

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MICROCISTINA-LR EM ÁGUA**

EDUARDO JOSÉ ALÉCIO DE OLIVEIRA

RECIFE – BRASIL

outubro de 2003

FICHA CATALOGRÁFICA

ALÉCIO-OLIVEIRA, Eduardo José

Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Microcistina-LR em Água. Recife, Centro de Ciências Biológicas/UFPE,2003.

1, 139 p.

Tese: Doutorado em Ciências Biológicas (Biotecnologia)

1. Cianobactérias
2. Microcistina-LR
3. Métodos de detecção
4. Dot-blot
5. Criptato
6. Európio
7. Térbio
- i. Universidade Federal de Pernambuco – Teses
- ii. Título

EDUARDO JOSÉ ALÉCIO DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MICROCISTINA-LR EM ÁGUA**

**Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, visando a obtenção do título de:**

**Doutor em Ciências Biológicas
Área de Biotecnologia**

**Orientador: Professor Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica, UFPE.**

**RECIFE-BRASIL
Outubro de 2003**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
MICROCISTINA-LR EM ÁGUA**

EDUARDO JOSÉ ALÉCIO DE OLIVEIRA

e-mail: edualec@hotmail.com.br

Aprovada em:

Comissão Examinadora:

Aprovada por:

Profº. Dr. Benildo Souza Cavada - UFC

Profº. Dr. Maria do Carmo de Barros Pimentel- UFPE

Profª. Dr. Rosa Amália Fireman Dutra - UPE

Profª. Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto - UFRPE

**Profº. Dr. José Luiz de Lima Filho – UFPE
(Orientador)**

Programa autorizado para oferecer o título de: _____

Data: _____

Dedicatória:

Aos meus Pais,

José Miguel de Oliveira e Ana Rosa Alécio de Oliveira pela educação que me proporcionaram e os incentivos constantes.

À minha Esposa **Vânia Soares de Carvalho** pelo companheirismo, incentivo e grande paciência.

Às minhas irmãs **Ana Áurea, Rosa Valéria e Karina Maria**, sempre envolvidas em novos desafios profissionais.

A todos os **amigos** que comigo dividiram, discutiram e participaram deste trabalho, crescendo com as novas experiências.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Cianotoxinas	01
1.2. Toxicidade	04
1.3. Ocorrência	05
1.4. Legislação	08
1.5. Métodos de Análise de Microcistina	09
1.6. Complexos de Lantanídeos Fluorescentes: Criptatos de Eu³⁺ e Tb³⁺	15
1.7. Matrizes Poliméricas como Suporte para Complexos de Lantanídeos Fluorescentes	20
2. OBJETIVOS	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1: APPLICATION OF DOT BLOT IMMUNOASSAY WITH COMPUTERISED SCANNING TO ANALYSIS OF MICROCYSTIN-LR	29
Abstract	30
Introduction	31
Materials and Methods	32
Results	38
Discussion	46
Acknowledgements	49
References	49

CAPÍTULO 2: A NEW FLUORESCENT-LABELED MICROCYSTIN-LR TERBIUM CRYPTATE	53
Abstract	54
Introduction	55
Materials and Methods	57
Results	61
Discussion	65
References	67
CAPÍTULO 3: EUROPIUM CRYPTATE GEL IMMUNOSENSOR TO MICROCYSTIN-LR	72
Abstract	73
Introduction	74
Materials and Methods	75
Results and Discussion	80
References	85
4. CONCLUSÕES	87
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS	89
6. OUTROS TRABALHOS COM PARTICIPAÇÃO DO AUTOR	92
6.1. NEUROTOXIC CYANOBACTERIA BLOOM IN A BRAZILIAN NORTHEAST TROPICAL RESERVOIR (Em preparação)	92
Abstract	93
Introduction	94
Materials and Methods	95
Results	98
Discussion	104
Acknowledgements	108
References	109

6.2.	PUBLICAÇÕES REALIZADAS NO PERÍODO DA TESE	_____	113
7.	ANEXO I: PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE MICROCISTINA-LR EM ÁGUA ULTRAPURA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE	_____	114

AGRADECIMENTOS

Às Instituições de pesquisa e de ensino público **LIKA-UFPE, DQF-UFPE, ITEP, UnB, AGGEU MAGALHÃES-FIOCRUZ, CEFET-PE e CNPq** que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Professor **José Luiz de Lima Filho** pelo constante incentivo e confiança demonstrada, além dele mesmo ser um exemplo de otimismo e perseverança na obtenção dos objetivos de formação e desenvolvimento regional.

