

IV-203 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS: IMUNOENSAIO ELISA COMPETITIVO INDIRETO IMPLEMENTADO EM LABORATÓRIO VS CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Cássia Reika Takabayashi Yamashita⁽¹⁾

Farmacêutica pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Doutora em Ciência de Alimentos (UEL). Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UEL.

Josemarque Lima da Rosa⁽¹⁾

Engenheiro Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Francisco Beltrão. Mestre em Engenharia de Edificação e Saneamento da UEL.

Osamu Kawamura⁽²⁾

Farmacêutico pela Tokyo University of Tokyo. Doutor em Farmacologia pela Tokyo University of Science. Professor Titular da Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão.

Elisa Yoko Hirooka⁽¹⁾

Farmacêutica pela Universidade Estadual de Londrina. Doutora em Ciência de Alimentos (UNICAMP). Professora do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL.

Emília Kiyomi Kuroda⁽¹⁾

Engenharia Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Doutora em Hidráulica e Saneamento (EESC/USP). Professora do Departamento de Construção Civil da UEL.

Endereço⁽¹⁾: Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário – Londrina – PR - CEP: 86.057-970 - Brasil - Tel: +55 (43) 3371-5826 - e-mail: cassiarty@gmail.com

Endereço⁽²⁾: 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kida-gun, Kagawa - Zip Code 761-0795 - Japão.

RESUMO

Os imunoenaios e métodos cromatográficos são amplamente empregados para determinação de microcistinas (MCs) que são relacionadas a danos para saúde humana e qualidade de água. O trabalho visou comparar os métodos de análise MCs: imunoensaio ELISA competitivo indireto implementado em laboratório (LABicELISA) e cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e de massa/massa (UPLC-PDA-MS/MS). Os resultados demonstraram a possibilidade de se correlacionar diretamente as leituras com as concentrações empregadas uma vez que tanto no LABicELISA como UPLC-PDA-MS/MS apresentaram curvas de calibração do MC-LR com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. O limite de quantificação (LOQ) de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ do LABicELISA foi 20 vezes inferior ao valor máximo de MCs totais ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) permitido pela legislação brasileira para água potável e também mais sensível que o UPLC-PDA (20 e $5,92 \mu\text{g L}^{-1}$) e MS/MS ($1,81 \mu\text{g L}^{-1}$). Quatro amostras de água foram analisadas por LABicELISA e UPLC-MS/MS, sendo que duas oriundas de águas eutrofizadas foram positivas, com valores de $23,72$ e $1295,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para LABicELISA e $19,19$ e $1057,71 \mu\text{g L}^{-1}$ para MCs totais; uma amostra apresentou positiva por LABicELISA ($0,06 \mu\text{g L}^{-1}$) e não detectado por UPLC-MS/MS devido ao LOQ do LABicELISA ser menor que o do UPLC-MS/MS. O LABicELISA implementado apresentou resultados adequados para os parâmetros analíticos estudados e demonstrou ser uma opção prática, de menor custo e também mais sensível que os métodos cromatográficos e vários kits de imunoenaios ELISA comerciais, potencializando seu uso como ferramenta para o monitoramento em sistemas aquáticos.

PALAVRAS-CHAVE: Imunoensaio, Cianotoxinas, Metodologia.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nutrientes em lagos e rios devido ao aumento da atividade humana, tanto pela intensificação da agricultura e da piscicultura como pelas atividades industriais e domésticas, juntamente com a gestão deficiente da água, podem resultar no aumento da eutrofização nos corpos de água doce superficiais utilizadas para fins recreativos e abastecimento. Entre os problemas relacionados com a saúde humana e a qualidade da água, quando esta se encontra eutrofizada, destaca-se a proliferação de florações de

cianobactérias toxigênicas produtoras de microcistinas - MCs (CARMICHAEL, 1995; CHORUS e BARTRAM, 1999; KAMOGAE e HIROOKA, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2002; BOOPATHI e KI, 2014). Desta forma, há necessidade de se desenvolver métodos rápidos, confiáveis e de baixo custo para detecção de MCs a fim de garantir a segurança e qualidade de água nos mananciais e sistemas de abastecimento.

