* é a espécie mais comum do gênero *Microcystis*, com potencial

de produção de 340 µg/g de toxina MC-LR em peso seco e em condições ótimas de crescimento (Xiao, Li, Reynolds, 2018; Ramos *et al.*, 2015; Wijewickrama; Manage, 2019).

### 3.5 Análise Microbiológica - Coliformes

Coliformes são um grupo de bactérias fermentadoras de lactose e produtoras de gás e/ou ácido, utilizadas como indicadores de contaminação de água e alimentos por matéria fecal, despertando atenção quanto a possível presença de patógenos entéricos, sendo um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*. Essa definição surgiu em 1892, e passou por mudanças em 1915, e atualmente, o fato de indicação por contaminação fecal não é totalmente aceitável, pois esses microrganismos não são necessariamente de origem fecal, podendo estar presentes inclusive na microbiota residente em determinados ambientes. Dessa forma, atualmente entende-se que além de serem indicadores de contaminação fecal, podem também indicar condições de higiene dos processos de fabricação de alimentos e falhas nos processos de pasteurização (Silva et al., 2010).

Dentre o grupo dos coliformes totais, encontram-se os coliformes termotolerantes, o qual fermentam a lactose em temperatura de 44,5 a 45,5°C com produção de gás em 24 horas, com objetivo de encontrar algumas espécies como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Silva et al., 2010). A ocorrência de conteúdo fecal na água também indica maior quantidade de matéria orgânica presente num corpo d'água, e pode favorecer da ocorrência de florações de cianobactérias potencialmente toxigênicas. Eutrofização é o aumento de nutrientes da água, incluindo minerais e substâncias orgânicas oriundas de atividades industriais, agricultura ou dejetos residenciais urbanos. Essa situação pode ser causada por fatores humanos, ocorrendo rapidamente, e a eutrofização natural pode demorar milhares de anos. Dessa forma, a eutrofização antrópica pode ser considerada um desastre ambiental. A ocorrência de coliformes na água indicaria maior quantidade de matéria orgânica

presente num corpo d'água, e pode favorecer da ocorrência de florações de cianobactérias potencialmente (Belykh *et al.*, 2023; Corman *et al.*, 2023).

### **3.5 Lagos**

Lagos são águas estagnadas de maneira natural ou artificial. Devido a grande necessidade por recursos hídricos nos últimos anos, houve um aumento da criação artificial de reservatórios de água, que favorece a ocorrência de eutrofização, quando comparado a águas correntes (Wiegand, Piedra, Araújo; 2016).

#### **3.5.1 Lago Igapó**

O Lago artificial Igapó (Figura 4), dividido em Igapó I, II, III, e IV, foi originado em 1959, a partir de um trecho represado do Ribeirão Cambé, que nasce Cambé, atravessa a cidade de Londrina, e deságua no Ribeirão Três Bocas e rio Tibagi. Situado no interior da cidade de Londrina, é um espaço propício para atividades de lazer (Oliveira, 2018).

**Figura 4** - Lago Igapó II, Londrina.



**Fonte:** Oliveira (2018).

### 3.5.2 Parque Municipal Arthur Thomas

Parque Arthur Thomas (Figura 5) é uma Unidade de Conservação Municipal, situada na área urbana da cidade de Londrina. Tem área de 85,47 hectares e possui um lago artificial em seu interior, que faz parte do ribeirão Cambé, drenado pelos Córrego Pizza, Monjolo, Bem-te-vi, Carambeí, Picapau e Tico-tico. É gerido pela Secretaria Municipal do Ambiente – SEMA (Londrina – PR). Apresenta área preservada de fauna e flora da Floresta Estacional Semidecidual - Mata Atlântica, representando um excelente local para atividades de lazer, visitação educativa e atividade física (Prefeitura de Londrina, 2023; Campos, *et al.*, 2005).

**Figura 5** - Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina.



**Fonte:** Arquivo pessoal (2022).

### 3.5.3 Lago Jaboti

O município de Apucarana (PR) surgiu em 1943, a partir de colônias de imigrantes ucranianos e japoneses. Tem 988m de altitude e é localizado a 55 km de Londrina. Dentre os pontos de lazer e turísticos da cidade estão o Lago Jaboti e o Parque Ecológico da Raposa. O Parque Municipal Lago Jaboti (Figura 6) foi criado em 1983, e apresenta diversas características que contribuem para o lazer da cidade, como lanchonete, ciclovias e pista de caminhada. Tem área de 230,8 mil metros quadrados, dos quais 150 mil metros quadrados são área do lago Jaboti, com capacidade hídrica de 757 mil metros cúbicos. Esse lago recebe abastecimento das nascentes dos rios Ribeirão Barra Nova, Córrego Jaboti e Córrego Água da Lagoa (Portal Férias, 2023).

**Figura 6** - Parque Jaboti, Apucarana.



**Fonte:** Turismo em Apucarana (2023).

#### 3.5.4 Lago Schmidt

Já o Parque Ecológico da Raposa, criado em 1989, é composto por reserva florestal, lagos (Lago Schmidt) (Figura 7), uma piscina natural, uma cascata artificial, além de rica fauna e flora preservada. A pesca é proibida, no entanto, a alimentação dos peixes é uma das atividades permitidas. Pertencente à Bacia do Rio Tibagi, os lagos represados do parque são abastecidos pelo córrego Ouro Fino, e compõe 11,25 alqueires de área (Turismo em Apucarana; Portal Férias; 2023).

**Figura 7** - Lago Schmidt, Apucarana.



**Fonte:** Turismo em Apucarana (2023).

### 3.5.5 Lago Conde Cambé

O Lago Conde Cambé (Figura 8) na cidade de Cambé, localizado a 3,2 Km do centro da cidade. O lago é utilizado pela população como recreação de crianças e pesca.

**Figura 8** - Lago Conde Cambé, Cambé.



**Fonte:** Arquivo pessoal (2022).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e equipamentos

Os materiais e métodos estão listados a seguir, separados nas categorias de reagentes biológicos, meios de cultura, padrão, reagentes químicos, materiais, e equipamentos.

Reagentes biológicos – imunoquímicos: Híbridoma MC 8-3 produzidos por Yamashita (2013), a partir de Linfócitos B esplênicos de camundongo BALB/c imunizados com MC-LR-BSA, fusionados com células de Mieloma SP2/0-Ag14; MC-LR-BSA (produzidos por Yamashita, 2013), anticorpo IgG anti-*mouse*-HRP (ThermoFisher Scientific, EUA), soro fetal bovino (SFB) (Gibco Co., EUA).

Meios de cultura: meio *Roswell Park Memorial Institute* RPMI 1640 (Gibco Co., EUA); meio *Hybridoma-Serum Free Medium* H-SFM (Gibco Co., EUA).

Padrão: MC-LR *Wako Pure Chemical Industries Ltd* (Japan).

Reagentes químicos: penicilina-estreptomicina líquida (5000 U/mL de penicilina G e 5000 ug/mL de estreptomicina); L-glutamina (Gibco.Co., EUA); sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Synth, Brasil, S1051.01.AG); HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico) (Acros Organics, EUA); água ultrapura (Purelab Classic UF, Elga Labwater Global Operation, Reino Unido); corante vital *Trypan Blue* (BioReagent, T6146); TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina) (T0440); ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Synth, Brasil), gelatina (Wako, Japão), acetato de sódio (NaO<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>) (Anidrol, Brasil), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Alemanha), Cloreto de sódio (NaCl) (Alphatec, Brasil), cloreto de potássio (KCl) (Synth, Brasil), Tween 20 (Synth, Brasil), fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Química Moderna, Brasil) e fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Fmaia, Brasil). Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha), Metanol grau HPLC (Riedel-Honeywell, USA), acetato de amônio grau HPLC (NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) (J.T. Baker, USA).

Materiais: microplaca de 24 poços (TPP, Suíça); microplaca de 96 poços (Costar, EUA); frascos para cultivo de células de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> (TPP, Suíça);

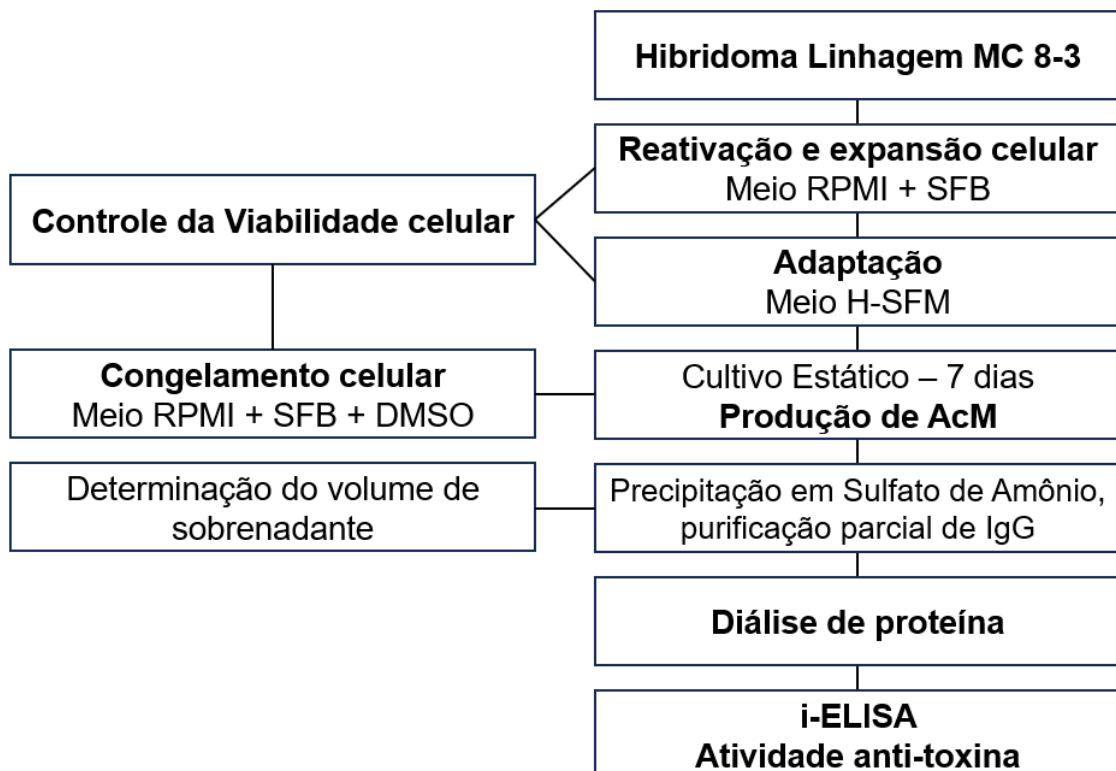
filtro de fibra de vidro 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Alemanha), membrana filtro acetato de celulose (0,2  $\mu\text{m}$  de poro) (Sartorius, Alemanha); criotubo (Corning, EUA), recipiente para congelamento de criotubos (Bio Freezing Vessel, Bicell, Nihon Freezer Co., Japão); saco para diálise (membrana de celulose) (D9777) (Sigma Chemical Co., USA); filtro de microfibras de vidro (GF/C 2,5 cm i.d) (Whatman International Ltd., UK); cartuchos de fase sólida (SPE) - ODS-5 Whatman 500 mg (Cytiva, EUA), filtro com poro 0.22  $\mu\text{m}$  estéril (*Filtropur S 0.2*, Sarstedt, Brasil).

Equipamentos: banho maria (Marconi, Brasil); câmara de Neubauer (Inlab, Brasil); centrífuga (EV:250-M, Evlab, Brasil); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); freezer (-85 °C) (CFC FREE, Sanyo, USA); fluxo laminar (Clean Plus CL FV-09, Veco, Brasil); incubadora sob 5% CO<sub>2</sub> (modelo 3110, Forma Scientific, USA); N<sub>2</sub> gasoso; micropipetas; leitora de microplaca Modelo Zenyth 200 RT (Biochrom, Inglaterra), microscópio invertido (Lamba LGD2, ATTO Instruments Co., China), agitadores orbital shaker (Quimis, Brasil), vórtex modelo 774 (Fisatom, Brasil), sistema de secagem com nitrogênio gasoso, cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Shimadzu Modelo 20, Shimadzu, Kyoto, Japão), acoplado a bomba de solvente LC-10AD, interface CBM-20A, válvula injetora Rheodyne com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ , forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, e computador com *software* LC Solutions.

## 4.2 Cultivo de Hibridoma

O fluxograma abaixo (Figura 9) demonstra as etapas experimentais realizadas para o cultivo do hibridoma. O hibridoma de linhagem MC 8-3, produtor de AcM específico para microcistina-LR, foi previamente gerado através de células esplênicas de camundongo BALB/c imunizado com MC-LR fusionadas com células de mieloma linhagem SP2/0-Ag14, produzido por Yamashita (2013) na *Faculty of Agriculture, Kagawa University*, Japão; e permanece armazenado em Nitrogênio Líquido no laboratório de Produção de Imunorreagentes e Molecular da Universidade Estadual de Londrina. A metodologia seguida para o cultivo celular e purificação de AcM foi baseada nos trabalhos de Ishikawa (2012), Yamashita (2013) e Médici (2016).

**Figura 9** – Etapas experimentais para cultivo de Hibridoma.



Os meios de cultura utilizados no cultivo foram RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) - 1640 com L-glutamina, e H-SFM. Os meios foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante, e acrescentado de antibiótico a fim de evitar contaminação bacteriana, na concentração 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

Os Hibridomas foram retirados do Nitrogênio líquido, colocados em banho de gelo e descongelados por meio de descongelamento rápido em banho maria a 37°C. O conteúdo do criotubo (concentração celular de  $1,6 \times 10^{-5}$  células por mL) foi acondicionado em tubo de ensaio estéril de 15 mL contendo 5 mL de meio RPMI (RPMI 1640 com L-glutamina) com 10% (v/v) de SFB, então centrifugado a 1400 rpm para lavagem das células (*Centrifuge modelo 5810 R Eppendorf*). O sobrenadante contendo DMSO foi descartado, e acrescentado novo meio de cultura para início do cultivo (RPMI suplementado com 50% de SFB). O conteúdo da suspensão de células foi colocado em poços de placa de cultura celular (*Tissue Culture Testplate 24*), sendo adicionado o volume de 200 µL por poço e incubado em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, 37° C e atmosfera úmida. Inicialmente o meio comercial RPMI foi suplementado com SFB, e adaptado gradualmente para meio de cultura H-SFM, conforme protocolo utilizado em nosso laboratório (Tabela 1), sendo a troca do meio de cultura feita a cada dois dias. O sobrenadante era retirado com auxílio de pipetas descartáveis de 5, 10 ou 25 mL, e era acrescentado novo meio de cultura no frasco. Conforme expansão celular o cultivo foi transferido das placas para frascos de cultivo do tipo T de 75 cm<sup>2</sup>. Após adaptação completa ao meio de cultura livre de SFB, prosseguiu-se cultivo estático durante 7 dias em frascos de cultivo.