À Professora **Elizabete Malageño** do LIKA-UFPE cujo conhecimento e confiança demonstrados permitiu que os trabalhos imunológicos fossem realizados.

À Professora **Célia Castro** do LIKA pelas discussões sobre ensaios dot-blot.

Aos Professores do DQF-UFPE **Petrus Santa Cruz** e **Severino Alves Junior**, e a Doutoranda **Suzana Vilanova** pela prática concreta do termo cooperação.

Ao Professor **Antonio Teixeira** do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da UnB, pela colaboração efetiva, princípios científicos e de parceria que foram imprescindíveis à conclusão desta tese.

Ao Prof^o **Manoel Euzébio**, ao aluno de Doutorado **Pablo Viana** e aos alunos de I.C. do Departamento de Informática da UFPE, **Atus Vianna** e **Leonardo Nascimento**, pelo desenvolvimento do programa (software) para quantificação dot blot.

Ao pesquisador e amigo do ITEP **Renato Molica** cujo profissionalismo, conhecimento científico e senso de participação, foi fundamental para a realização de meus trabalhos.

À Professora **Rosa Fireman** da UPE por todo o apoio prestado.

Ao pesquisador **Ian Drummond** do ITEP cujas críticas e experiência analítica foram essenciais aos trabalhos de HPLC.

Ao **Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**, representado pela Professora **Luana Cassandra B. Coelho**, sem o qual esta formação não seria possível, e as Sras. **Adenilda** e **Jacilene** sempre presentes nesta Coordenação.

Aos colegas do CEFET-PE **Silvana Mendonça, Dulce Lins, Marcos Maciel e Sofia Suely**, pelo incentivo e compreensão durante as horas de trabalho.

Aos dirigentes e profissionais do ITEP, que sempre me acolheram com cordialidade e confiança, representados aqui na pessoa das Sras. **Fátima Bryner, Márcia Lyra, Conceição, Ana Arnaud, Adélia, Sônia Pereira, Ana Rita, Cláudia Neves**, e dos Srs. **Raimundo, Celerino, Gilberto Pompeu, Carlos e Manoel**.

Aos colegas de turma do Curso de Doutorado cuja convivência foi bastante construtiva, em especial a **Laura Bruno, Ana Catarina, Adriana Argolo, Jaqueline, Vânia, e Emerson Peter**.

Aos colegas dos diversos laboratórios do LIKA, com referência especial a **Cosme Martinez, Keila Moreira, Jorge Silva e Daniele Brunaska**, pela amizade, discussões e divisão da experiência desta formação;

À **Mônica Belian** e demais estudantes do DQF-UFPE pelos momentos de convívio participativo.

Aos **funcionários do LIKA**, especialmente as Sras. **Ilma, Conceição Chimendes e Vera**, e aos Srs. **Otaviano Tavares, Oscar Brasil e Moisés** pela presteza sempre demonstrada na execução de seus trabalhos.

Aos profissionais e estudantes do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da UnB que me acolheram como um dos seus, durante as atividades lá desenvolvidas.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO:

Figura 1: Estrutura química das Microcistinas e Nodularinas; (A) Estrutura geral das microcistinas: ciclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷); (B) Estrutura da nodularina: ciclo-(D-MeAsp¹-Z²-Adda³-D-Glu⁴-Mdhb⁵) (Sivonen & Jones, 1999).....04

Figura 2: Esquema do mecanismo de extravasamento sangüíneo hepático provocado por microcistinas e nodularinas. (A) Fígado normal; (B) Fígado após ação das toxinas (Traduzido de Carmichael, 1994).....05

Figura 3: Esquema do processo de desativação envolvida na conversão de luz absorvida pelos ligantes do complexo e emitida pelo Eu³⁺ (Setas azuis = Processos não radioativos; Setas vermelhas = Processos radiativos).....17

Figura 4: Espectro de excitação (.....) e de emissão (—) de um criptato de Eu³⁺ em solução (Flipsen, 2000).....18