Entre os métodos de detecção, os cromatográficos e os de imunoenaios são amplamente empregados. Os métodos cromatográficos são métodos de referência devido à elevada seletividade. O tempo de retenção, espectro UV característico e pico da área das soluções padrões são a base para identificação e quantificação de MCs (MCELHINEY e LAWTON, 2005; MSAGATI *et al.*, 2006; SANGOLKAR *et al.*, 2006), além da possibilidade de identificação e quantificação mais precisa de MCs por espectrometria de massa (XU *et al.*, 2008). Porém, o equipamento apresenta alto custo de aquisição e requer operação/técnicos especializados e uso de solventes orgânicos, muitas vezes de elevada toxicidade e periculosidade (LINDNER *et al.*, 2004; PYO *et al.*, 2005).

Por outro lado, o imunoenensaio *enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA caracteriza-se pela especificidade na detecção devido à relativa seletividade de ligação anticorpo-antígeno, rapidez e simplicidade; sendo a reação, realizada numa microplaca com capacidade de análise simultânea para dezenas de amostras (LONG *et al.*, 2009; LAWTON *et al.*, 2010).

Apesar destes atributos, o principal gargalo relacionado à aplicação dos *kits* de imunoenensaio ELISA comerciais importados refere-se ao custo de análise. Considerando que o ELISA desenvolvido em laboratório para análise de MCs apresenta, em média, redução de custo no fator aproximado de 100 vezes em relação a *kits* comerciais importados, a implementação poderá contribuir para inovação da tecnologia nacional, com desenvolvimento de ensaio rápido, específico, sensível e de baixo custo com aplicações diversas relacionadas à qualidade da água para abastecimento e saúde pública do país.

O trabalho visou comparar os métodos de análise de microcistinas - MCs: imunoenensaio ELISA competitivo indireto implementado em laboratório (LABicELISA) e cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e de massa/massa (UPLC-PDA-MS/MS).

METODOLOGIA UTILIZADA

Preparação de amostras

Para preparação das amostras naturais, provenientes de reservatórios e mananciais destinados ao abastecimento, para análise de MCs totais, estas foram submetidas a 3 ciclos de congelamento-descongelamento, posteriormente filtrados em membrana de fibra de vidro GF/C e mantidas a -4° C até o momento de análise.

Para análise de microcistinas por LABicELISA, as amostras foram diluídas em água ultrapura, quando necessário, a fim de viabilizar a quantificação de MCs.

Para análise de MCs por UPLC-PDA-MS/MS, as amostras foram submetidas à extração para limpeza e concentração em cartuchos em fase sólida - SPE (Accu Bond SPE ODS - C18 Cartridges, Agilent ou C18 ODS, Fuji Silyca Chemical LTD) pré-acondicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura; seguida de 50 mL de amostra. As MCs foram eluídas com 5 mL de metanol grau HPLC, levada à secura em nitrogênio gasoso, ressuspensa em 1 mL de fase móvel e filtrada em membrana de PVDF (porosidade de 0,22 μ m).

Método para análise de MCs por LABicELISA

O método de imunoenensaio ELISA competitivo indireto implementado em laboratório denominado LABicELISA emprega anticorpo monoclonal (AcM) anti-MC-LR produzido *in vitro* pela linhagem de hibridoma MC.5-3 (TABUCHI *et al.*, 2015) e foi desenvolvido seguindo protocolo descrito por Nagata *et al.* (1997) com adaptações. As microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ L de solução de MCLR-BSA (100 ng mL⁻¹ em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6) e bloqueadas com solução gelatina a 0,5 % em tampão fosfato salina 0,015M pH 7,4 (PBS). Na etapa de competição, 50 μ L de padrão ou amostra, seguida de 50 μ L de AcM anti-MC-LR foram adicionados e incubados a 25 $^{\circ}$ C por 1 h. Na próxima etapa, foram

adicionados 50 μL de conjugado anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com horseradish peroxidase (diluído para 1:5000 em PBST) (Sigma Chemical Co., EUA) e incubados a 25°C por 1 h. Por fim, 100 μL da solução de substrato cromógeno (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5 com 0,05% de H_2O_2) foram adicionados e após 20 min, a reação enzimática foi paralisada com 50 μL de H_2SO_4 1M e a absorbância, lida em 450nm. As microplacas foram lavadas com PBST (PBS + 0,05% Tween 20) em cada etapa a fim de retirar o excesso de reagentes.