**Tabela 1** – Condições aplicadas na adaptação de Hibridoma em cultivo celular com meios de cultura RPMI e H-SFM.

Tempo (Dias de cultivo)	Meio de cultura e suplementação (v/v)
1	50% RPMIc + 50% SFB
3	60% RPMIc + 40% SFB
5	70% RPMIc + 30% SFB
7	80% RPMIc + 20% SFB
9	90% RPMIc + 10% SFB
11	100% RPMIc
13	75% RPMIc + 25% H-SFM
15	50% RPMIc + 50% H-SFM
17	25% RPMIc + 75% H-SFM
19	100% H-SFM

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RPMIc: RPMI + 10% SFB

SFB: Soro Fetal Bovino

H-SFM: *Hybridoma-Serum Free Medium*

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante, esterilizados por meio de filtração em filtro com poro 0.22 µm estéril em frascos de vidro de 1L previamente esterilizados por autoclave. Foram mantidos armazenados em geladeira em temperatura entre 2°C a 8°C até o momento do uso, quando eram aquecidos a 37°C.

#### 4.2.1 Controle de Densidade e Viabilidade Celular

A densidade e viabilidade celular foram analisadas a cada dois dias, com coloração azul de *Trypan* e contagem em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 50 µL era retirada do cultivo, colocada em microtubo e acrescentada de mesmo volume do corante azul de *Trypan*. Após homogeneização, uma gota da suspensão era colocada em câmara de Neubauer, coberta com lamínula e visualizada em

microscópio ótico. As células foram contadas e determinadas como viáveis (células incolores, onde o corante azul não penetra) e inviáveis (células coradas pelo corante devido a lesão de membrana). A densidade celular foi calculada em número de células por mL, como demonstrado na Equação 1, a partir da contagem de células em 4 quadrantes da câmara de Neubauer, enquanto o cálculo de viabilidade foi feito por porcentagem.

#### **Equação 1 – Cálculo da Viabilidade Celular**

$$\frac{L + L + L + L}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{cel/mL}$$

Onde L representa o número de células em cada quadrado da câmara de Neubauer.

#### 4.2.2 Congelamento Celular

Para manutenção do estoque de hibridoma foi realizado o congelamento celular. Foi preparado o meio de congelamento composto por 10% DMSO, 40% de SBF, e 50% de RPMI e a partir de cultivo celular em fase de crescimento exponencial (densidade celular de  $10^7$  cél.mL<sup>-1</sup>) prosseguiu-se o congelamento.

Foi adicionado 10 mL do novo meio de cultura ao frasco de cultivo de 150 cm<sup>2</sup>, e as células aderidas ao frasco foram desprendidas com auxílio de uma pipeta. O conteúdo foi colocado em tubo de centrifuga e centrifugado a 1400 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em 5 mL de meio de congelamento previamente preparado. O conteúdo foi distribuído em criotubos, sendo 1 mL por criotubo. Os criotubos foram colocados em frasco para congelamento, deixados em freezer -80°C durante 24 horas, e em seguida, armazenados em Nitrogênio líquido.

#### 4.2.3 Purificação Parcial de AcM anti-MC-LR

A partir do sobrenadante resultante dos 7 dias de cultivo estático em meio de cultura H-SFM, foi realizada a purificação dos AcM através de precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O sobrenadante foi colocado em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugados a 5000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi determinado o volume do sobrenadante e o conteúdo celular formado no *pellet* foi descartado. Foi acrescentado Sulfato de Amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) na concentração de 60% de saturação ao sobrenadante (p/v; sendo 243 g.L<sup>-1</sup>) e os tubos foram deixados sob agitação lenta durante 18 horas a 4°C para precipitação proteica. Os tubos foram novamente centrifugados a 9100 rpm, por 30 minutos a 4°C, e a solução precipitada foi coletada e ressuspendida em 1 mL de PBS para posteriormente ser submetido a diálise de proteína. Foi realizada diálise em membrana de diálise previamente tratada (*Dialising Tubing Cellulose Membrane*, tamanho 10 mm x 6 mm, *Sigma Aldrich*). A diálise ocorreu em PBS (6x 1L), durante 72 horas (Yamashita, 2013). Após essa purificação parcial o conteúdo foi colocado em microtubo, acrescentado do 50% de glicerol (v/v) e armazenado em ultrafreezer -80°C. A atividade antitoxina do AcM foi verificada por i-ELISA.

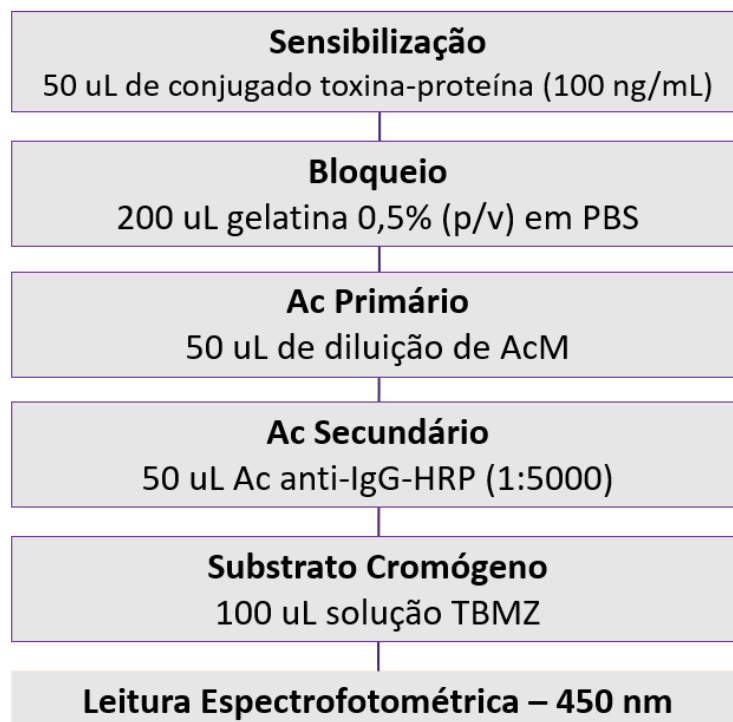
#### 4.2.4 Titulação dos AcM por i-ELISA

A atividade de AcM produzidos pelas células foi analisado por i-ELISA, seguindo protocolo descrito por Nagata *et al.* (1997), com algumas modificações (Figura 10). A sensibilização da placa foi feita com 50 µL por poço de solução de conjugado MC-LR-BSA em tampão fosfato salina 0,015 M pH 7,4 (PBS)

(100 ng.mL<sup>-1</sup>). A placa foi incubada por 18 horas a 4°C, e em seguida prosseguiu-se 3 lavagens com PSBT (PBS *Tween*) para remoção dos componentes não ligados. O bloqueio foi feito com 200 µL de solução de gelatina a 0,5% em PBS, na qual a placa foi incubada durante 1 hora a temperatura ambiente, prosseguindo-se 3 lavagens novamente. O anticorpo primário utilizado foi o AcM anti-MC-LR produzido e purificado previamente, diluído em PSBT nas seguintes concentrações: 1; 1/10; 1/100; 1/1000; e 1/10000. Foram acrescentados 50 µL por poço e incubados durante 1 hora. Em seguida, após 3 lavagens em PBST, foi utilizado 50 µL de anticorpo secundário anti-IgG-HRP (1:5000) em PBST, incubado por 1 hora e lavados posteriormente 6 vezes.

Por fim, adição de 100 µL de solução de substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubados durante 20 minutos ao abrigo da luz. Após adição de 50 µL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm.

**Figura 10** – Etapas i-ELISA.

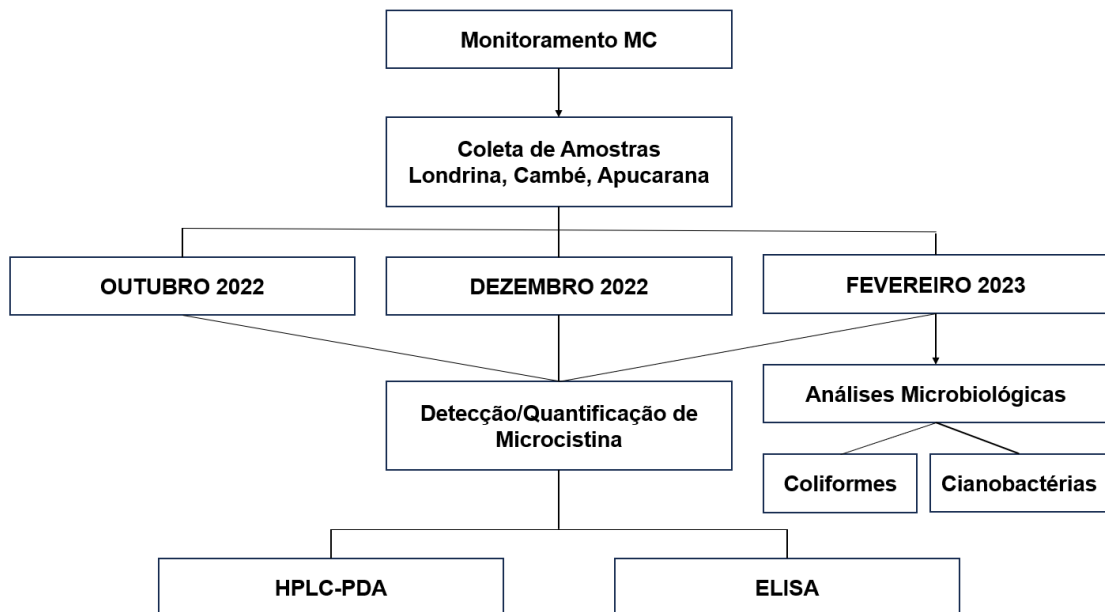


**Fonte:** Adaptado de Nagata *et al.* (1997)

### 4.3 Análise das amostras de água

A análise das amostras de água foi realizada de acordo com o delineamento demonstrado na Figura 11.

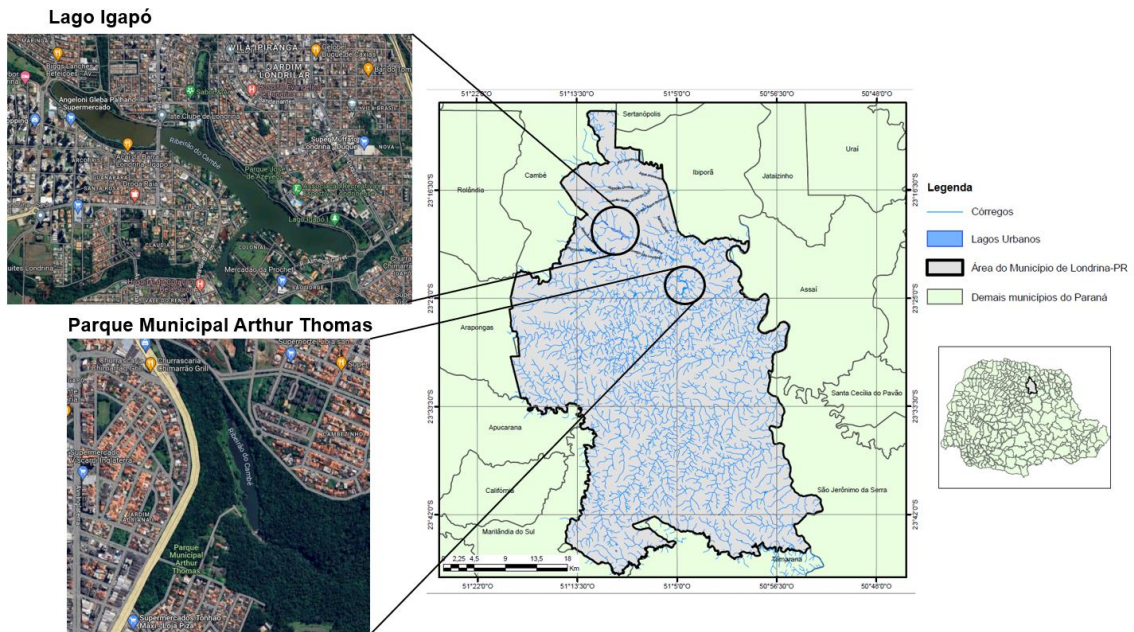
**Figura 11** - Delineamento Experimental para análise amostras de água.



#### 4.3.1 Coleta das amostras – Área e Período do estudo

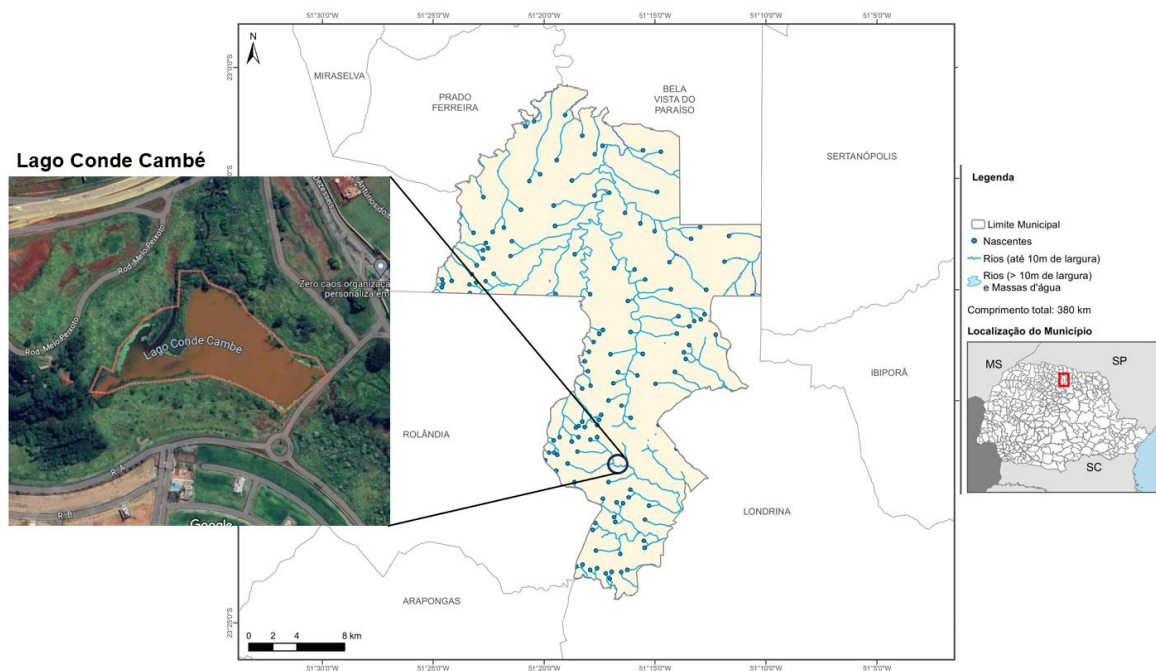
Um total de 51 amostras de água foram coletadas em lagos dos Municípios de Cambé (1 lago; Figura 13), Londrina (3 lagos; Figura 12) e Apucarana (2 lagos; Figura 14). Três pontos estratégicos de coleta foram determinados em cada lago, sendo Lago Conde em Cambé; Lago Igapó II, Lago Igapó III, e Lago do Parque Municipal Arthur Thomas, em Londrina; e Lago Jaboti e Lago Schimdt em Apucarana, no período de outubro/2022 a fevereiro/2023. Os pontos escolhidos para a coleta foram o mais distante possível entre si, buscando uma amostragem mais representativa do lago como um todo.