Figura 5: Criptato de bis-piridina-piridina [Bip.bip.pi(CO₂Et)₂]³⁺ lantanídeo sintetizado no DQF (Departamento de Química Fundamental da UFPE).....19

CAPÍTULO 1: Application of Dot Blot Immunoassay with computerised scanning to analysis of microcystin-LR

Figure 1: Image scanning for the dot's edge detecting. Blue and black lines are the horizontal and vertical scanning procedure, respectively..... 36

Figure 2: virtual Dot blot membrane model.....37

Figure 3: Anti-IgG-HRP dilutions dot blot (three replicate) membrane revealed with DAB-Imidazol.37

Figure 4: Bovine serum albumin – BSA dot blot membrane revealed with 0.1% amidoblack solution (Henkel & Bieger, 1994).....38

Figure 5: Linear regression of a digitilizing hypothetical dot-blot embrane. Vertical error bars represent standard deviation (n = 5; r = 0.9620; t = 17.0; p < 0.01).....39

Figure 6: Semi-log graphic of Anti-IgG-HRP dilution curve quantified by dot blot software. Linear range between 500 and 25000 dilution factor (r = 0.9868). Vertical error bars represent standard deviation (n = 3; t = 19.3; p < 0.01).....39

Figure 7: Bovine serum albumin – BSA concentration curve quantified by dot blot software. Linear range between 0 and 78 µg/ml (r = 0.9735). Vertical error bars represent standard deviation (n = 3; t = 34.1; p < 0.01).....40

Figure 8: Purified anti-microcystin-LR-KLH IgG titres determined with a ELISA procedure. Vertical error bars represent standard deviation (n=3).....40

Figure 9: Semi-log graphic of 0.16, 0.50 and 1.60 µg/l microcystin-LR analysed in an indirect competitive ELISA. Vertical bars represent standard deviation (n=3; t = 10.8; p < 0.01).....41

Figure 10: A triplicate dot blot membrane of purified water (a) and lake water (b) spiked with microcystin-LR and cell extract dilution of <i>M. aeruginosa</i> (c).....	42
Figure 11: Indirect competitive ELISA of purified (a) and lake water (b) spiked with microcystin-LR with 0.16, 0.50 and 1.60 µg/l. Vertical bars represent standard deviation (n=3) The right graphics are the correspondent semi-log scale	43
Figure 12: Purified water (a) and lake water (b) spiked with Microcystin-LR and quantified by dot blot software. Vertical error bars represent standard deviation (a minimum n = 2). The right graphics are the correspondent semi-log scale.....	44
Figure 13: Purified water (a) and lake water (b) spiked with Microcystin-LR and quantified by dot blot software. Vertical error bars represent standard deviation (a minimum n = 2) The right graphics are the correspondent semi-log scale	45
Figure 14: Microcystin in <i>M. aeruginosa</i> extract quantified by dot blot software. Vertical error bars represent standard deviation (n = 3) The right graphics are the correspondent semi-log scale	45

CAPÍTULO 2 : A new fluorescent-labeled microcystin-LR terbium cryptate

Figure 1: Schematic synthesis of terbium cryptate.....	58
Figure 2: Chromatogram in gradient reversed-phase HPLC of mixture of reaction product: (1) microcystin-LR-aminoethanethiol and (2) microcystin-LR standard.....	62
Figure 3: Chromatogram in gradient reversed-phase HPLC at start of conjugation time of microcystin-LR-aminoethanethiol and terbium cryptate (t_{0h}) at 238 nm and 310 nm: (1) Terbium cryptate and (2) Microcystin-LR-aminoethanethiol.....	63
Figure 4: Chromatogram in gradient reversed-phase HPLC at the final conjugation time (t_{24h}) of microcystin-LR-aminoethanethiol and terbium cryptate at 310 nm: (1) Microcystin-LR-Terbium cryptate and (2) Terbium cryptate.....	64
Figure 5: Emission spectra of microcystin-LR-terbium cryptate (b) recouped in gradient reversed-phase HPLC Excitation wavelength 310 nm.....	64
Figure 6: Semi-log graphic of competitive indirect ELISA of standard microcystin-LR using anti-microcystin-LR-KHL IgG on a microplate coated with Microcystin-LR-chicken-ovoalbumin (n = 3).....	65
Figure 7: Microcystin-LR terbium cryptate conjugation reactions.....	66