Os resultados foram expressos como porcentagem de ligação pela equação (1), sendo A+ a absorbância na presença de MC e A-, absorbância na ausência de MC.

$$\% \text{ de ligação} = (A+/A-) \times 100 \quad \text{equação (1)}$$

Método para análise de MC-LR por UPLC-PDA-MS/MS

No trabalho foram avaliadas duas condições cromatográficas: com detecção por PDA ($\lambda = 238 \text{ nm}$) e com espectrômetro de massa. No UPLC-PDA 1 (ACQUITY UPLC, Waters, EUA), as análises foram realizadas com volume de injeção de 6 μL , monitoramento no comprimento de onda de 238 nm, empregando coluna C18 (Acquity UPLC HSS C18 1,8 μm , 2,1x100 mm), separação cromatográfica de forma isocrática, tendo como fase móvel água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fosfórico:acetonitrila (65:32, v/v), vazão de 0,3 mL min^{-1} e tempo de corrida de 6,5 min.

As MCs também foram detectadas por espectrometria de massa (*tandem MS* - MS/MS) (ACQUITY TQ Detector, Waters, EUA) na condição cromatográfica do UPLC-PDA 2, com volume de injeção de 10 μL , monitoramento no comprimento de onda de 238 nm e o MS/MS foi realizado empregando o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) com modo de ionização por *eletrospray* positivo. Os íons monitorados foram m/z 995,39 \rightarrow 135,13 para MC-LR, 520,1 \rightarrow 135,0 para MC-RR e 1045,37 \rightarrow 135,2 para MC-YR. A coluna empregada foi C18 (Acquity UPLC HSS C18 1,8 μm , 2,1x100 mm), separação cromatográfica de forma gradiente, tendo como fase móvel inicial de água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico:metanol acidificada com 0,1% de ácido fórmico (45:55, v/v), vazão de 0,3 mL min^{-1} e tempo de corrida de 5,14 min.

Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos avaliados no estudo foram linearidade, exatidão, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de acordo com orientações e resoluções estabelecidas em ANVISA (2003) e INMETRO (2010).

No método LABicELISA, a linearidade da curva padrão foi obtida pela relação entre concentração do padrão e absorbância a 450 nm, avaliada pela porcentagem de ligação (% de Ligação). Já no método UPLC-PDA-MS/MS, a linearidade da curva padrão foi avaliada pela relação entre concentração do padrão e área do pico resposta. A exatidão foi avaliada realizando recuperação de pelo menos 3 concentrações de MC-LR. O LOD e LOQ foram calculados a partir de 7 replicatas do branco, sendo que o desvio padrão amostral foi multiplicado por 3,143 e 10 para LOD e LOQ, respectivamente ou pela relação da inclinação e intercepto da reta da curva padrão.

RESULTADOS OBTIDOS

A curva padrão do LABicELISA foi estabelecida entre 0,03 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR e apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,996 ($Y = -25,07 \ln(x) + 2,4658$) com um desvio padrão relativo de 5,2 a 14,2%. O limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foi de 0,02 e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

As recuperações foram realizadas em amostras de água ultrapura e água de manancial para abastecimento, contaminadas artificialmente com três concentrações de MC-LR (0,2, 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e apresentaram recuperações de 87 a 104%, com desvio padrão relativo (DPR) de 7 a 15% (Tabela 1).

Tabela 1: Recuperação de MC-LR de amostras de água contaminadas artificialmente determinados pelo LABicELISA usando AcM anti-MC (n=3).

ÁGUA	MC-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MÉDIA DE % DE LIGAÇÃO / FATOR DE DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ^a	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)	DPR (%)
Água ultrapura	0,2	46% / 1	$0,17 \pm 0,02$	87	9
	1	73% / 20	$1,02 \pm 0,09$	102	9
	5	76% / 100	$5,18 \pm 0,65$	104	13
Água de manancial para abastecimento	0,2	42% / 1	$0,19 \pm 0,02$	103	7
	1	79% / 20	$0,96 \pm 0,13$	96	14
	5	78% / 100	$5,01 \pm 0,77$	100	15

^a Resultados representados pela média de três repetições \pm desvio padrão. DPR: desvio padrão relativo.