**Figura 12 - Área de estudo – Londrina.**



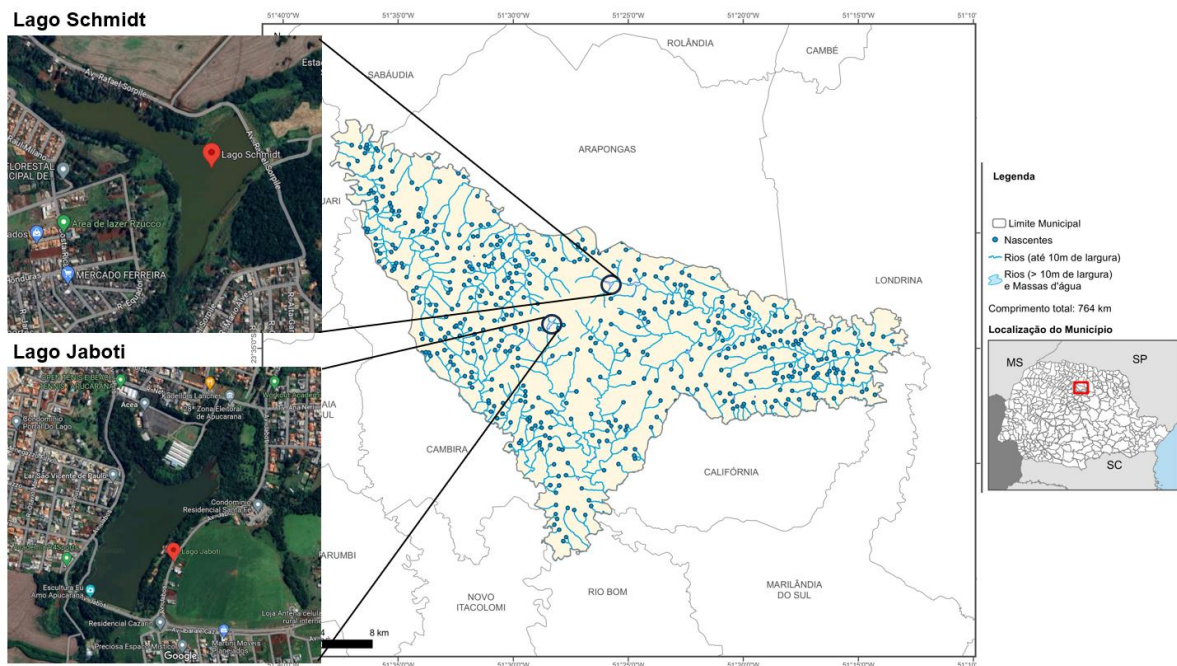
Fonte: adaptado de IPPUL (Instituto de pesquisa e planejamento urbano de Londrina); e GoogleMaps, 2023.

**Figura 13 - Área de estudo – Cambé.**



Fonte: adaptado de FBDS (Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável); e GoogleMaps, 2023.

**Figura 14** - Área de estudo – Apucarana.



**Fonte:** adaptado de FBDS (Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável); e GoogleMaps, 2023.

As amostras foram coletadas das margens dos lagos (Figuras 15-20), na superfície, e em frascos de polietileno tereftalato (PET) de 500 mL, em profundidade aproximada de 30 cm. Foram imediatamente levadas ao laboratório de análise – Laboratório de Produção de Imunorreagentes e Molecular, CCA – Centro de Ciências Agrárias, UEL – Universidade Estadual de Londrina. Após homogeneização das amostras, uma alíquota de 50 mL foi separada para análises microbiológicas em novo frasco estéril e armazenada a 4°C, enquanto o restante foi armazenado em freezer -20°C. As amostras congeladas foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, para rompimento da parede celular das possíveis cianobactérias presentes e liberação da cianotoxina (Silva-Stenico *et al.*, 2009).

**Figura 15** - Lago Conde, Cambé.



**Fonte:** Arquivo pessoal (2022).

**Figura 16** - Lago Igapó II, Londrina.



**Fonte:** Arquivo pessoal (2022).

**Figura 17** - Lago Igapó III, Londrina.



Fonte: Arquivo pessoal (2022).

**Figura 18** – Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina.



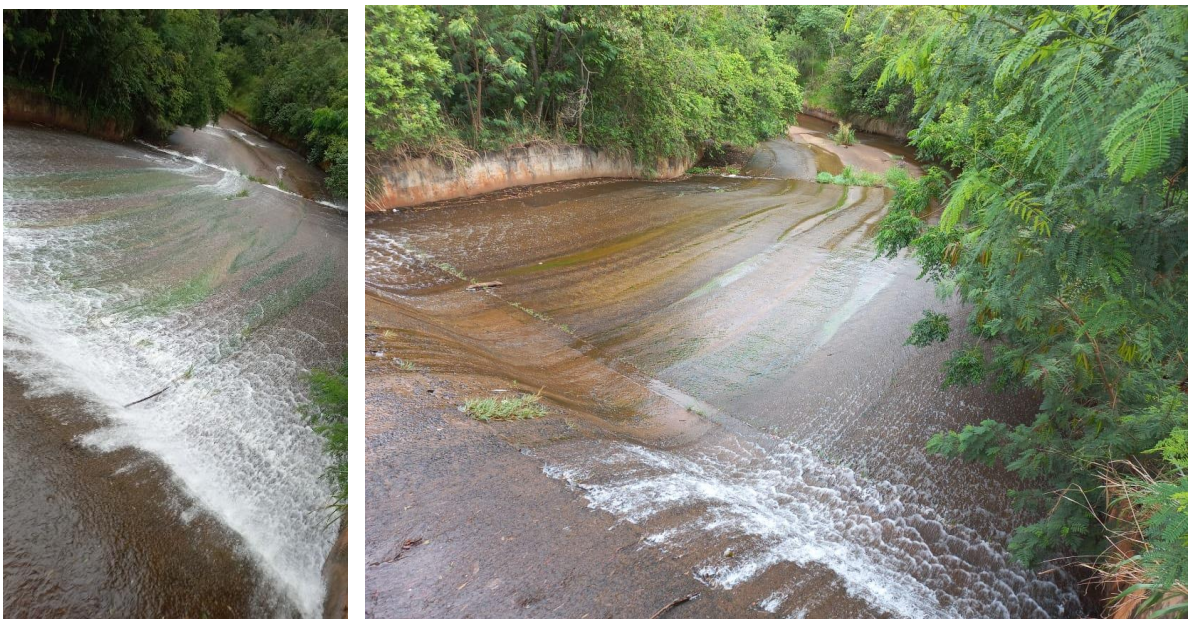
Fonte: Arquivo pessoal (2022).

**Figura 19** - Lago Schmidt, Apucarana.



Fonte: Arquivo pessoal (2022).

**Figura 20** - Lago Jaboti, Apucarana.



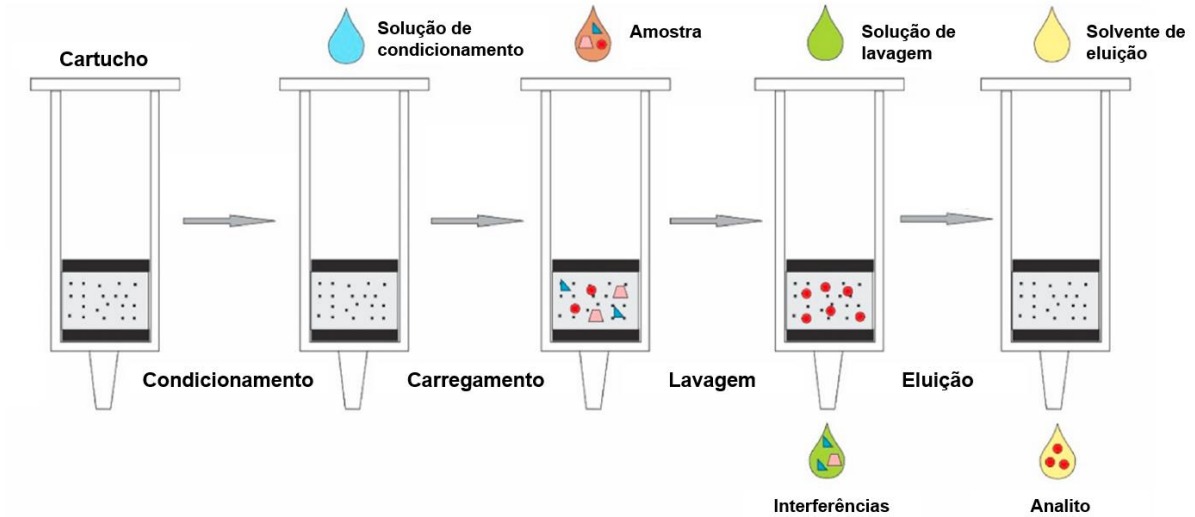
Fonte: Arquivo pessoal (2022).

### 4.3.2 Análise por HPLC-PDA

#### 4.3.2.1 Preparo da amostra - Pré-concentração da microcistina

Após três ciclos de gelo e degelo das amostras, procedeu-se filtração em Membrana Fibra de Vidro 47 mm para retirada de impurezas. Em seguida, 150 mL das amostras foram submetidas a uma etapa de pré-concentração antes da análise cromatográfica, que consistiu em Extração em Fase Sólida – SPE, com utilização de Cartucho SPE – Whatman ODS-5, 500 mg. Os cartuchos foram conectados a sistema a vácuo composto por bomba a vácuo e ar comprimido, com pressão entre 100 e 150 mm Hg e vazão entre 2 e 5 mL.min<sup>-1</sup>. Foram realizadas etapas de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição (Figura 21). O condicionamento para ativação do cartucho SPE foi realizado com a passagem de 5 mL de metanol (grau HPLC) e em seguida 5 mL de água ultrapura. O carregamento foi realizado com a passagem de 150 mL da amostra pelo cartucho, onde o analito ficou retido. A lavagem consistiu na passagem de 5 mL de água ultrapura para retirada de possíveis impurezas retidas. Após a lavagem, foi realizada a eluição do analito em solvente, com a passagem de 5 mL de metanol, em duas etapas de 2,5 mL em tubos de vidro, para facilitar a etapa seguinte de secagem (Maranata *et al.*, 2021). Em seguida, o solvente foi seco em fluxo de Nitrogênio gasoso, onde os tubos foram imersos em banho maria a 40°C. Após a secagem, os tubos contendo amostras secas foram armazenados a -20°C. No momento da análise, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de solvente metanol, resultando em fator de concentração de 150x, e filtradas em filtro de seringa 0.45 µm (Millex Hn Nylon, 13 mm).

**Figura 21** - Etapas de pré-concentração da amostra. Fonte Maranata *et al.*, 2021, adaptado.



**Fonte:** adaptado de Maranata *et al.* (2021).

#### 4.3.2.2 Método Cromatográfico

O método cromatográfico utilizado em HPLC-PDA (*High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array*) foi adaptado de Kuroda *et al.* (2007), e previamente validado intralaboratorialmente em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® acoplado a detector PDA. Os dados foram obtidos pelo software LC Solutions® em computador. Foi utilizado método de separação isocrático, fase móvel (FM) sendo acetonitrila:acetato de amônio 20 mM (27:73, v/v), vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna de guarda C18 (4x3.0 mm - Phenomenex®) e coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm - Phenomenex®), temperatura do forno a 30°C. O tempo de corrida foi de 12 minutos e o comprimento de onda observado em 238 nm. O tempo de retenção da MC é de 10,2 minutos, e o volume de injeção foi de 20 µL. A área dos picos obtidos foi utilizada para cálculo dos resultados pela equação da reta da curva analítica de calibração pré-concentrada.

#### 4.3.2.3 Curva de calibração

Foi construída uma curva analítica de calibração pré concentrada, utilizando água coletada de lago sabidamente não contaminada com MC. Os pontos para a curva foram as concentrações de 0,3; 0,8; 1,3; 2,0, 2,5; e 3,0 µg/L. Um volume de 150 mL de água foi utilizado para o preparo de cada ponto da curva, fortificado com o padrão de MC-LR 2.000 µg/L para as concentrações finais pré-estabelecidas. Após a fortificação, as amostras passaram pelas etapas de pré-concentração, secagem e eluição, como descrito no item 4.3.2.1; e foram injetadas no cromatógrafo em triplicata. Foi construído o gráfico e gerada a equação da reta da faixa de trabalho de 0,3 a 3,0 µg/L.

#### 4.3.3 Análise Microbiológica – Coliformes

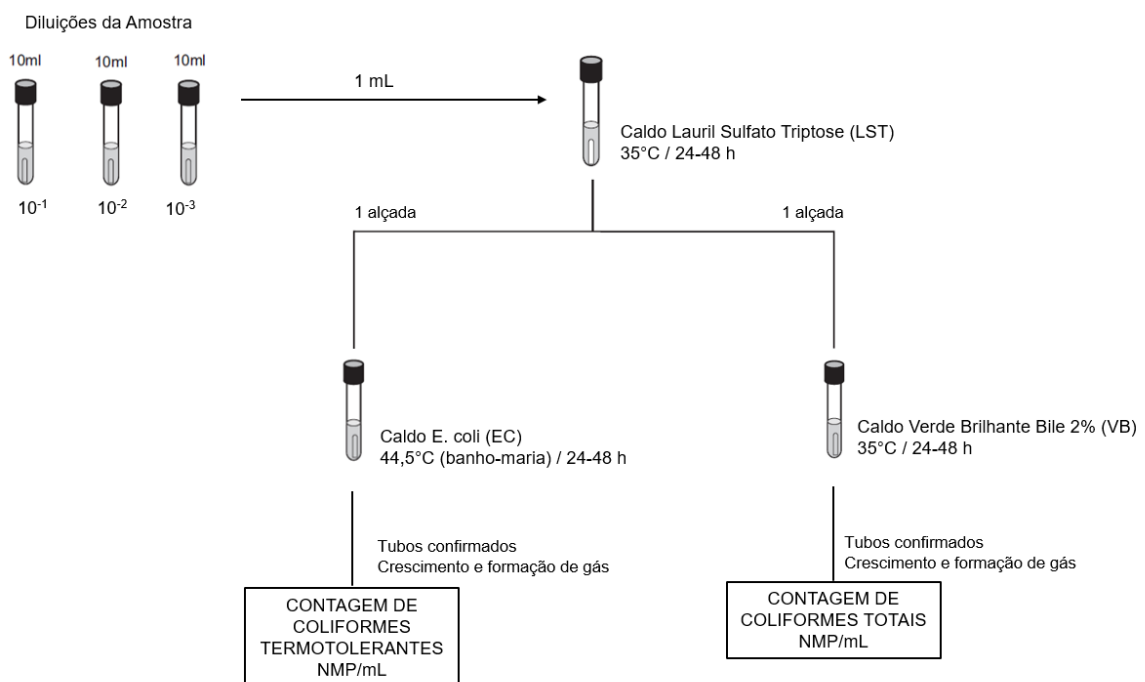
Para indicador de contaminação microbiológica dos lagos, foi realizada verificação da água quantitativamente pelo método de NMP (Número Mais Provável) quanto a coliformes totais e termotolerantes, através do teste de diluição múltipla (Silva *et al.*, 2010) das amostras de fevereiro de 2023. A análise consistiu em uma amostra representativa para cada lago estudado, obtida através das três amostras referentes ao mesmo lago. Os testes Presuntivo e Confirmatório de coliformes totais e termotolerantes foram realizados nos determinados meios de cultura previamente autoclavados em tubos de ensaio contendo tubo de Durhan, para visualização da formação de gás em caso de fermentação da lactose presente no meio.

