

Microcistinas em água de hemodiálise de clínicas do estado de São Paulo

Microcystins in water samples from hemodialysis clinics of São Paulo state/Brazil

RIALA6/1000

Valter RUVIERI*; Luzia SHUNDO; Janete ALABURDA; Myrma SABINO.

*Endereço para correspondência: Seção de Química Biológica, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo, SP, Brazil. CEP 01246-902
e-mail: vruvieri@ial.sp.gov.br

RESUMO

As cianobactérias (algas azuis) são organismos procariontes fotossintéticos originários do pré-cambriano que se adaptaram a vários *habitats*, desde nascentes termais até solos úmidos, sendo que em água doce sob determinadas condições ambientais, tais como alta luminosidade, alta temperatura e alta concentração de nutrientes, poderão surgir abundantemente formando florações (*blooms*). As cianobactérias produzem vários tipos de toxinas, sendo a microcistina (MC) uma das mais relevantes devido a sua toxicidade. Microcistinas são heptapeptídeos compostos por cinco aminoácidos constantes e dois variantes. São conhecidos mais de 60 tipos de microcistinas. Estudos indicam que uma das formas, a MC-LR (leucina, arginina), atua inibindo enzimas intracelulares (fosfatases), causando alteração na estrutura celular e que, doses sub-letais desta hepatotoxina, estão associadas ao desenvolvimento de câncer. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de microcistinas em 177 amostras de água de hemodiálise coletadas em clínicas de hemodiálise do Estado de São Paulo, no período de abril de 2002 a março de 2003. As análises das 177 amostras de água utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) não detectaram a presença de microcistinas. Embora não tenham sido detectadas microcistinas nas amostras analisadas, é de extrema importância a continuidade do monitoramento desta ficotoxina devido a gravidade das intoxicações humanas causadas pelas cianotoxinas.

Palavras-Chave. cianobacterias; microcistinas; água de hemodiálise; ELISA; toxinas.

ABSTRACT

Cyanobacteria (blue-green algae) are most ancient photosynthetic prokaryotes organisms originated from pre-Cambrian era, which have adapted to several habitats, from thermal springs to humid ground. These organisms appear abundantly in fresh water forming blooms under determined ambient conditions, such as high luminosity, high temperature, and high nutrient concentration. Cyanobacteria produce some types of toxins such as microcystins (MC), which are one of the most important one due to its toxicity. Microcystins are heptapeptides formed by five invariable and two variable amino acids. More than 60 microcystins have been chemically identified. It has known that one of these toxins, the MC-LR (leucine, arginine) induces intracellular enzymes (phosphatases) inhibition, causing alteration in the cell structure. Sub-lethal doses of this hepatotoxin have been associated with malignancy development. The aim of the present study was to determine the concentration of microcystins in water used for hemodialysis procedure. Water samples were collected from hemodialysis clinics located in the State of São Paulo - Brazil from April/2002 to March/2003, by means of routine official visit of the Sanitation Inspection Committee. Microcystins concentrations were determined by means of commercially available enzyme immunoassay [ELISA (Envirologix Inc)]. ELISA kit was tested, and a standard curve with linear regression ($r > 0.98$) was obtained. The recovery rate was 98.6% and the quantification limit was $0.16\mu\text{g/L}$. All of 177 analyzed samples were non-reactive. Although all the samples were negative, the continuous monitoring of this cyanotoxin in water samples is extremely important due to its toxicity, and for preventing events like one occurred in Caruaru, PE-Brazil.

Key Words. cyanobacteria; microcystins; hemodialysis water; ELISA; toxins.

INTRODUÇÃO

A diminuição da qualidade da água de reservatórios destinados para abastecimento público, irrigação e recreação é uma preocupação constante em todo o mundo. A poluição decorrente de fontes antropogênicas pode ocasionar sérios riscos à saúde da população. O aumento da eutrofização destes sistemas pelo enriquecimento de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, tem favorecido a floração de cianobactérias produtoras de toxinas^{5,17}. Essas florações são crescimentos populacionais massivos e descontrolados destes microrganismos em ambientes aquáticos devido às alterações ambientais.