O método UPLC-PDA 1 apresentou linearidade da curva padrão entre 20 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, de MC-LR, com R^2 de 0,995 ($y=32,843x+678,11$), DPR de 1,1 a 7,4%, LOD de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. As recuperações de MC-LR em três níveis de contaminação (0,2, 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), empregando cartucho de extração para limpeza e concentração, apresentou valores entre 72 a 93 % de recuperação com DPR de 2 a 10% (Tabela 2).

Tabela 2: Recuperação de MC-LR de amostras contaminadas artificialmente determinados por UPLC-PDA 1 (n=3).

MC-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RECUPERAÇÃO ^a	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO (%)	DPR (%)
0,2	$0,19 \pm 0,01$	93	5
1	$0,76 \pm 0,07$	76	10
5	$3,61 \pm 0,08$	72	2

^a Resultados representados pela média de três repetições \pm desvio padrão. DPR: desvio padrão relativo.

O método UPLC-PDA 2 apresentou linearidade da curva padrão de MC-LR entre 7,8 a 125 $\mu\text{g L}^{-1}$, com R^2 de 0,998 ($y=1,7202x - 0,1152$), DPR de 0,9 a 12,3%, LOD de 1,78 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ de 5,92 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para UPLC-MS/MS o R^2 foi de 0,996 ($y=17,309x - 45,432$), DPR de 1,5 a 17,3%, LOD de 0,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ de 1,81 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tanto o UPLC-PDA 2 como UPLC-MS/MS permitiram a identificação e quantificação de mais dois análogos de MCs, o MC-YR e MC-RR. Os valores de LOD e LOQ do PDA foram de 3,90 e 13,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MC-YR e de 5,50 e 18,32 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MC-RR, respectivamente. Os valores de LOD e LOQ do MS/MS foram de 2,75 e 9,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MC-YR e 1,42 e 4,73 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MC-RR, respectivamente.

As recuperações de MC-LR contaminado artificialmente (5 $\mu\text{g L}^{-1}$), empregando cartucho de extração para limpeza e concentração, apresentou valores entre 85 a 90% de recuperação com DPR de 1 a 5% (Tabela 3) nos três métodos (LABicELISA, UPLC-PDA 2, UPLC-MS/MS).

Tabela 3: Recuperação de MC-LR em água ultrapura contaminada artificialmente (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) determinados por LABicELISA, UPLC-PDA e UPLC-MS/MS com seus limites de detecção e quantificação (n=2).

Método	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RECUPERAÇÃO ^a	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)	DPR (%)
LABicELISA	0,02	0,05	$0,44 \pm 0,02$	88	5
UPLC-PDA 2	1,78	5,92	$0,43 \pm 0,01$	85	2
UPLC-MS/MS	0,54	1,81	$0,45 \pm 0,01$	90	1

^a Resultados representados pela média de duas repetições. Resultados foram representados como média \pm desvio padrão. LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo.

Quatro amostras de água foram analisadas por LABicELISA e UPLC-MS/MS (Tabela 4), sendo que duas oriundas de águas eutrofizadas. As duas amostras eutrofizadas foram positivas para os dois métodos, com valores de MCs totais de 23,72 e 1295,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ por LABicELISA e 19,19 e 1057,71 $\mu\text{g L}^{-1}$ por UPLC-MS/MS. A amostra 3 apresentou positiva por LABicELISA (0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$) e não detectado por UPLC-MS/MS.

Tabela 4: Detecção e quantificação de MCs por LABicELISA e UPLC-MS/MS em águas

AMOSTRA	LABicELISA	UPLC-MS/MS	UNIDADE
Amostra 1 - eutrofizada	1295,05	1057,71	$\mu\text{g L}^{-1}$
Amostra 2 – eutrofizada	23,72	19,19	$\mu\text{g L}^{-1}$
Amostra 3	0,06	nd	$\mu\text{g L}^{-1}$
Amostra 4	nd	nd	$\mu\text{g L}^{-1}$

nd: não detectado

O UPLC-MS/MS permitiu identificar e quantificar três MCs, a amostra 1 apresentou valor de MC-LR de 253,94 $\mu\text{g L}^{-1}$, MC-YR de 65,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ e MC-RR de 737,88 $\mu\text{g L}^{-1}$; e a amostra 2 apresentou valor de MC-LR de 11,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ e MC-RR de 7,68 $\mu\text{g L}^{-1}$.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De acordo com ANVISA (2003), os critérios para aceitação da curva de calibração é que o coeficiente de correlação (r) resulte acima de 0,99 e que o DPR seja menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as concentrações da curva de calibração.