A diluição múltipla das amostras ocorreu com base na contaminação estimada da amostra. Nesse caso, foram realizadas as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .

O teste presuntivo foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), onde foi pipetado em triplicata uma alíquota de 1 mL de cada diluição previamente preparada. Os tubos foram

incubados a 35°C por 24-48 horas. Foram considerados positivos os tubos em que houve turvação com formação de gás no tubo de Durham. A partir dos tubos de LST positivos, foi retirada uma alçada e novamente inoculado em 10 mL de caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e caldo E. coli (EC) para teste confirmatório de coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. A incubação dos tubos de VB de 24-48 horas a 35°C, enquanto dos tubos de EC é de 44,5° C por 24-48 horas, em banho-maria.

**Figura 22** - Metodologia Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes NMP.



**Fonte:** adaptado de Silva *et al.* (2010).

#### 4.3.4 Identificação de cianobactérias

Alíquotas de 1mL das amostras foram pipetadas em tubo tipo Falcon instantaneamente ao chegar no laboratório, e foi pipetado 40 µL de corante lugol para fixação. Após sedimentação, no dia seguinte, os sedimentos foram observados ao microscópio em lâmina de vidro, e as cianobactérias foram sugestivamente

identificadas quanto ao gênero através de comparação morfológica de imagens do Manual Ilustrado para Identificação de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras (Sant'Anna, 2006; Ramos *et al.*, 2015).

#### 4.3.5 ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

As amostras foram analisadas pelo kit comercial (*EnviroLogix QuantiPlate Kit for Microcystins*) para detecção da toxina microcistina em amostras de água, de acordo com as recomendações do fabricante. Previamente à análise, as amostras passaram por 3 ciclos de gelo e degelo, e filtragem em membrana de papel filtro para retirada de impurezas. Até o momento da análise, ficaram congeladas a -20°C.

#### 4.4 Análise Estatística

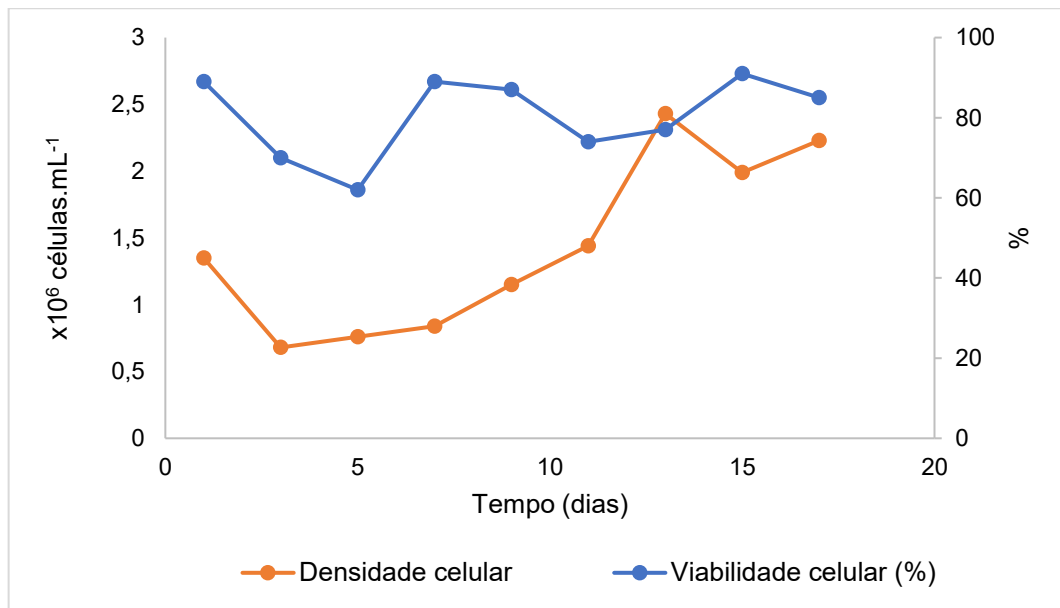
Foi utilizado o teste de ANOVA para verificação da diferença entre médias, e teste *Tukey*, com intervalo de confiança de 95% no Programa Statistica versão 7.0 (Tulsa, EUA) para a comparação entre os resultados.

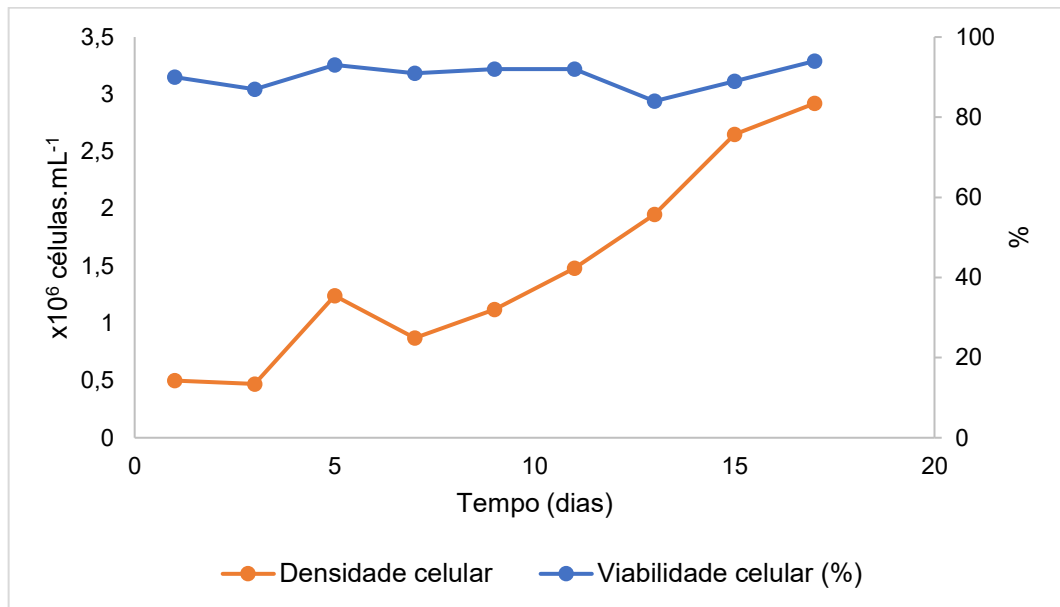
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cultivo de Hibridoma MC

No primeiro cultivo do hibridoma MC 8-3 ( $2,5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>); a viabilidade e densidade celular são apresentadas na Figura 23, chamado de cultivo 1. Foi realizado novamente um cultivo de Hibridoma MC 8-3 ( $2,5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>), apresentado na Figura 24, e chamado de cultivo 2.

**Figura 23** - Cultivo 1 - Hibridoma MC 8-3 - Densidade e viabilidade celular



**Figura 24** - Cultivo 2 - Hibridoma MC 8-3 - Densidade e viabilidade celular

A reativação dos hibridomas teve início em meio RPMI com 50% suplementação de SFB, e a troca do meio de cultura foi feita a cada 2 dias. A suplementação foi reduzida de 10 em 10%, até completa adaptação em meio RPMI. Após, introduziu-se 25% de meio H-SFM, e prosseguiu-se adaptação de 25 em 25% até que o cultivo ficasse completamente livre de SFB, conforme demonstrado na Tabela 1, no item 4.2 deste trabalho. Além disso, conforme o aumento da densidade celular, foi realizada a expansão para frasco de cultivo maior.

Em ambos os cultivos, a densidade celular média foi superior a  $1,4 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>; sendo igual a  $1,43 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> no cultivo 1; e  $1,46 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> no cultivo 2. Enquanto a viabilidade celular média foi igual a 80,4% para o cultivo 1, e 90,2% para o cultivo 2. A maior concentração celular no cultivo 1 foi obtida no 13° e correspondeu a  $2,43 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>, enquanto no cultivo 2, ocorreu no 17° de cultivo correspondendo a  $2,92 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>. Diferentemente, Damada (2019) obteve a maior concentração celular no 3° dia de cultivo, o valor de  $2,7 \times 10^8$  cél.mL<sup>-1</sup>, e viabilidade superior a 97%, em cultivo de hibridomas PC-61 anti-CD25 para uso em imunoterapia (Damada, 2019). Essa diferença pode ser justificada por diversas características distintas entre os trabalhos, como quantidade celular do inóculo, utilização de apenas meio RPMI com a suplementação de SFB, volume total de meio de cultura, utilização de biorreator com agitação ao invés de frascos estáticos.

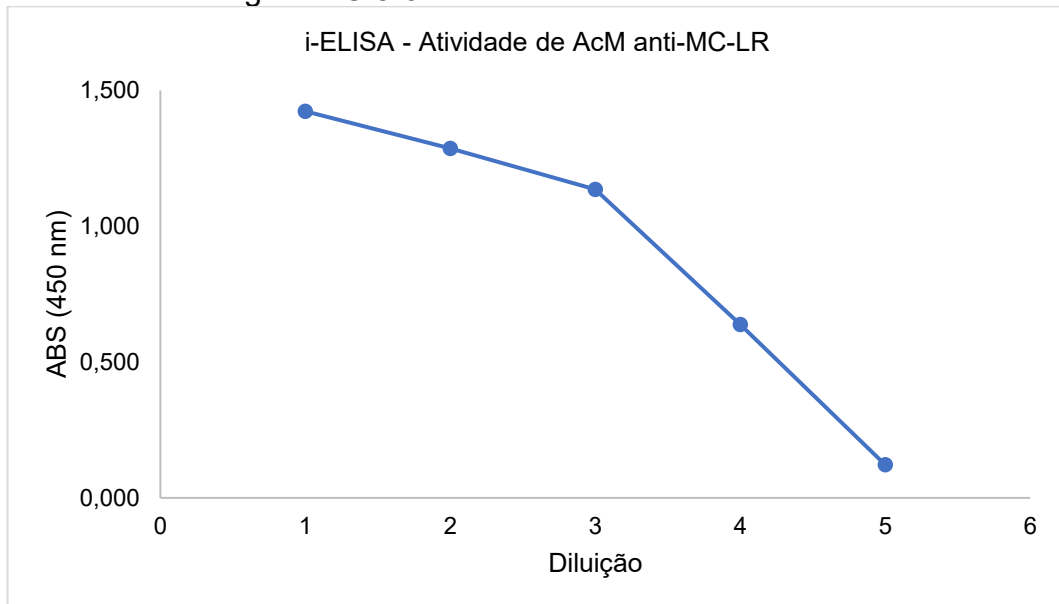
No cultivo 1, é possível observar pelo gráfico uma queda de viabilidade nos 5 primeiros dias de cultivo, que pode ser justificado pelo próprio descongelamento e reativação celular, e pela adaptação de meio de cultura com a diminuição da suplementação com SFB de 50%, para 40% e depois 30%, na terceira troca de meio, caracterizando a fase lag de baixo crescimento celular. Em seguida, a partir do 5º dia, a viabilidade aumenta, assim como a densidade celular, demonstrando que os hibridomas entraram em fase de crescimento (Butler, 2005).

O cultivo 2 mostrou menos interferência durante a adaptação de meio de cultura, mantendo viabilidade praticamente constante e densidade crescente até o dia 17, ao fim da manutenção completa com meio H-SFM. A pequena queda de viabilidade ocorreu após o dia 11, quando foi encerrada a suplementação com SFB e iniciou-se a manutenção com H-SFM. O meio H-SFM tem sido relatado por proporcionar ótimo crescimento de hibridomas e favorecer produção e purificação dos AcM (Prampero, 2017).

Os meios de cultivo livres de SFB promovem os nutrientes básicos para o crescimento celular, mas o SFB é usado como suplemento em culturas celulares para estimular o crescimento das células por conter fatores de crescimento, hormônios, minerais, enzimas, dentre outros (Legazpi *et al.*, 2005; Butler, 2005). Apesar da suplementação com SFB aumentar a eficiência de cultivo e a produção de AcM, possui algumas desvantagens como alto custo, risco de contaminação e dificuldade na purificação dos AcM produzidos (Butler, 2005; Freshney, 2010; Prampero, 2017).

A atividade anti-microcistina do AcM produzido após 7 dias de cultivo estático em H-SFM e purificados por diálise de proteína em membrana, foi avaliada por i-ELISA (Cultivo 2). O resultado é apresentado na Figura 25. Para a verificação da atividade anti-microcistina e posterior utilização dos AcM produzidos, foi definido o título através de imunensaio, que é definido como a diluição referente a 50% da máxima ligação de AcM (IC50). Foram utilizadas as diluições 1 (1), 1/10 (2), 1/100 (3), 1/1000 (4), e 1/10000 (5). Portanto, a diluição ideal foi em torno de 1/1000. O volume final de dialisado adquirido foi aproximadamente 20 mL.

**Figura 25** - Atividade anti-MC-LR por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma linhagem MC 8-3 em meio H-SFM.



A aplicação de AcM específicos anti MC-LR como biossensores em um estudo de Han *et al.* (2013), permitiu o implemento de alta sensibilidade e especificidade em sensores eletroquímicos baseado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Foi validada a detecção da cianotoxina na faixa de trabalho de 0,05 a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo o limite mínimo de detecção bem abaixo do limite máximo permitido pela OMS de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para água potável (Han *et al.*, 2013).