CAPÍTULO 3: Europium cryptate gel immunosensor for microcystin-LR

Figure 1: Absorption spectrum in infrared region of commercial sample of polyacrylamide/acrilic acid gel.....	80
Figure 2: Absorption of 0.1M saline solution for SAPG in diferent values of pH.	80
Figure 3: Percentual retention of bovine serum albumin in the SAPG in function of time contact.....	81

Figure 4: : Emission spectrum of SAPG with Europium cryptate, IgG antimicrocystin-LR-KLH (IgG) and Microcystin-LR (Myc). Excitation wavelength 310 nm.....82

Figure 5: Elution of IgG anti-microcystin-LR-KLH-Europium cryptate conjugate obtained by maleimide method. Elution with 20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 6.5) in a fast desalting column HR 10/10 Pharmacia.83

Figure 6: Anti-microcystin-LR-KLH-Europium cryptate titre using ELISA plate coated with microcystin-LR-chicken ovoalbumin . Initial dilution was a 50 µg protein / 50 µl antibody solution. Vertical error bar represent standard deviation (n = 3)84

Figure 7: Emission spectrum of conjugated IgG antimicrocystin-LR-KLH-Europium cryptate. Excitation in 315 nm with deuterium lamp.84

OUTROS TRABALHOS COM PARTICIPAÇÃO DO AUTOR: Neurotoxic cyanobacteria bloom in a brazilian northeast tropical reservoir

Figure 1: Environmental parameters in Tapacurá reservoir from 19 March to 30 May 2002. (A) pH; (B) Conductivity and (C) = Total phosphorus.98

Figure 2: Cyanobacteria composition and concentration (cell number mL⁻¹) during a bloom in Tapacurá reservoir. ■ *Anabaena spiroides*, □ *Anabaena* sp., ▨ *Synechocystis* sp., ▩ *Planktothrix* sp., ▤ *Merismopedia* sp., ▥ *Microcystis aeruginosa*, ▦ *Gomphosphaeria* sp., ▧ *Pseudoanabaena* sp. and □ *Cylindrospermopsis raciborskii*.100

Figure 3: HPLC-FLD chromatograms of (A) 8-May bloom sample, (B) standards (reference material) and (C) mixture of standards of unknown concentrations.103

ANEXO I: PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE MICROCISTINA-LR EM ÁGUA ULTRAPURA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

Figura 1:Extração de microcistina-LR em amostras de água Milli-Q propositalmente incriminadas (Adaptado de Fastner *et al.*, 1998 e Krishnamurthy, (1986).118

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO:

Tabela 1: Classificação geral das cianotoxinas (Roset <i>et al.</i> , 2001; Sivonen & Jones, 1999; Carmichael, 1992).	02
Tabela 2: Resumo dos Métodos Físico-Químicos para Detecção de Microcistinas.....	12
Tabela 3: Relação de anticorpos anti-microcistinas e técnicas ELISA.....	14

CAPÍTULO 1: Application of Dot Blot Immunoassay with computerised scanning to analysis of microcystin-LR

Table 1: Average of somatory of intensity of pixels and paired Student test values of purified and lake water membrane spiked with microcystin-LR and quantified by dot blot software.	42
---	----

OUTROS TRABALHOS COM PARTICIPAÇÃO DO AUTOR: Neurotoxic cyanobacteria bloom in a brazilian northeast tropical reservoir

Table 1: Morphological features of three strains and natural population of <i>A. spiroides</i> from Tapacurá reservoir.	102
Table 2: Toxicity and achetylcholinesterase inhibition assay of bloom samples and <i>A. spiroides</i> strains	102