Os resultados demonstraram a possibilidade de se correlacionar diretamente as leituras com as concentrações empregadas uma vez que tanto no LABicELISA como no UPLC-PDA e MS/MS, as curvas de calibração de MC-LR apresentaram R^2 superior a 0,99, com r de 0,998, 0,997 e 0,998 para LABicELISA, UPLC-PDA e UPLC-MS/MS, respectivamente, e DPR abaixo de 15%.

O LOQ de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ do LABicELISA foi 20 vezes inferior ao valor máximo de MCs totais (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) permitido pela legislação brasileira para água potável (BRASIL, 2011) e também muito mais sensível que o UPLC-PDA (LOQ de 20 e 5,92 $\mu\text{g L}^{-1}$) e MS/MS (LOQ de 1,81 $\mu\text{g L}^{-1}$) e vários kits de imunoenaios ELISA comerciais, o que potencializa seu uso como ferramenta de monitoramento, uma vez que dispensa a etapa de preparação da amostra por extração e concentração, o que reduz o tempo de resposta, viabilizando assim, possíveis intervenções pelo sistema produtor de água, em caso de necessidade.

Seguindo recomendações de ANVISA (2003), a exatidão, expressa em porcentagem de recuperação, foi considerada satisfatória para os dois métodos, sendo que os valores de recuperação média nas concentrações entre 0,2 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ por LABicELISA variaram entre 87 e 104% (DPR médio entre 9 e 13%) para água ultrapura e entre 96 e 103% (DPR médio entre 7 e 15%) para água de manancial (Tabela 1). Já para UPLC-PDA 1, as recuperações de MC-LR variaram de 72 a 93% de recuperação com DPR de 2 a 10% (Tabela 2).

Para a recuperação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, os valores de porcentagem de recuperação por LABicELISA, UPLC-PDA 2 e UPLC-MS/MS variaram entre 85 e 90%. De acordo com Cassini *et al.* (2013), recuperações acima de 70% não comprometem a integridade técnica, apesar de se esperar recuperações próximos de 100%.

Uma das vantagens do método de UPLC é a possibilidade de inclusão de vários análogos de MCs e de se realizar simultaneamente detecção e quantificação de analitos com razoável sensibilidade (LEE *et al.*, 1999; CASSINI *et al.*, 2013). Contudo, a detecção e quantificação requer o emprego de padrão dos análogos de MCs. No trabalho foram detectados MC-LR, MC-YR e MC-RR das amostras pelo método cromatográfico.

Shamsollahi *et al.* (2015) empregando HPLC-UV reportaram uma curva padrão próxima desse trabalho, sendo de 20 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ com R^2 de 0,988, DPR de 10,563% e LOD de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Wang *et al.* (2007) relataram um trabalho que empregaram LC-MS/MS para determinação de MCs. O método apresentou coeficiente de correlação da curva de calibração acima de 0,99 para MC-RR, -LR, -LW e -LF, com recuperação média variando entre 91,7 e 111%, com DPR de 7,9 a 12%. Os LOQs variaram de 1,3 a 6 ng l-1 após concentração da amostra em 1000 vezes.

A razão entre LABicELISA e UPLC-MS/MS dos resultados das amostras positivas foi de 1,2 (valor médio), mostrando boa correlação entre os dois métodos. Os resultados do LABicELISA foram superiores ao do UPLC-MS/MS e podem ser explicados devido ao reconhecimento de outros análogos de MCs que tenham a mesma estrutura molecular na porção que liga ao anticorpo. E a amostra 3 apresentou positiva por LABicELISA e não detectado por UPLC-MS/MS, devido ao LOQ menor do LABicELISA.

Desta forma, comparando os dados obtidos com os da literatura, os métodos implementados mostraram-se adequados para uso na análise de MCs.