Atualmente, além dos testes clássicos de ELISA ainda utilizados, novas metodologias têm sido desenvolvidas com base no princípio imunológico para detecção de toxina. É o exemplo dos imunoenaios recentes com sinal óptico, como Imunoensaio colorimétrico, Imunoensaio de quimioluminescência enzimática, e Fluorimunoensaio. O sinal óptico é reconhecido a olho nu na maioria das vezes, possibilitando análises *in loco*, sem necessidade de equipamentos (Zhang *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

Outra possibilidade são Imunoenaios com sinal elétrico, que associam rápida detecção sem dificuldade no preparo e operação. A essência dessa tecnologia envolve um imuno-eletrodo, que pode ser composto por diversas

possibilidades de nanomateriais, inclusive biocompatíveis, ganhando destaque em análises médicas e ambientais (Zhang *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

## 5.2 Contaminação de Lagos por MC-LR

### 5.2.1 Codificação das amostras

**Tabela 2** - Codificação de amostras, considerando lago coletado e período.

	Lago 1	Lago 2	Lago 3	Lago 4	Lago 5	Lago 6
<b>Outubro 2022</b>	1	4	7	10	-	16
	2	5	8	11	-	17
	3	6	9	12	-	18
<b>Dezembro 2022</b>	19	22	25	28	31	34
	20	23	26	29	32	35
	21	24	27	30	33	36
<b>Fevereiro 2023</b>	37	40	43	46	49	52
	38	41	44	47	50	53
	39	42	45	48	51	54

### 5.2.2 Análise por Cromatografia Líquida (HPLC-PDA)

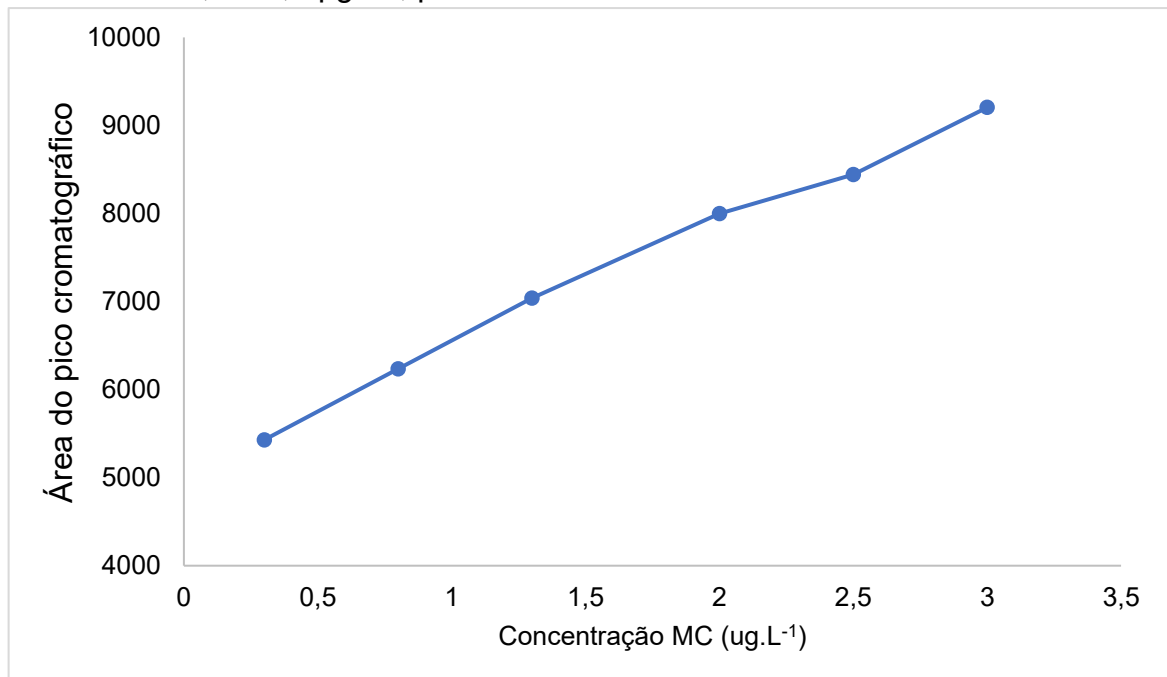
A etapa de pré-concentração da amostra promoveu um fator de concentração de 150x da cianotoxina, possibilitando detecção de menores concentrações no método cromatográfico. Foi construída a curva analítica pré-concentrada, a partir de amostras de água ambiental sabidamente não contaminada e artificialmente fortificada com padrão de MC-LR. Os pontos da curva foram

construídos em volume de 150 mL nas concentrações de 0,3; 0,8; 1,3; 2,0, 2,5; e 3,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Posteriormente, foram submetidos ao processo de pré-concentração, eluição, secagem e ressuspensão em Metanol grau HPLC, semelhante ao das amostras, para atingirem o fator de concentração de 150x. Através da curva analítica na faixa de trabalho de 0,3 a 3,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , foi obtido coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9941$  e a equação da reta (Equação 2), na qual y é o valor da área do pico obtido no cromatograma, e x equivale ao valor de MC-LR em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 26). O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método previamente validado no laboratório é de 0,27 e 0,91  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

### Equação 2

$$y = 1368,7x + 5130,8$$

**Figura 26** - Curva analítica de calibração pré-concentrada na faixa de trabalho 0,3 a 3,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , por HPLC-PDA.



Após a análise em triplicata das 51 amostras pelo método cromatográfico, duas amostras de um mesmo lago, e coletadas no mesmo período, apresentaram contaminação de 6,98 e 1,02  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (outubro, Lago 1, Tabela 3). A amostras 1 foi diluída em água ultrapura para se encaixar na curva de calibração.

Além disso, a terceira amostra coletada nesse lago e nesse período teve a ocorrência de microcistina identificada, porém abaixo do LQ, e por isso não pôde ser quantificada.

**Tabela 3** – Monitoramento de MC-LR por HPLC-PDA.

Lago	Microcistina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )								
	Outubro			Dezembro			Fevereiro		
1	6,98 ± 0,23	1,02 ± 0,04	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	--	--	--	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – Não detectado, considerando LD = 0,27  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

<LQ – Valor abaixo do LQ do método, considerando LQ = 0,91  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

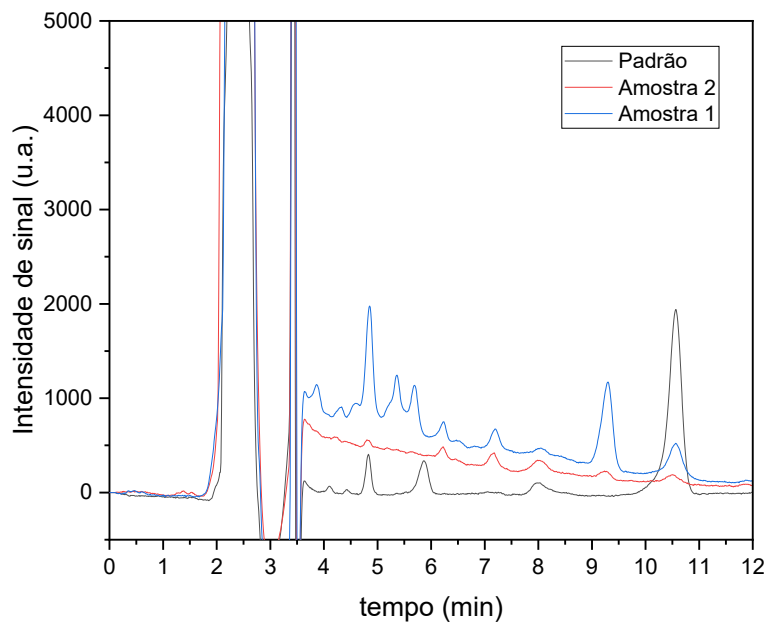
Diversas amostras apresentaram ruído no cromatograma, incluindo no tempo de retenção próximo ao pico do analito, MC-LR, indicando que o método de preparo de amostra se mostrou não totalmente eficiente. Os ruídos podem ter omitido algum pico menor de toxina e impedido a identificação de contaminação em algumas amostras. Isso poderia ser melhorado com mais etapas de limpeza da amostra, ou uma melhor etapa de extração da toxina a fim de diminuir efeitos de matriz e possibilitar detecção de valores próximos ao limite mínimo de detecção do método.

O cromatograma do padrão de MC-LR (2.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), e das amostras 1 e 2, referentes ao Lago 1, em outubro, correspondendo à contaminação de 6,98 e 1,02  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , estão representados na Figura 27.

Pavlova *et al.* (2015), estudaram a ocorrência de cianotoxinas em corpos d'água por HPLC-PDA, no período de 2012 a 2014 na Bulgária, e detectaram a ocorrência de MC-LR em todos os lagos estudados. A concentração de microcistina encontrada variou entre 0,1 a 1,8  $\mu\text{g/L}$ . Além disso, também identificaram que a ocorrência de cianotoxinas variou de acordo com o período analisado (Pavlova *et al.*, 2015). A temperatura ideal e favorável ao crescimento das cianobactérias é acima de 25°C, enquanto a produção de cianotoxinas ocorre principalmente entre 18 e 25°C. Temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 30°C reduzem a produção da toxina

(Ramos *et al.*, 2015). Dessa forma, a estação do ano pode estar associada ao período de maior aparecimento de cianobactérias e conseqüentemente produção de toxinas, devido a temperaturas ideais de crescimento, bem como acúmulo de nutrientes.

**Figura 27** - Cromatograma de HPLC-PDA de padrão de MC-LR (2.000 ng.L<sup>-1</sup>), e amostras 1 e 2, referente ao lago 1 em outubro 2022.



Na região de Londrina, Cambé e Apucarana, onde são localizados os lagos estudados, a temperatura média é entre 18 e 30°C nos meses de outubro a janeiro, período em que ocorreu o estudo, sendo dentro da faixa de temperatura ideal para produção da toxina. Além disso, outros fatores podem ser considerados, como a ocorrência de nutrientes, provenientes de dejetos humanos ou industriais próximos à localização do lago, que aumentam a concentração de nutrientes como fósforo e nitrogênio, além de radiação solar, pH, saturação de oxigênio. As duas amostras que apresentaram MCs foram coletadas em outubro, no final da estiagem. Nos próximos meses, pode ter havido diluição por conta da precipitação, o que justificaria as baixas concentrações da toxina.

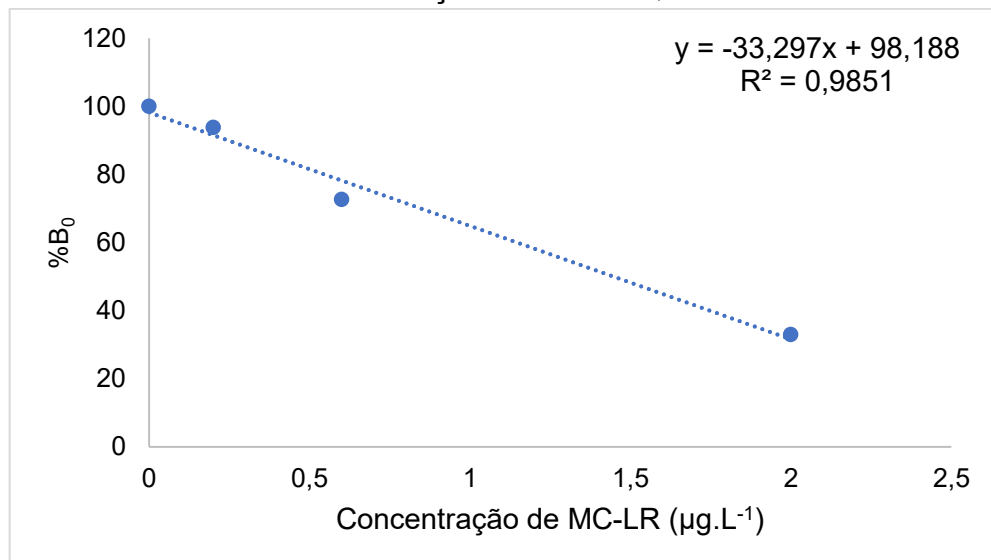
Em Caruaru, Pernambuco, Brasil, foi verificada a ocorrência de microcistina, em rios de abastecimento de centro industrial na qual todas as amostras

foram positivas para a toxina e para a ocorrência de florações de cianobactérias. Foi utilizado pré-concentração de amostras pelo método de cartucho SPE com eluição em metanol, e separação cromatográfica e identificação por HPLC-PDA. As concentrações de microcistina encontradas variaram de 23,33 a 1814,88  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os autores ressaltaram a importância do controle e vigilância de rios e mananciais, principalmente os destinados ao abastecimento hídrico (Ramos *et al.*, 2015).

### 5.2.3 ELISA – *QuantiPlate Kit for Microcystins*

O kit comercial *Envirologix QuantiPlate Kit for Microcystins* foi utilizado para a detecção imunoenzimática da cianotoxina de acordo com as recomendações do fabricante. O teste é um imunoenensaio competitivo e possui limite de detecção (LD) igual a 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto o limite de quantificação é igual a 0,2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A partir das soluções controle do kit, foi realizada a curva analítica do teste, com linearidade na faixa de 0,2 a 2,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de MC-LR (Figura 28).

**Figura 28** - Curva analítica de calibração do ELISA *QuantiPlate Kit for Microcystins*.



A curva analítica considera o valor de %B<sub>0</sub>, que é um valor utilizado para o cálculo que minimiza as diferenças dentre vários ensaios realizados, através

da comparação com os valores de absorvância dos padrões que se mantém constante (Equação 3). Dessa forma, a curva analítica construída obteve a Equação 4; com valor de  $R^2=0,9851$ ; onde  $y$  é o valor de %B0, e  $x$  equivale ao valor de MC-LR em  $\mu\text{g/L}$ .

### Equação 3

$$\%B0 = \frac{DO \text{ média do Controle ou Amostra}}{DO \text{ média do Controle Negativo}} \times 100$$

### Equação 4

$$y = -33,297x + 98,188$$

As amostras foram analisadas em duplicata pelo teste, sem realização de concentração, apenas filtração para retirar impurezas. Com os valores de absorvância foi calculado a %B0, e em seguida calculado o valor de MC a partir da equação da reta. Foi verificada a ocorrência de MC em 7 amostras. Os resultados obtidos dentre todas as amostras foram de não detectado (ND) a  $6,26 \mu\text{g/L}$ . Todas as amostras que apresentaram contaminação foram de um mesmo lago. A amostra de número 1 obteve inicialmente um valor alto fora da curva de calibração, e então foi diluída na proporção 1:8 em água destilada, e o resultado foi multiplicado pelo fator de diluição. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Monitoramento de MC-LR por ELISA *QuantiPlate Kit for Microcystins*.

Lago	Microcistina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )								
	Outubro/2022			Dezembro/2022			Fevereiro/2023		
1	$6,26 \pm 0,13$	$0,83 \pm 0,06$	$0,61 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03$	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	--	--	--	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – Não detectado, considerando LD =  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Somente uma amostra, coletada em outubro no Lago 1 apresentou contaminação de MC-LR maior do que o permitido pela legislação. No entanto, o valor encontrado ( $6,26 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) é mais de 6x superior ao limite máximo e merece atenção. Além disso, outra amostra coletada no mesmo lago e no mesmo período apresentou contaminação próximo ao limite permitido. Vale ressaltar também que todas as amostras que apresentaram alguma contaminação de MC foram do Lago 1.