As cianobactérias são microrganismos aeróbicos fotoautótrofos, procariontes bioquimicamente e estruturalmente muito semelhantes às bactérias. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz, obtendo energia para seu metabolismo principalmente através da fotossíntese³. Podem ser encontradas nos mais diferentes meios, vivem em solos e rochas onde desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na ciclagem de nutrientes, porém os ambientes de água doce são os mais adequados para o seu crescimento, principalmente em pH entre 6 a 9, temperatura entre 15 a 30°C, alta concentração de nutrientes e estabilidade da coluna d'água¹³. As cianobactérias também são tradicionalmente chamadas de "algas azuis", apesar da distante relação filogenética com este grupo de microrganismo.

Várias cianobactérias que formam florações em ambientes aquáticos produzem uma grande variedade de compostos tóxicos. As toxinas produzidas são denominadas cianotoxinas e representam um amplo grupo de toxinas naturais, tanto do ponto de vista químico como toxicológico. Seus mecanismos de toxicidade descritos atualmente são muito diversos e variam de efeitos hepatotóxico, neurotóxico e dermatotóxico à inibição geral de síntese de proteínas^{5,16}. Estas toxinas são liberadas quando ocorre a morte ou lise celular da cianobactéria, sendo que apenas 30 a 50% destas espécies produzem estas toxinas.

Registros de intoxicações em populações humanas devido às exposições as toxinas de cianobactérias têm sido encontrados em diferentes partes do mundo⁷. No entanto, o primeiro registro de envenenamento fatal em humanos ocorreu no Brasil, em 1996, numa clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru no estado de Pernambuco, quando mais de 100 pacientes renais crônicos foram intoxicados, dos quais 52 morreram após a exposição intravenosa de água contendo microcistina durante o tratamento de diálise^{9,14}.

A microcistina é um heptapeptídeo cíclico com mais de 60 variáveis que geralmente diferem na natureza de dois aminoácidos⁶, devido a sua estrutura química peculiar é altamente estável na água e resistente a grandes variações de temperatura e pH. A microcistina mantém sua toxicidade mesmo após a fervura e em condições naturais, no escuro, podendo

persistir por meses ou anos. Em temperatura elevada (40°C) e condições de pH alto ou baixo, foram observadas hidrólises lentas, sendo necessário aproximadamente 10 semanas em pH 1 e mais de 12 semanas em pH 9 para a degradação de cerca de 90% da concentração total das microcistinas⁸. O fígado é o órgão alvo, onde ocorre a inibição enzimática das proteínas fosfatases serina/treonina, especialmente PP1 e PP2A, podendo levar a morte ou a intoxicação crônica, gerando tumores hepáticos¹¹.

Estudos recentes mostram a ocorrência de cianobactérias tóxicas em reservatórios de água de abastecimento público, lagos e rios^{2,3}, em diferentes regiões do Brasil, tais como: estados do Rio de Janeiro¹⁰, Paraná¹⁰, Rio Grande do Sul^{12,19}, Pernambuco¹⁵, Pará¹⁸ e no estado de São Paulo¹, nas represas Billings, Guarapiranga, Alto Tietê e Rio Grande.

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo determinar a concentração de microcistinas em águas coletadas em clínicas de hemodiálise, localizadas no estado de São Paulo, após seu tratamento para uso em diálise.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram utilizadas 177 amostras de água de hemodiálise coletadas em clínicas de hemodiálise do estado de São Paulo, Brasil, pelos fiscais de 24 DIRs (Divisão Regional de Saúde) sob coordenação da Vigilância Sanitária, durante o período de abril de 2002 a março de 2003.

As amostras foram coletadas em frascos plásticos e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da análise, a qual foi realizada na Seção de Química Biológica da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz.

Metodologia

A concentração de microcistina foi determinada pelo método de imunoensaio (ELISA), utilizando o kit da Envirologix Inc. e uma leitora de placas Multiscan MCC/340P e Behring EI311. Todos os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente antes do uso, por meia hora ou até atingirem o equilíbrio térmico e a quantificação de microcistina foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit.

Inicialmente, o kit foi testado quanto a sua linearidade, obtendo-se uma curva padrão a partir das medidas da absorbância das soluções padrões de microcistina em função de sua concentração, na faixa de 0,16 a 2,50 µg/L (Figura 1). A regressão linear foi obtida no Excel (Microsoft) utilizando escala semi-log. A exatidão e precisão do método analítico foram verificadas a partir de experimentos de recuperação de amostras fortificadas artificialmente.

As amostras foram analisadas em duplicata. A quantificação de microcistina foi realizada utilizando uma curva padrão previamente determinada.