CONCLUSÕES

O método de LABicELISA implementado apresentou resultados adequados para os parâmetros analíticos estudados e demonstrou ser uma opção prática, de menor custo e também mais sensível que o UPLC-PDA-MS/MS e vários kits de imunoenaios ELISA comerciais, o que potencializa seu uso como ferramenta de domínio nacional para o monitoramento em sistemas aquáticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) pela cooperação técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 104, 02 jun. 2003. Seção 1, p.56-59.
2. AZEVEDO, S. M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. *Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology*, v.181-182, p.441-446, dez. 2002.
3. BOOPATHI, T.; KI, J-S. *Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. Toxins*, v.6, p.1951-1978, jun. 2014.
4. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2914 de 12/12/2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 239, 14 dez. 2011. Seção 1, p.39-46.
5. CARMICHAEL, W.W. Toxic Microcystis and the Environment. In: WATANABE, M.; HARADA, K-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Ed.). *Toxic Microcystis*, USA: CRC Press. p.1-11, nov. 1995.
6. CASSINI, S.T.A.; ANTUNES, O.W.P.; KELLER, R. *Validação de método analítico livre de acetoneitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova*, v.36, n.8, p.1208-1213, jun. 2013
7. CHORUS, I., BARTRAM, J., *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* World Health Organisation, E & FN Spon, London, UK, 440 p., jan. 1999.
8. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2010. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: 03 – fev/2010.
9. KAMOGAE, M.; HIROOKA, E.Y. *Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. Acta Scientiarum*, v.22, p.1189-1200, out. 2000.
10. LAWTON, H.C.; EDWARDS, C.; NWAOPARA, A.A.; HEALY, M. Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon*, v.55, p.973-978, jun. 2010.
11. LEE, H.S., JEONG, C.K., LEE, H.M., CHOI, S.J., DO, K.S., KIM, K., KIM, Y.H. *On-line trace enrichment for the simultaneous determination of microcystins in aqueous samples using high performance liquid chromatography with diode-array detection. Journal of Chromatography A*, v.848, p. n.1-2, p.179-184, jul. 1999.
12. LINDNER, P.; RAMONA MOLZ, R.; YACOUB-GEORGE, E.; DÜRKOP, A.; WOLF, H. *Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. Analytica Chimica Acta*, v.521, p.37-44, jul. 2004.

13. LONG, F.; SHI, H.C.; HE, M.; SHENG, J.W.; WANG, J.F. *Sensitive and rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for microcystin-LR in water samples. Analytica Chimica Acta*, v.649, p.123–127, set. 2009.
14. MCELHINEY, J.; LAWTON, L.A. *Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.219–230, jul. 2005.
15. MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. *Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. Aquatic Toxicology*, v.78, p.382–397, mar. 2006.
16. NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. *Enzyme immunoassay for direct determination of microcystin in environmental water. Journal of Association Official Analyst Chemistry International*, v.80, p.408–417, nov. 1997.
17. PYO, D.; LEE, J.; CHOI, E. *Trace analysis of microcystins in water using enzyme-linked immunosorbent assay. Microchemical Journal*, v. 80, p.165–169, jun. 2005.
18. SANGOLKAR, L.N.; MASKE, S.S.; CHAKRABARTI, T. *Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. Water research*, v.40, p.3485–3496, ago. 2006.
19. SHAMSOLLAHI, H.R.; ALIMOHAMMADI, M.; NABIZADEHI, R.; NAZMARA, S.; MAHVI, A.H. *Measurement of Microcystin -LR in Water Samples Using Improved HPLC Method. Global Journal of Health Science*, v.7, n. 2, p. 66-70, set. 2015.
20. TABUCHI Y, TAKABAYASHI-YAMASHITA CR, MIGUEL TA, ISHIKAWA NK, MACIEL LF, HARADA K-I, HIROOKA EY, KAWAMURA O. *Generation of Monoclonal Antibodies Producing Hybridomas for Detection of Microcystins in Environmental Water by ic-ELISA. In: International Conference on the Water Crisis in the Asia-Pacific Region; 12 February 2015; Kagawa, Japan.*
21. WANG, J.; PANG, X.; GE, F.; MA, Z. *An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China. Toxicon*, v.49, p.1120–1128, fev. 2007.
22. XU, W.; CHEN, Q.; ZHANG, T.; CAI, Z.; JIA, X.; XIE, Q.; REN, Y. *Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples. Analytica Chimica Acta*, v.626, p.28–36, ago. 2008.
23. ZECK, A.; EIKENBERG, A.; WELLER, W.G.; NIESSNER, R. *Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins. Analytica Chimica Acta*, v.44, p.11–13, maio 2001.