**Tabela 5** – Monitoramento de MC-LR no Lago 1, ELISA.

		<b>Microcistina (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>		
<b>Ponto de amostragem</b>		<b>Outubro</b>	<b>Dezembro</b>	<b>Fevereiro</b>
Ponto de coleta 1	Média ± DP	$6,26^a \pm 0,13$	$0,50^a \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,03$
Ponto de coleta 2		$0,83^b \pm 0,06$	$0,43^a \pm 0,03$	ND
Ponto de coleta 3		$0,61^b \pm 0,01$	$0,37^a \pm 0,02$	ND
<b>Positividade*</b>		100%	100%	33,33%

ND - Não detectado.

\*Positividade – porcentagem de amostras positivas por período.

Médias com letras diferentes na coluna possuem diferença significativa entre si; teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Houve 100% de contaminação do lago nos meses de outubro e dezembro do ano de 2022. A amostra coletada no 1º ponto de coleta em outubro contrastou com todas as demais por um nível de contaminação mais alto. Esse achado caracteriza uma contaminação pontual do lago, indicando situação atípica e possível causa antrópica, além de possível interferência climática e ambiental. Em dezembro a contaminação do lago foi mais homogênea entre os três pontos coletados, e já em fevereiro, houve detecção de apenas uma amostra contaminada com MC, e em baixos níveis.

Apesar dos níveis encontrados na maioria das amostras não ultrapassar o limite máximo permitido pela legislação, o alto índice de positividade do lago indica possibilidade de novas contaminações pontuais de MC, como no caso de outubro.

Anderson *et al.* (2023) avaliaram a ocorrência de microcistina em um corpo d'água nos EUA por ELISA, em amostras coletadas mensalmente ao longo do período de 6 anos. Foi o primeiro trabalho a apresentar ocorrência simultânea de MC e ácido domóico e, apesar dos baixos níveis da cianotoxina que foram encontrados, houve detecção em todas as estações estudadas, com predominâncias das maiores concentrações durante o outono e verão. Dessa forma, é importante o monitoramento da região e melhor entendimento dos riscos de exposição humana crônica à toxina. Quando em baixas concentrações, a exposição a longo prazo a toxinas representa grande perigo ao ambiente e à saúde dos animais e humanos.

A ocorrência de MC na água acarreta na contaminação dos animais aquáticos presentes ali, e conseqüentemente na contaminação do humano que pode eventualmente se alimentar do animal. Em humanos, pode causar hepatotoxicidade, injúria renal e problemas reprodutivos (Anderson *et al.*, 2023).

Um trabalho de revisão realizado com os dados de contaminação por microcistinas no continente africano, entre o período de 1989 a 2019, revelou que em 12 dos 15 países com dados disponíveis, houve detecção de toxina maior do que previsto pela OMS. As maiores concentrações de contaminação foram encontradas em reservatórios, seguido de lagos e outros tipos de águas. Dentre as zonas temperada, árida e tropical, o clima temperado apresentou maiores índices de positividade e maiores concentrações de MC ( $1381 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), representando um alto risco ecológico em diversos corpos d'água, inclusive utilizados para consumo humano (Zhao *et al.*, 2023).

Liu *et al.* (2023) produziram e validaram um kit de imunoenensaio ELISA competitivo indireto para monitoramento da contaminação por MC-LR com limite de detecção  $0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$ , e investigaram métodos de mascarar efeito de matriz. Verificaram que a diluição da amostra em água e diluição do anticorpo em tampão fosfato, BSA e etileno diamina ácido tetra acético (EDTA) são eficientes.

**Tabela 6** - Comparação dos resultados obtidos por HPLC-PDA e ELISA *Quantiplate Kit for Microcystin*.

Microcistina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	
HPLC-PDA	ELISA
6,98 $\pm$ 0,23	6,26 $\pm$ 0,13
1,02 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,06
<LQ	0,61 $\pm$ 0,01
ND	0,50 $\pm$ 0,06
ND	0,43 $\pm$ 0,03
ND	0,37 $\pm$ 0,02
ND	0,33 $\pm$ 0,03

LQ = 0,91  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (HPLC-PDA)

LD = 0,27  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (HPLC-PDA)

LQ = 0,20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (ELISA)

LD = 0,10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (ELISA)

Apesar de alguns dos valores encontrados em algumas amostras pelo ELISA terem resultados superiores ao Limite de Detecção do método utilizado em HPLC-PDA, essas amostras não tiveram MC detectada pelo método cromatográfico, possivelmente pela ocorrência de ruídos no cromatograma e/ou interferências na etapa de pré-concentração da amostra.

Silva *et al.* (2019), estudaram a contaminação temporal do rio Tapajós, em Santarém, Amazônia, Brasil, por método ELISA, e identificaram a ocorrência de MC em todo o período estudado, sendo a maior concentração encontrada associada à ocorrência do gênero *Microcystis* sp. A contaminação encontrada variou de 0,01 a 0,10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mostrando grande eficiência e alta sensibilidade do método imunológico. Diferentemente de outros estudos, este trabalho não apresentou diferença significativa nos níveis de contaminação por MC de acordo com a sazonalidade. Apesar dos valores encontrados serem menores do que o limite permitido pela legislação para potabilidade, destaca-se a importância do monitoramento de águas recreacionais, pois a ocorrência de cianobactérias potencialmente toxigênicas possibilita que novas florações aconteçam e representem perigo à população local (Silva *et al.*, 2019).

Os métodos de ELISA e LC-MS/MS (Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa) são comumente utilizados na detecção de cianotoxinas. É importante observar que na técnica de ELISA deve-se considerar a reatividade cruzada de ligação, e conseqüentemente a variabilidade das moléculas de MC (He *et*

*al.*, 2018). Quando comparado com HPLC-PDA, o método LC-MS apresenta melhor definição na identificação da molécula, porém o HPLC-PDA já é capaz de oferecer boa sensibilidade metodológica a níveis de nanograma, dependendo do analito, e está em ascensão com avanços e melhorias em resolução e seletividade de substâncias, com a possibilidade de detecção de diferentes analitos em uma mesma análise (Hiskia *et al.*, 2017).

Guo *et al.* (2017), também compararam as metodologias ELISA e LC-MS/MS na detecção de MC em água. Demonstraram que os resultados do ELISA devem ser avaliados com cuidado devido a reações-cruzadas que levam à variabilidade dos resultados, detecção de diferentes variantes de microcistina, levando a superestimação de resultados. A detecção da MC da amostra é dependente do tipo de variante da molécula é utilizada no padrão de calibração. A boa sensibilidade do método permite baixos limites mínimos de detecção, ideais para quantificação de pequenas concentrações da toxina. No entanto, deve-se atentar também ao limite máximo do método, pois as amostras com concentrações superiores a esse valor devem ser diluídas para se enquadrar na curva de calibração. A diluição pode causar variabilidade da calibração e perda da linearidade da curva, resultando em alteração da absorbância e diferenças de resultado (Guo *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018).

Nos testes em LC-MS/MS na detecção da toxina, observaram efeito de matriz amostral, sendo necessário aplicação de medidas de controle de qualidade. Apesar de apresentar boa sensibilidade e especificidade frente as variantes de MC, o método não foi capaz de detectar moléculas oxidadas de toxina, que podem surgir nos casos de tratamento de água com ozônio (Guo *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018).

Mostrando a eficiência do método HPLC-PDA na detecção de MC em diversas matrizes, Wijewickrama e Manage (2019) utilizaram o método para avaliar plantas expostas laboratorialmente com água naturalmente contaminada com MC-LR proveniente de lago hipereutrofizado. Os níveis de toxinas foram detectados e quantificados pelo método.

Fastner *et al.* (2002) fizeram um levantamento e comparação entre 31 laboratórios em 13 países quanto a análise de padrão de MC-LR e amostras de campo por diferentes métodos de detecção, HPLC-PDA/UV, HPLC-MS, ELISA, e Ensaio de inibição da enzima fosfatase. Verificaram bom desempenho dos métodos na detecção

de MC nos dois tipos de amostras, e ressaltaram a maior repetibilidade do ELISA na detecção do padrão de MC-LR. Além disso, na avaliação de amostras naturais, HPLC-PDA/UV mostrou maior variabilidade de resultados, associado ao método de extração e detecção da toxina. Concluíram que todos os métodos avaliados possuem melhor desempenho e precisão na detecção e quantificação do padrão de toxina, em comparação com amostras naturais. Também destacaram a importância do uso de padrões com estabilidade adequada, após constatar variabilidade quando usado padrões produzidos intralaboratorialmente, em comparação com o comercial.

Além das diferenças no LD e LQ entre o método de ELISA e HPLC, há várias características que merecem atenção. ELISA tem maior sensibilidade, graças à característica imunológica, no entanto, apresenta menor especificidade, devido à possíveis reações cruzadas dentre os análogos de MC, como MC-LR, MC-LA, MC-RR e MC-YR. A ocorrência de reatividade cruzada pode explicar a diferença entre valores distintos de MC quantificados em uma mesma amostra por ELISA e HPLC-PDA. Além disso, diferente preparo de amostra e efeito de matriz também podem ser fatores de interferência de análise. Dessa forma, é importante a correlação de dados entre diferentes metodologias e cuidado para expressar resultados (Szlag *et al.*, 2015).

Szlag *et al.* (2015) verificaram a ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas em cinco estações de tratamento de água por HPLC-PDA e ELISA. O estudo detectou a ocorrência de MC em 56% das amostras, em concentrações entre 0,05 e 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ocorrendo em 4 das 5 estações estudadas. Apenas uma amostra ultrapassou o limite estabelecido pela OMS de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Dentre as amostras analisadas após o tratamento da água, nenhuma MC foi detectada. A quantidade de cianobactéria e a concentração de cianotoxinas não foi correlacionada em todas as amostras.

Em estudo de comparação sobre o desempenho de ELISA e HPLC-PDA, e efeito de coleta da amostra para análise de MC, foram coletadas amostras do lago de Constança, localizado na Europa Central, durante o período de três anos, o qual teve alta positividade para ocorrência da toxina. Os resultados obtidos com a técnica de ELISA chegaram a ser quatro vezes maiores que os valores obtido por HPLC-PDA, sugerindo que diferentes análogos da toxina podem ter sido quantificados

ou houve interferência de outro fator na análise. Outros achados na literatura também constam valores maiores para análises por ELISA do que por HPLC-PDA, enquanto o método cromatográfico apresenta menos da metade da variação apresentada pela técnica imunoenzimática. Dessa forma, é recomendado que para melhor confiabilidade de resultados seja utilizado não apenas um método de quantificação, mas a combinação de parâmetros químicos e imunológicos (Tillmanns, Pick, Aranda-Rodriguez; 2006).

### 5.3 Análise Microbiológica - Coliformes

Os resultados da Tabela 7 mostram o grau de contaminação microbiológica quanto a coliformes totais e termotolerantes dos lagos avaliados pelo método de NMP, representativo das amostras coletadas em fevereiro/2023.

**Tabela 7** - Número mais provável (NMP) de unidades formadoras de colônias de coliformes totais / termotolerantes por mL dos lagos estudados.

Lago	Coliformes Totais NMP/mL	Coliformes Termotolerantes NMP/mL
1	43,0	< 3,0
2	23,0	< 3,0
3	3,6	3,6
4	9,2	3,6
5	93,0	9,2
6	9,2	< 3,0

Intervalo de confiança (95%); **Fonte:** Silva *et al.* (2010).

O lago 5 apresentou a maior contaminação microbiológica de coliformes totais e termotolerantes dentre todos os lagos estudados. O lago 1, que teve mais amostras positivas para MC, apresentou contaminação microbiológica intermediária, em comparação com os demais lagos. Dessa forma, os dados não corroboram entre maior contaminação microbiológica de coliformes com maior concentração de MC. No entanto, vale ressaltar que a análise microbiológica de coliformes foi realizada com as amostras coletadas em fevereiro, onde apenas 1

amostra do lago 1 apresentou MC. Possivelmente seriam necessárias mais análises, tanto microbiológicas, quanto químicas para uma correlação entre os dados.

A contagem de coliformes totais e termotolerantes é utilizada como um parâmetro de indicação da qualidade da água e indício de contaminação fecal. A maior quantidade de matéria orgânica presente num corpo d'água pode ser sugestiva da ocorrência de florações de cianobactérias potencialmente toxigênicas. Em águas recreacionais, foi definido que contagem superior a 126 UFC.100ml<sup>-1</sup> indica alto risco à saúde humana, pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 2012). A relação entre contaminação fecal e concentração de cianobactérias não está totalmente esclarecida, embora alguns estudos correlacionaram a ocorrência de cianobactérias com concentrações de microcistina, e outros não (Gangi *et al.*, 2022).

A Diretriz Ambiental do CONAMA, Resolução 357/2005, determina os parâmetros para classificação de corpos d'água, e considera coliformes totais, turbidimetria, fósforo total, oxigênio dissolvido, clorofila-a, cianobactérias, dentre outras características. Costa *et al.* (2014), verificaram que o aumento da concentração de fósforo diminui a qualidade da água, aumentando cianobactérias, clorofila-a, turbidimetria e coliformes termotolerantes, e diminuindo o oxigênio disponível. O período de coleta da amostra pode influenciar nos resultados, pois estações chuvosas podem acarretar aumento de nutrientes do corpo d'água trazidos pela própria chuva, e por outro lado pode aumentar o volume de água do reservatório e diluir os nutrientes presentes (Costa *et al.*, 2014).