RESULTADOS

As amostras foram provenientes de diferentes cidades do Estado de São Paulo, sendo que a sua origem de acordo com a região de coleta está representada na Figura 2, onde se considerou como a origem a localização da DIR responsável pela sua coleta, armazenagem e envio para o laboratório.

A curva padrão (Figura 1) apresentou linearidade no intervalo de concentrações de 0,16 a 2,5µg/L ($r > 0.98$). Obteve-se uma recuperação média de 98,6% para um limite de quantificação de 0,16 µg/L (ppb). O desvio padrão relativo (rsd) para cada par de padrões e de amostras analisadas foi inferior a 15%.

Não foi detectada a presença de microcistinas nas 177 amostras de água analisadas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As amostras foram coletadas em diferentes cidades do estado de São Paulo pelos fiscais de 24 DIRs que participaram deste projeto, totalizando 177 amostras de águas de hemodiálise, o que permitiu uma avaliação geral da qualidade dos sistemas de tratamento de água das clínicas localizadas neste estado, durante o período amostrado.

As amostras foram coletadas durante o período de um ano, pois a floração das cianobactérias são sazonais, com maior prevalência no verão, uma vez que a concentração de microcistinas em águas superficiais tende a apresentar um comportamento esporádico. Este problema torna-se mais grave durante os períodos de altas temperaturas e estiagem, quando os níveis dos mananciais tornam-se baixos e a concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, aumentam, oferecendo condições propícias para a floração de cianobactérias nestes ecossistemas, resultando no aparecimento das microcistinas.

Após o episódio ocorrido em Caruaru, a revisão das normas e dos padrões de potabilidade da água para consumo humano (Portaria MS 518/2004 de 25/03/2004) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água também o controle da ocorrência de cianobactérias na água bruta e de três cianotoxinas na água tratada para consumo humano, estabelecendo o valor máximo permitido para microcistina⁴ igual a 1,0 µg/L.

As clínicas de hemodiálise normalmente são abastecidas pela rede de abastecimento municipal, de forma que as águas fornecidas podem conter até 1,0 µg/L de microcistinas. Porém, como não existem dados que garantam que água para hemodiálise com concentração acima de 0,00 µg/L seja segura para os pacientes, recomenda-se que a concentração de microcistina na água tratada para hemodiálise seja igual a zero. Frente à constatação da existência de microcistina na água de abastecimento, considera-se que a manutenção de forma

rigorosa do sistema de tratamento de água nas clínicas de hemodiálise é a medida mais eficaz para minimizar o problema de contaminação dos pacientes renais crônicos.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que não foram detectadas microcistinas nas amostras analisadas. Este fato é muito positivo para um primeiro monitoramento no estado de São Paulo, o que permite concluir que as medidas adotadas de controle de cianobactérias pela Portaria MS 518/04 juntamente com a manutenção adequada dos sistemas de tratamento de água de hemodiálise, constituem-se medidas preventivas eficientes para garantia da qualidade de água de hemodiálise, podendo evitar a contaminação de pacientes renais crônicos por microcistinas.

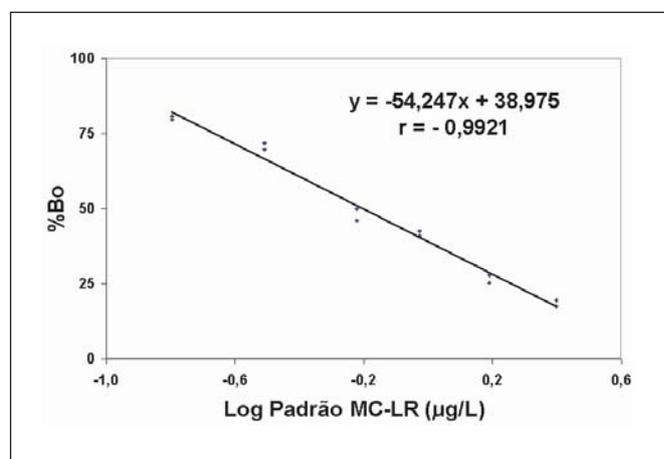


Figura 1. Curva de calibração de microcistina-LR onde %Bo = (média da absorbância do padrão ou amostra / média da absorbância do controle negativo).100.