RESUMO

Na busca por métodos de análise de microcystinas de fácil execução, baixo custo e sensibilidade alta o suficiente para atender as recomendações da Organização Mundial da Saúde – OMS e da legislação Brasileira para água potável, foi desenvolvida uma técnica de imunoensaio dot blot para determinação de microcistina-LR em água e extratos de cianobactérias. Com esta técnica foi possível a determinação visual direta de concentrações de microcistina-LR menores que 1 µg/L, em amostras de água purificada e água de superfície (lago) incriminadas com concentrações na faixa de 0,16 a 10,0 µg/L de microcistina-LR. Nas condições testadas não foi necessário nenhum processo de concentração ou limpeza das amostras. Foi desenvolvido um programa de computador especificamente para a leitura das membranas de nitrocelulose, permitindo uma melhor caracterização do sinal com a obtenção de curvas analíticas similares às obtidas nas análises com método de imunoensaio ELISA. Com a técnica dot blot computadorizada utilizando um “scanner” convencional foram obtidas curvas de calibração com microcistina-LR em concentrações de 0,16 a 1,6 µg/L, cujo coeficiente de correlação foi de 0,9551 para água purificada e 0,8402 em água de superfície. Quando analisadas pelo método ELISA, coeficientes de correlação de 0,9713 e 0,8316 foram observados, respectivamente. Quantificação em dot blot na faixa de 0,16 a 10,0 µg/L foi realizada, porém com menor correlação entre a concentração da toxina e a intensidade dos pixels. A análise computadorizada permitiu observar uma boa correlação entre concentração e a intensidade dos pixels em extrato da cepa toxigênica *Microcystis aeruginosa* - NPJB-1, produtora de microcistina. O programa desenvolvido permitiu ainda a aplicação na quantificação de proteína de soro bovina - BSA na faixa de 0 a 78 µg/mL ($r = 0,9868$). Esta reação foi corada usando solução de amidoblack. Com o objetivo de obter um novo marcador fluorescente aplicável às análises de microcistina-LR em baixas concentrações, foi sintetizado um complexo de microcistina-LR-Criptato de térbio. A formação do complexo foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o complexo formado analisado quanto à atividade imune (ELISA), positividade de reação protéica e espectro de luminescência, que confirmaram a conjugação. Na busca por novos métodos para análise de microcistina foi monitorada a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ de um complexo IgG -

antimicrocistina-LR-KLH-criptato de európio. Como suporte foi utilizado gel superabsorvente de ácido acrílico / poliacrilamida. Os espectros de emissão da IgG livre, do criptato de európio e do complexo IgG-Criptato de európio foram monitorados. Os espectros de emissão na presença de IgG livre apresentaram uma mudança específica na transição.

ABSTRACT

In the search for methods for microcystins analysis that are easy to use, low cost and with sufficient high sensitivity to following the recommendations of the World Health Organization –WHO and the Brazilian legislation, was developed a specific dot blot assay. This dot blot immunoassay is for visual determination of microcystin-LR in purified and surface water (lake). Concentration as 0.16 up to 10.0 µg/l of microcystin-LR in water were tested. Samples concentration or clean-up was not necessary for the water analysis. A specific software for membranes reading dot was developed, allowing a much better characterization of the dot with the attainment of similar analytical curves obtaining throughout the analyses by enzyme linked immunoassay - ELISA. With the computerized dot blot technique using a conventional scanner, coefficient of correlation of 0.9551 to purified water and 0.8402 to surface water were observed in the range of 0.16 at 1.6 µg/l. For ELISA, the value of “r” were 0.9713 and 0.8316, respectively. Quantification in the range of 0.16 at 10.0 µg/l was carried through, however with lesser correlation between toxin concentration and intensity of pixels. The computerized analysis allowed to observe a good correlation between concentration and intensity of pixels using extract of toxic strain *Microcystis aeruginosa* - NPJB-1. This software was used for the determination of the bovine serum albumin - BSA in the range of 0.0 at 78.0 µg/mL ($r = 0.9868$) when stained with amidoblack solution. In order to get a new fluorescent labeled compound to the analysis of microcystin-LR in low concentrations, a complex of microcystin-LR-Terbium cryptate was synthesized. The complex formation was followed by high performance liquid chromatography - HPLC and the ELISA, proteic reaction and luminescence spectrum utilized to confirm the conjugation. In order to look for new methods for microcystin analysis the formation of the transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ of a IgG complex antimicrocystin-LR-KLH- Europium cryptate was monitored. Superabsorbent acrylic acid / polyacrylamide gel was used as support. The emission spectrum of free IgG, europium cryptate and IgG-Europium cryptate complex had been monitored. The emission spectrum in the presence of IgG had presented a specific change in the transition.