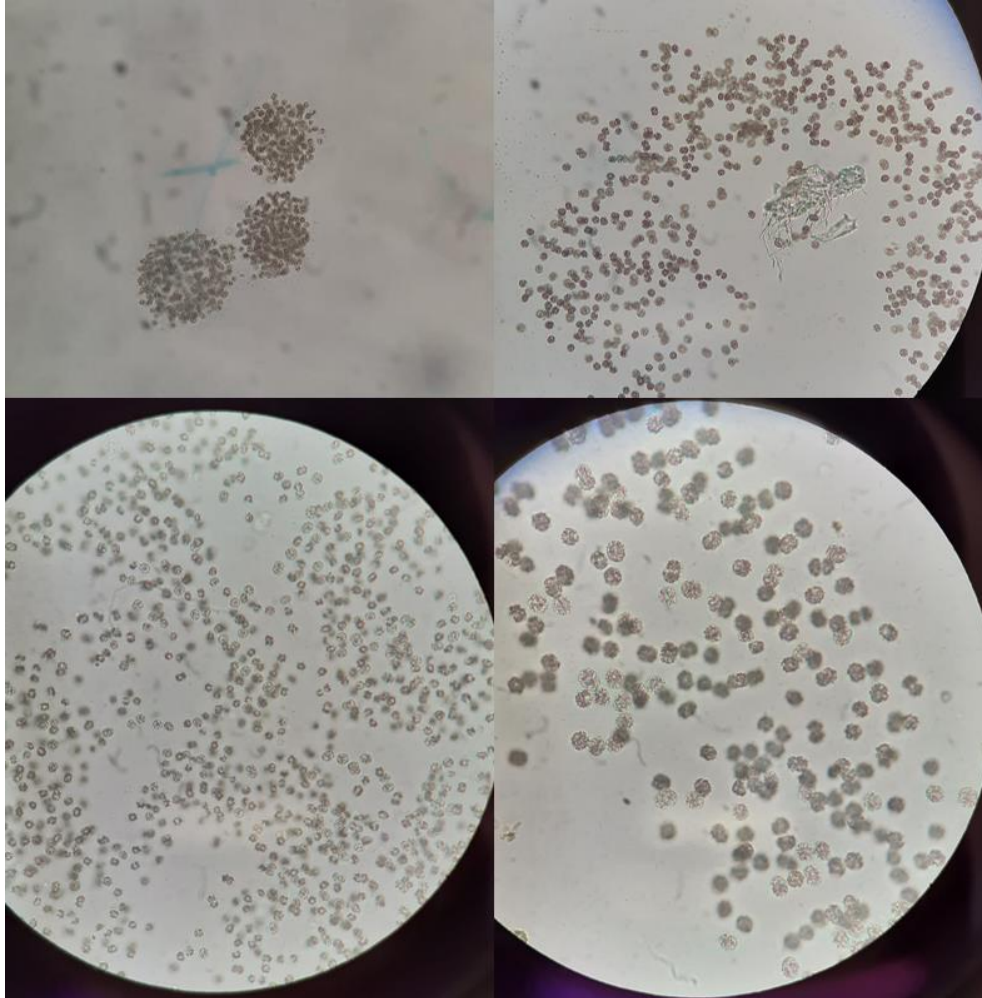
Pip e Allegro (2010), estudaram a correlação entre 12 parâmetros da qualidade da água do Lago Winniping, no Canadá. As maiores concentrações de microcistina foram relacionadas diretamente proporcional com níveis de nitrato e fósforo inorgânico solúvel, e inversamente proporcional ao cobre. A contagem de coliformes totais foi maior nos locais coincidindo com maiores turbidimetria, temperatura, fosfato inorgânico e matéria orgânica.

#### 5.4 Identificação de Cianobactérias

Na identificação morfológica das cianobactérias, foram encontradas estruturas comparavelmente semelhantes ao gênero *Microcystis* (Figura 29 e 30). A afirmação do nome de um organismo é difícil e deve ser feita atentamente, levando em consideração suas características morfológicas, bioquímicas, ultraestruturais, genéticas e ecológicas, além de depender também do nível de experiência do analista. No caso de incerteza, é recomendável que a identificação não seja feita, ou então, que seja realizada em categorias taxonômicas superiores, como famílias ou ordens (Sant'Anna, 2006). Sendo assim, os organismos encontrados nas amostras de água desse trabalho foram classificados como sugestivamente pertencente a um gênero de cianobactéria, porém não foram identificados confirmativamente.

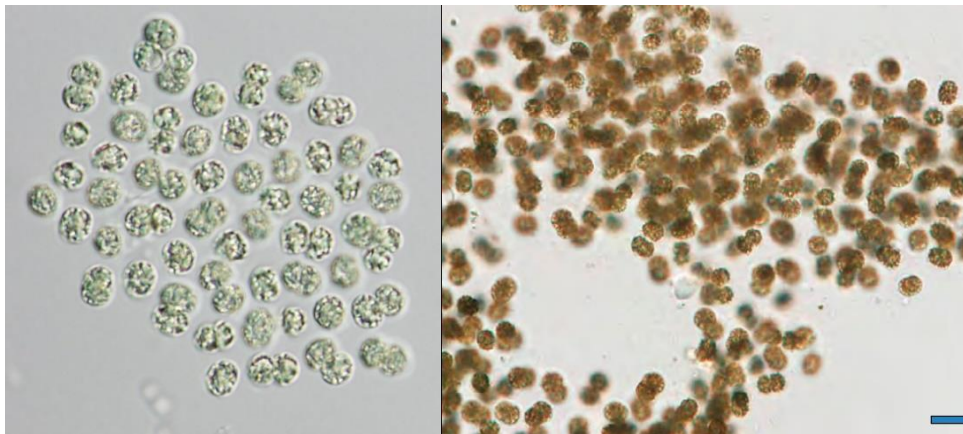
Dentre as características morfológicas de cianobactérias que podem ser identificadas no microscópio ótico estão a coloração verde azulada e conteúdo celular mais uniforme, quando comparadas às algas planctônicas. Apesar de não possuírem plastos, podem apresentar grânulos e aerótopos (Sant'Anna, 2006). Nas três amostras de fevereiro analisadas do lago 1, foram identificadas células morfológicamente semelhantes ao gênero *Microcystis*. Esse achado corrobora com o lago que apresentou contaminação por MC.

**Figura 29** – Achados sugestivos de *Microcystis*, visualização da amostra 1 (outubro, Lago 1), em microscopia ótica, em aumento de 4, 10, e 40x.



Fonte: Arquivo pessoal (2022)

**Figura 30** - *Microcystis aeruginosa* visualizada em microscopia ótica.



Fonte: USGS Science for a Changing World.

A temperatura ideal e favorável ao crescimento das cianobactérias é acima de 25°C, enquanto a produção de cianotoxinas ocorre principalmente entre 18 e 25°C. Temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 30°C reduzem a produção. Normalmente, o *bloom* de cianobactérias inicia com apenas uma espécie potencialmente formadora de *bloom*. Dependendo das características de temperatura, presença de determinados nutrientes, intensidade de luz, CO<sub>2</sub> dissolvido, ocorre a sucessão de espécies dominantes, favorecendo-as (Ramos *et al.*, 2015; Bashir *et al.*, 2023).

Ramos *et al.* (2015) verificaram em seu estudo que no período seco observaram maiores concentrações de toxinas e cianobactérias nas amostras do que no período chuvoso, possivelmente por ocorre diluição dos nutrientes presentes no corpo d'água devido ao aumento do volume de água causado pelas chuvas e precipitações pluviais. O ponto do estudo em que houve maiores identificações de cianobactérias e toxinas foi o de maior despejo de dejetos industriais e menor volume de água e menor correnteza, onde é facilitada a fixação de colônias e eutrofização (Ramos *et al.*, 2015).

Da mesma forma, Machado *et al.* (2016) encontraram cianobactérias no reservatório de Guarapiranga tanto no período de seca, quanto no período chuvoso, porém foi ressaltado que a biomassa encontrada no período seco foi maior. A baixa qualidade da água do local foi associada à grande quantidade de nutrientes disponíveis, que possibilita aumento de florações, principalmente de espécies potencialmente tóxicas.

Uma alternativa na detecção rápida e assertiva de gêneros de cianobactérias potencialmente toxigênicas é a técnica Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR) acoplada a dispositivos de amostragem passiva. Aptâmeros como biossensores na detecção de diversos genes alvos (DNA) de cianobactérias e/ou outros diversos poluentes presentes na água demonstraram perfil microbiano mais completo e seguro capaz de representar risco de contaminação por cianotoxina (Redden *et al.*, 2013; Flores-Contreras *et al.*, 2022).

A ocorrência de cianobactérias potencialmente toxigênicas foi estudada no reservatório Cheffia, na Argélia, procedendo confirmação microbiana

associando técnica morfológica e molecular (sequenciamento genético), enquanto a toxina foi verificada associando analítica e molecular. Dentre os 28 gêneros identificados, o mais frequente foi *Microcystis spp.*, incluindo a espécie *Microcystis aeruginosa*, corroborando com demais dados da literatura. MC-LR foi detectada por HPLC-PDA e LC-MS, associado com gene *mcyE* analisado por PCR (Benredjem *et al.*, 2022).

Forastier *et al.* (2016) avaliaram a toxicidade de *M. aeruginosa* no Rio Paraná, na jusante da barragem de Yacyretá, na Argentina, considerando a importância como principal fonte de água para o consumo na região nordeste do país. O estudo realizado entre os anos de 2004 a 2008 analisou a toxina por método químico (HPLC-PDA) e ensaio biológico, aliado biomassa e ocorrência de cianobactérias por microscopia invertida. *M. aeruginosa* foi detectada nos meses quentes, de novembro a março; todas as amostras positivaram com MC, principalmente a MC-LR, quantificada entre 0,09 a 37,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . O ensaio biológico demonstrou hepatotoxicidade em todos os ratos testados.

## 6. CONCLUSÃO

O hibridoma linhagem MC 8-3 produziu AcM com atividade anti-MC-LR. Em um dos lagos estudados foi identificada e quantificada a ocorrência de MC-LR. A técnica cromatográfica HPLC-PDA não apresentou sensibilidade equivalente ao método imunológico ELISA. Os AcM produzidos podem ser utilizados posteriormente como ferramentas imunológicas para detecção da MC-LR com alta sensibilidade.

A ocorrência de MC-LR no lago 1 não foi homogênea nos três períodos de análise, demonstrando uma possível contaminação pontual de cianobactérias. A contaminação total variou de ND a 6,26  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por ELISA e entre ND a 6,98  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por HPLC, corroborando com o achado de cianobactéria no lago 1 com maior concentração de MC-LR. Embora apenas uma amostra seja quantificada com valor acima do recomendado pela OMS (1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), deve-se considerar o fator de risco tendendo aumento de frequência, recomendando-se conduzir medidas para evitar florações. Apesar de não-correlação entre lago com maior contaminação por coliformes totais termotolerantes e contaminação de MC-LR, vale ressaltar que coliformes é o parâmetro principal de qualidade aquático. O método imunológico se mostrou mais sensível, em comparação ao cromatográfico, dessa forma, fazendo-se importante a produção de AcM em laboratórios, a fim de expandir o uso destes como Imunobioferramentas sensíveis, e otimizar as metodologias de detecção de analitos, especialmente toxinas, presente e importantes a níveis muito baixos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv; LICHTMAN, Andrew H. **Imunologia celular e molecular**. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- AGUILERA, A., ALMANZA, V., HAAKONSSON, S., GILBERTO, H. P., RODAS, B., BARROS, M. U. G., CAPELO-NETO, J., URRUTIA, L., AUBRIOT, L., BONILLA, S. Cyanobacterial bloom monitoring and assessment in Latin America. **Harmful Algae**. 2023.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2010.
- ANDERSON, M., VALERA, M., SCHNETZER, A. Co-occurrence of freshwater and marine phycotoxins: A record of microcystins and domoic acid in Bogue Sound, North Carolina (2015 to 2020). **Harmful Algae**. 2023.
- AROSIO, P., BAROLO, G., MULLER-SPATH, T., WU, H., MORBIDELLI, M. Aggregation Stability of a Monoclonal Antibody During Downstream Processing. **Pharmaceutical Research**, p. 1884–1894. 2011.
- AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, p. 4–15. 2015.
- BASHIR, F., BASHIR, A., BOUAÏCHA, N., CHEN, L., CODD, G. A., NEILAN, B., XU, W., ZIKO, L., RAJPUT, V. D., MINKINA, T., ARRUDA, R. S., GANAI, B. A. Cyanotoxins, biosynthetic gene clusters, and factors modulating cyanotoxin biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 2023.
- BELYKH, O.I., SOROKOVIKOVA, E.G., TOMBERG, I.V., FEDOROVA, G.A., KUZMIN, A.V., KRASNOPEEV, A.Y., SUSLOVA, M.Y., POTAPOV, S.A., BELYKH, T.I., NOROVSUREN, J., GALACHYANTS, A.D., TIKHONOVA, I. V. Water Quality, Toxicity and Diversity of Planktonic and Benthic Cyanobacteria in Pristine Ancient Lake Khubsugul (Hövsgöl), Mongolia. **Toxins** 2023, 15, 213.
- BENREDJEM, L., BERREDJEM, H., ABDI, A., CASERO, M. C., QUESADA A., FOSSO, B., MARZANO, M., PESOLE, G., AZEVEDO, J., VASCONCELOS, V. Morphological, molecular, and biochemical study of cyanobacteria from a eutrophic Algerian reservoir (Cheffia). **Environmental Science and Pollution Research**. 2022.
- BORTOLI, E., PINTO, E. Cianotoxinas: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. Ecologia de reservatórios e interfaces. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, São Paulo. Brasil, 2015.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria nº 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. Diário Oficial da União, nº 59, 26 de março de 2004. Seção I. p. 266-270.

BRUCE, M. P., BOYD, V., DUCH, C., WHITE, J. R. Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. **Journal of Immunological Methods**, p. 59-68, 2002.

BUTLER, M. Animal cell cultures and technology. Nova Iorque: **Taylor & Francis Group**, 2005.

CALIJURI, M. C., ALVES, M. S. A., DOS SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e CAMPOS, R. A., PIMENTA, P. S. P., STIPP, N. A. S.** Um olhar sobre o Parque Arthur Thomas no Centro Urbano de Londrina/PR. **Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina** – 20 a 26 de março de 2005. Universidade de São Paulo. 2005.

CARNEIRO, T. G., LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, v. 32, p. 36 – 41, 2007.

CHEN, M., LIANG, A. H., LEI, H., LIU, H., LIU, Y. Advances in immunoassays-based strategies for mycotoxin detection in food: From single-mode immunosensors to dual-mode immunosensors. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. 2023.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução n357, de 17 de março de 2005**. 2005.

CORMAN, J.R., ROEGNER, A., OGARI, Z., MILLER, T.R., AURA, C.M. Local-scale impacts of water hyacinth on water quality in a hypereutrophic lake. **Front. Water**. 2023.

CORONADO-APODACA, K. G., GONZALEZ-MEZA, G. M., AGUAYO-ACOSTA, A., ARAÚJO, R. G., GONZALEZ-GONZALEZ, R. B., OYERVIDES-MUNOZ, M. A., MARTINEZ-RUIZ, M., MELCHOR-MARTINEZ, E. M., BARCELÓ, D., PARRA-SALDIVAR, R., SOSA-HERNANDEZ, J. E. Immobilized Enzyme-based Novel Biosensing System for Recognition of Toxic Elements in the Aqueous Environment. **Topics in Catalysis**. 2023.

COSTA, S. M, APPEL, E., MACEDO, C. F., HUSZAR, V. L. M. Low water quality in tropical fishponds in southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 86(3): 1181-1195. 2014.

DAMADA, P. H. **Obtenção de Anticorpo Monoclonal Murino anti-CD25 através do cultivo de hibridoma PC-61 em biorreatores Spinner em meio livre de soro.**

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

FALCONER, I. R. Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins. **Boca Raton**, Florida: CRC Press, 2004.

FASTNER, J., CODD, G., METCALF, J., WOITKE, P., WIEDNER, C., UTKILEN, H. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 374(3), 437–444. 2002.

FBDS. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <http://geo.fbds.org.br/PR/CAMBE/MAPAS/>. Acesso em 10 julho 2023.