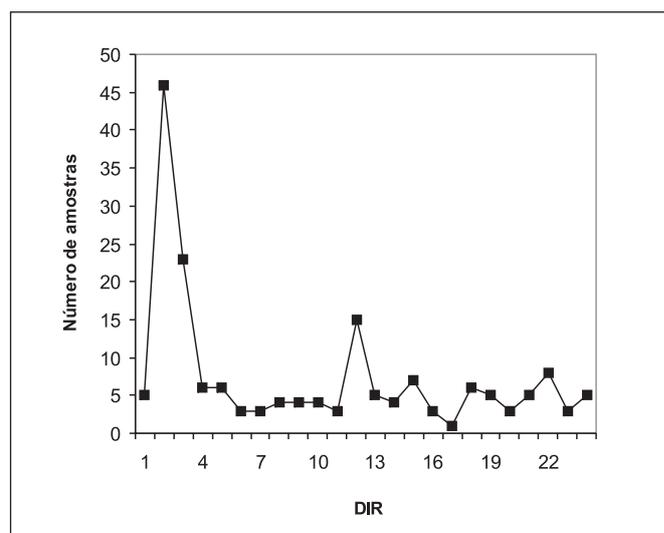


Figura 2. Número de amostras provenientes das regiões do estado de São Paulo.

Conclui-se, que monitoramentos deste tipo são muito importantes e permitem avaliar a qualidade da água de hemodiálise dos centros de diálise avaliados, principalmente que a presença de cianobactérias nos mananciais do estado de São Paulo são uma realidade. Ainda, considera-se que estes monitoramentos devam ser realizados periodicamente, devido à toxicidade desta fitotoxina, com o intuito de prevenir incidentes similares aos ocorridos na cidade de Caruaru no estado de Pernambuco/Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Agujaro, F.L.; Lussari, F.J. Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá-Estado de São Paulo-Brasil. In: Seminário Latino-Americano sobre cianobactérias tóxicas: Qualidade de água e saúde pública, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. Brasília: MS/FUNASA, 2001, p.6.
2. Azevedo, S.M.F.O. et al. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, **Journal of Applied Phycology**, **6**:261-5, 1994.
3. Azevedo, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a Saúde Pública, **Revista Virtual de Medicina**, **1**(3), 1998.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília.
5. Carmichael, W.W. Toxins of fresh water algae. In: Tu, A.T. (ed), **Handbook of natural toxins**, New York, Marcel Dekker, 1988, p: 121-147.
6. Chorus, I.; Mur, L. Preventative measures. In: Chorus, I; Bartram, J. (ed), **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**, London: E & FN Spon, 1999. p: 235-273.
7. Falconer, I.R. Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In: Steffensen D.A., Nicholson B.C., editors. **Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management** - Proceedings of an International Workshop. Adelaide; 1994.
8. Harada, K.I.; Tsuji, K.; Watanabe, M.F. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. **Phycologia**, **35**(6):83-8, 1996.
9. Jochimsen, E.M. et al.. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis in Brazil. **New England Journal of Medicine**, **338**: 873-878, 1998.
10. Kamogae, M. **Monitoramento de microcistinas e estudo de parâmetros que favorecem o seu desenvolvimento nas represas de ItaipuCapivara e Três Bocas**, Paraná, 2002. [Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina]
11. Mackintosh, C. et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants, **FEBS Letters**, **264**: 187-192, 1990.
12. Matthiensen, A.; Yunes, J.S.; Codd, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Rev. Brasil. Biol.**, **59**(3): 361-376, 199.
13. Mur, L.R.; Skulberg, O.M.; Utkilen, H. Cyanobacteria in environment. In: Chorus, I; Bartram, J (ed). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p: 15-37.
14. Picanço, M. R. et al. Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lung, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **37**(8): 1225-1229, 2004.
15. Pouria, S. et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, **352**: 21-26, 1998.
16. Sivonen, K. Cyanobacterial toxins and toxin production, **Phycologia**, **35**(6): 12-24, 1996.
17. Skulberg, O.M.; Codd, G.A.; Carmichael, W.W. Toxic blue-green algae blooms in Europe: a growing problem, **Ambio**, **13**: 244-247, 1984.
18. Vieira, J.M.S. **Toxicidade de cianobactérias e concentração de microcistinas em uma represa de abastecimento público da região amazônica do Brasil**, São Paulo, 2002 [Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
19. Yunes, J.S. et al. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos lagoon estuary, southern Brazil, **J. Aquat. Ecosystem Health**, **5**: 223-9, 1996.