FLAJS, D., DOMIJAN, A.M., IVIC, D., CVJETKOVIC, B., Peraica, M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. **Food Control**, 20(6), p. 590–592. 2009.

FLORES-CONTRERAS, E. A., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R. B., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E., MELCHOR-MARTÍNEZ, E. M., PARRA-SALDÍVAR, R., IQBAL H. M. N. Detection of Emerging Pollutants Using Aptamer-Based Biosensors: Recent Advances, Challenges, and Outlook. **Biosensors**. 2022.

FORASTIER, M. E., ZALOCAR, Y., ANDRINOLO, D., DOMITROVIC, H. A. Occurrence and toxicity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in the Paraná River, downstream of the Yacyretá dam (Argentina). **Revista de Biologia Tropical**. 2016.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. **Nova Iorque: John Wiley & Sons**. 6. Ed. 2010.

FUJIKI, H., SUEOKA, E., SUGANUMA, M., WATANABE, M. F., HARADA, K., CARMICHAEL, W. W., FUJIKI, H. **Toxic Microcystis**. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 203-232, 1996.

GANGI, D., FRAU, D., DROZD, A. A., BORDET, F., ANDRADE, S., BAZZALO, M., PINTO, P. T. Integrating field and satellite monitoring for assessing environmental risk associated with bacteria in recreational waters of a large reservoir. **Science of the Total Environment**. 2022.

GUAN, Y., WU, X., MENG, H. Indirect competitive ELISA based on monoclonal antibody for the detection of 5-hydroxymethyl-2-furfural in milk, compared with HPLC. **Journal of Dairy Science**, 96(8). 2013.

GUO, Y. C., LEE, A. K., YATES, R. S., LIANG, S., ROCHELLE, P. A. Analysis of Microcystins in Drinking Water by ELISA and LC/MS/MS. **Research Focus**. 2017.

HAN, C., DOEPKE, A., CHO, W., LIKODIMOS, V., DE LA CRUZ, A. A., BACK, T., HEINEMAN, W. R., HALSALL, H. B., SHANOV, V. N., SCHULZ, M. J., FALARAS, P., DIONYSIOU, D. A Multiwalled-Carbon-Nanotube-Based Biosensor for Monitoring Microcystin-LR in Sources of Drinking Water Supplies. **Advanced Functional Materials**, 23(14), 1807–1816. 2013.

HARKE, M. J., STEFFEN, M. M., GOBLER, C. J., OTTEN, T. G., WILHELM, S. W., WOOD, S. A., PAERL, H. W. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, 54, 4–20. 2016.

HE, X., STANFORD, B. D., ADAMS, C., ROSENFELDT, E. J., WERT, E. C. Comparison of ELISA and LC-MS/MS Analytical Methods and Validation of AWWA Hazen-Adams CyanoTOX. **Journal Awwa**. 2018.

HEILMANN, K., GROTH, T., BEHRING, O., ALBRECHT, W., SCHOSSIG, M., LENDLEIN, A., MICHEEL, B. The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridoma cells. **Journal of Biotechnology**, p.291-301, 2005.

HISKIA, A., SPOOF, L., KALOUDIS, T., & MERILUOTO, J. Determination of Cyanotoxins by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array. **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**, p. 203–211. 2017.

HUISMAN, J., CODD, G. A., PAERL, H. W., IBELINGS, B. W., VERSPAGEN, J. M. H., VISSER, P. M. Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews Microbiology**, 16(8), p. 471–483. 2018.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2010. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, 94, p.329-412, 2010.

IPPUL. Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Londrina. **Mapas Temáticos**. Disponível em: <https://ippul.londrina.pr.gov.br/index.php/mapa-de-londrina-caderno-de-mapas/79-mapas-tematicos.html>. Acesso em 10 julho 2023.

ISHIKAWA, A.T. **Hibridoma OTA.1: anticorpo anti-OTA no desenvolvimento da coluna de imunoafinidade e aplicação associada à qualidade e segurança de vinho**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR. 2012.

KHEDDO, P., TRACKA, M., ARMER, J., DEARMAN, R. J., UDDIN, S., VAN DER WALLE, C. F., GOLOVANOV, A. P. The effect of arginine glutamate on the stability of monoclonal antibodies in solution. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 126–133. 2014.

- KURODA, E. K., MINILLO, A., ROCHA, O., FILHO, E. R., BERNARDO, L. D. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, p. 24-31, 2007.
- LEAL, A. DE C., SOARES, M. DO C. P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(suppl 2), 84–89. 2004.
- LEGAZPI, L., DIAZ, J., LACA, A., DIAZ, M. Kinect analysis of hibridoma cell culture in a protein-free médium: substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 122-130, 2005.
- LI, B., WANG, Q., SOHAIL, M., ZHANG, X., HE, H., LIN, L. Facilitating the determination of microcystin toxins with bio-inspired sensors. **Microchemical Journal**. 2023.
- LI, F., YOU, M., LI, S., HU, J., LIU, C., GONG, Y., XU, F. Paper-based point-of-care immunoassays: Recent advances and emerging trends. **Biotechnology Advances**. 2019.
- LI, G., ZHAO, L., ZHOU, F., LI, J., XING, Y., WANG, T., REN, W. Monoclonal antibody production and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay development of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid based on novel haptens. **Food Chemistry**, 209, p. 279–285. 2016.
- LINDSTROM, P., WAGER, O. IgG Autoantibody to Human Serum Albumin Studied by the ELISA-Technique. **Scandinavian Journal of Immunology**, 7(5), p. 419–425. 1978.
- LIU, J., XING, Y., LIN, Y., XIE, Y., ZHOU, X. Effect of pretreatment approach on the ELISA-based detection of cyanotoxins in water: Analysis and application. **Science of the Total Environment**. 2023.
- MACHADO, L. S.; SANTOS, L. G, DOVAL, J. C. L., POMPEJO, M. L. M., MOSCHINI-CARLOS, V. Fatores ambientais relacionados à ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas no reservatório de Guarapiranga, SP, Brasil. **Rev. Ambient. Água**. 2016.
- MARANATA, G. J., SURYA, N. O., HASANAH, A. N. Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. **Heliyon**, 7(1). 2021.
- MASSEY, I. Y., YANG, F., DING, Z., YANG, S., GUO, J., TEZI, C., AL-OSMAN, M., KAMEGNI, R. B., ZENG, W. Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. **Toxicon**, 151, 156–162. 2018.

MAVERAKIS, E., KIM, K., SHIMODA, M., GERSHWIN, M. E., PATEL, F., WILKEN, R., LEBRILLA, C. B. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. **Journal of Autoimmunity**, 57, p. 1–13. 2015.

McELHINEY, J., LAWTON, L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 219– 230. 2005.

MÉDICI, L. M. **Anticorpo monoclonal anti-aflatoxina B<sub>1</sub>: aplicação em imunoensaio enzimático, imunofluorescência in situ e estudo da toxicidade em embrião de frango**. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

MEIRELLES, P. G., BIAZON, L., ONO, M. A., HIROOKA, E. Y., ONO, E. Y. S. Imunoensaios: uma alternativa para detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.4, p. 617-628. 2006.

MILTSTEIN, C. Monoclonal Antibodies. Cells that secrete antibodies can be made immortal by fusing them with tumor cells and cloning hybrids. Each clone is a long-term source of substantial quantities of a single highly specific antibody. **Scientific American** Vol. 243, pp. 66-76. 1980.

NAGATA, S., SOUTOME, H., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A., SEKIJIMA, M., SUGAMATA, M., HARADA, K., SUGANUMA, M., UENO, Y. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. **Natural Toxins**, v.3, n.2, p.78-86, 1997.

NewsRx. Study Findings on Hybridomas Are Outlined in Reports from NCR Biotech Science Cluster. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future. **Obesity, Fitness & Wellness Week**, 20 Jun, 189. 2020.

OLIVEIRA, C. S. **Lago Igapó II, Londrina (PR): natureza, história e afeto no campo do patrimônio cultural**. Dissertação (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) – Universidade de São Paulo. 2018.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environ. Microbiol. Rep.** 1, p. 27-37, 2009.

PARREY, H. A., SHUKLA, S., SAMAL, S., SHRIVASTAVA, T., AHMED, S., SHARM, C., KUMAR, R. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. **Int. Immunopharm.** 2020.

PAVLOVA, V., STOYNEVA-GÄRTNER, M., UZUNOV, B., BRATANOVA, Z., LAZAROVA, A., KARADJOVA, I. Microcystins-LR, -YR and -RR in Six Bulgarian Water Bodies of Health and Conservational Importance. **Journal of Water Resource and Protection**, 7, p. 1375-1386. 2015.

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

PIP, E., ALLEGRO, E. Nearshore fluctuations in water chemistry, microcystins and coliform bacteria during the ice-free season in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada. **Ecohydrology & Hydrobiology**, 10(1), 35–43. 2010.

PORTAL FÉRIAS. Apucarana. Disponível em <https://www.ferias.tur.br/cidade/5780/apucarana-pr.html>. Acesso em 15 de junho de 2023.

PRAMPERO, A. C. **Produção de anticorpos monoclonais Anti-GITR e Anti-CD25 através de cultivo de hibridomas e comparação do seu potencial como agentes antitumorais**. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2017.

PREFEITURA DE LONDRINA. **Parque Municipal Arthur Thomas**. Londrina, 2023. Disponível em <https://portal.londrina.pr.gov.br/parques-municipais/parque-municipal-arthur-thomas>. Acesso em 17 de junho de 2023.

RAMOS, C., MENEZES, T., AGRELLI, A., ALVES, I., LUZ, J., SILVA, C., PINHEIRO, I., JÚNIOR, A. Cianobactérias e microcistina em águas de rio destinadas ao abastecimento de centro industrial de Caruaru, PE, Brasil. **Vigil. sanit. Debate**. p.27-35. 2015.

REDDEN D. J., STANHOPE, T., ANDERSON, L. E., CAMPBELL, J., KRKOŠEK W. H., GAGNON, G. A. An innovative passive sampling approach for the detection of cyanobacterial gene targets in freshwater sources. **Science of the Total Environment**. 2023.

ROSSI, C. N., TAKABAYASHI, C. R., ONO, M. A., SAITO, G. H., ITANO, E. N., KAWAMURA, O, E. Y. S. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. **Food Chemistry**, 132(4), p. 2211–2216. 2012.

SAKAGUCHI, A., NAKAJIMA, C., SAWANO, A., TANAKA, Y., KURIHARA, Y. Rapid and reliable hybridoma screening method that is suitable for production of functional structure-recognizing monoclonal antibody. **Journal of Bioscience and Biotechnology**. 2021.

SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. P, AGUJARO, L. F., CARVALHO, M. C., CARVALHO, L. R., SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia. 2006.

SILVA, N., CHRISTINA, V., JUNQUEIRA, A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., SANTOS, M. R. F., GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Livraria Varela. São Paulo. 4ª edição. 2010.

SILVA, S. C. F., PELEJA, J. R. P., MELO, S. Flutuação temporal de cianotoxinas (Microcistina- LR) no rio Tapajós (Santarém, Amazônia-Brasil). **Scientia Plena**. V. 15. N. 8. 2019.

SILVA-STENICO, M. E., CANTÚSIO NETO, R., ALVES, I. R., MORAES, L. A. B., SHISHIDO, T. K., FIORE, M. F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20(3), 535–542. 2009.

SZLAG, D., SINCLAIR, J., SOUTHWELL, B., WESTRICK, J. Cyanobacteria and Cyanotoxins Occurrence and Removal from Five High-Risk Conventional Treatment Drinking Water Plants. **Toxins**, 7(6), 2198–2220. 2015.

TILLMANN, A. R., PICK, F. R., ARANDA-RODRIGUEZ, R. Sampling and analysis of microcystins: Implications for the development of standardized methods. **Environmental Toxicology**, 22(2). 2006.

TURISMO EM APUCARANA. **Parque Ecológico da Raposa**. Londrina, 2023. Disponível em: <https://www.visiteapucarana.com.br/tour/parque-ecologico-da-raposa/>. Acesso em 15 de junho de 2023.

URAKAWA, H., STEELE, J. H., HANCOCK, T. L., DAHEDL, E. K., SCHROEDER, E. R., SEREDA, J. V., KRATZ, M. A., GARCÍA, P. E., ARMSTRONG, R. A. Interaction among spring phytoplankton succession, water discharge patterns, and hydrogen peroxide dynamics in the Caloosahatchee River in southwest Florida. **Harmful Algae**. 2023.

USGS, Science for a changing world. **Microcystis aeruginosa Microscopic View**. Disponível em: <https://www.usgs.gov/media/images/microcystis-aeruginosa-microscopic-view>. Acesso em 26 junho 2023.

WANG, J., PENG, T., ZHANG, X., YAO, K., KE, Y., SHAO, B., JIANG, H. A novel hapten and monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for simultaneous analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in wheat. **Food Control**, 94, 65–70. 2018.

WANG, S., DING, P., LU, S., WU, P., WEI, X., HUANG, R., & KAI, T. Cell density-dependent regulation of microcystin synthetase genes (mcy) expression and microcystin-LR production in *Microcystis aeruginosa* that mimics quorum sensing. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 220, 2021

WARITNI, T., CHANG, J., MCKINNEY, B., TERATO, K. An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. **MethodsX**, 4, p. 153–165. 2017.

WHITTON, B.A., POTTS, M. (2012). Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton, B. (eds) **Ecology of Cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht. 2012.

WIEGAND, M. C., PIEDRA, J. I. G., ARAÚJO, J. C. Vulnerabilidade à eutrofização de dois lagos tropicais de climas úmido (Cuba) e semiárido (Brasil). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**. 2016.

WIJEWICKRAMA, M. M., MANAGE, P. M. Accumulation of Microcystin-LR in Grains of Two Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) and a Leafy Vegetable, Ipomoea aquatica. **Toxins**, 11(8), 432. 2019.

XIAO, M., LI, M., REYNOLDS, C. S. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. **Biological Reviews**, 93(3), 1399–1420. 2018.

YAMASHITA, C. R. T. **Geração de hibridoma e imunoenensaio empregando anticorpos monoclonais para detecção de toxinas naturais**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

YAO, J., WANG, Z., GUO, L., XU, X., LIU, L., XU, L., KUANG, H. Advances in immunoassays for organophosphorus and pyrethroid pesticides. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. 2020.

ZHANG, H., LI, B., LIU, Y., CHUAN, H., LIU, Y., XIE, P. Immunoassay technology: Research progress in microcystin-LR detection in water samples. **Journal of Hazardous Materials**. 2022.

ZHAO, X., LIU, Y., GUO, Y., XU, C., CHEN, L., CODD, G. A., CHEN, J., WANG, Y., WANG, P., YANG, L., ZHOU, L., LI, Y., XIAO, S., WANG, H., PAERL, H. W., JEPPESEN, E., XIE, P. Meta-analysis reveals cyanotoxins risk across African inland Waters. **Journal of Hazardous Materials**. 2023.