

Gláucia Pessin Vieira

**Desenvolvimento de procedimento analítico automático para
determinação espectrofotométrica de microcistinas em águas
empregando o processo de multicomutação em fluxo**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba

2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Vieira, Gláucia Pessin

Desenvolvimento de procedimento analítico automático para determinação espectrofotométrica de microcistinas em águas empregando o processo de multicomutação em fluxo / Gláucia Pessin Vieira; orientador Boaventura Freire dos Reis; Co-orientador Marli de Fátima Fiore. -- Piracicaba, 2009.

83 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise em fluxo contínuo 2. Espectrofotometria 3. Qualidade da água 4. Química analítica 5. Toxinas I. Título

CDU 543.068.3:543.42

Á DEUS

Por cada momento precioso que foi destinado nesta longa caminhada.....

Aos meus filhos, Felipe e Giovane
Valiosos presentes que Deus me concedeu.

Ao meu marido Fábio

Pelo carinho e respeito que sempre teve pelo meu trabalho.

Aos meus pais e meu irmão

Que sempre estiveram ao meu lado, e principalmente, fazendo confiar no futuro.

Por tudo que hoje sou.

DEDICO este TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira puderam contribuir para a realização deste trabalho.

Ao Professor Boaventura por toda a orientação, compreensão, paciência, ensinamentos científicos e cultura geral. E principalmente, do grande exemplo de vida.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, particularmente ao Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho" pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq/CT-Hidro pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA pela atenção.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação do CENA pelos serviços prestados.

A seção de biblioteca do CENA pela atenção e colaboração nas referências bibliográficas.

A seção de Biologia Celular e Molecular, pelo ensinamento adquirido no estágio realizado e atenção prestada, e principalmente, a Maria Estela Stênico, por toda a ajuda prestada.

A professora e co-orientadora, Marli de Fátima Fiore pela atenção dispensada.

Aos professores Elias A. G. Zagatto, Francisco J. Krug e Maria Fernanda Guiné, pelos ensinamentos e convivência.

Ao professor Zé Santista pelas amostras cedidas.

Aos técnicos da Seção de Química Analítica, Iolanda Rufini (Tatinha), Valdemir (Mi) e Fátima Patreze por todos os serviços prestados.

Um agradecimento especial à técnica Sheila Roberta pela atenção e disposição para os serviços necessários e tantos outros mais.

Agradecimento especial também a pessoas que me ajudaram com a correção deste trabalho.

Aos grandes colegas e amigos conquistados: Andréia, Tuane, Jeová e Mário (Maranhão); Alessandra (João Pessoa); Marcelo, Milena e os pimpolhos (Marcelo Henrique e Murilo Augusto, Mato Grosso do Sul); Carla, Marcos e o pequeno Lucas (Piracicaba); Alexssandra, Richard e os lindos filhos (Andrey e Sophia, Piracicaba); o grande amigo de Regeneração (PI), Milton; grande amigo atualmente "pernambucano" André, (Recife, PE); a "loura" Rejane (Americana); aos argentinos, Alfredo, Lorena e a linda Ana (Brasileira); a peruana Ausberta; ao amigo desde 2003, Evandro (Araras); aos colegas do grupo do Chico, Lidiane (MG), Lílian (Mineiros do Tietê), Quienly (PR), Paulino (Piracicaba), Dário (Belém), Flávio, Kennedy, Marquinhos e Gabriel (Piracicaba); a cearense Janete (Fortaleza); aos novos amigos espanhóis, Nestor e Idôia; ao "japa" Miltom (Tupã) e a querida Paula Fortes (Botucatu), pela amizade e grande convivência.

Aos meus tios e primos, maternos e paternos, sogro e sogra, pela união familiar e pelo incentivo, com os quais sempre estiveram presentes.

A todos os colegas e amigos da Química Analítica, pelos momentos de descontração, apoio e colaboração.

Muito obrigada

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da Criação seja animal ou vegetal; ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante".

Albert Schweitzer
Prêmio Nobel da Paz de 1952

RESUMO

VIEIRA, G.P. **Desenvolvimento de procedimento analítico automático para determinação espectrofotométrica de microcistinas em águas empregando o processo de multicomutação em fluxo**. 2009. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Neste trabalho, propõe-se o desenvolvimento de procedimento analítico automático para determinação espectrofotométrica de microcistinas em águas empregando o processo de multicomutação em fluxo. O módulo de análise para implementar o procedimento analítico empregou uma bomba de seringa para propulsão de fluido e válvulas solenóide para controlar a amostragem. A bomba de seringa foi construída no laboratório de Química Analítica, CENA/USP, onde foi empregado um motor de passo para fazer o deslocamento do êmbolo da seringa. Como detectores foram empregados, um fotômetro da Oriel Instrument e um fotômetro desenvolvido no laboratório de Química Analítica, CENA/USP, baseado em um fotodiodo da BURR-BRAWN e projetado para este procedimento. Uma cela de fluxo com caminho óptico de 40 mm e volume interno de 32 μL , foi construída sob medida para permitir fácil acoplamento da fonte de radiação (LED) e dos fotodetectores, formando uma unidade compacta. O controle do sistema de fluxo, incluindo o motor de passo, foi executado por um microcomputador usando um software escrito em linguagem Quick Basic 4.5. Os sinais gerados pelos fotômetros em diferença de potencial eram convertidos para digital por um multímetro e enviados para o computador através da interface serial 232. O sistema proposto foi empregado para determinação de microcistinas em águas de rios e lagoas. A exatidão foi averiguada comparando com os dados obtidos empregando um equipamento ELISA. A faixa de concentração situada entre (0,1 e 0,8 μgL^{-1}) de microcistina indica que o sistema proposto pode ser usado em serviços de tratamento de águas onde o requerimento da ANVISA (Portaria n°518, 2004) deve ser alcançado.

Palavra-chave: Análise por injeção em fluxo, Multicomutação, Microcistinas, Águas.

ABSTRACT

VIEIRA, G.P. **Development of the automated analytical procedure for spectrophotometric determination of microcystins in waters employing the multicommutation process in flow.** 2009. 83 f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

In this work, it was proposed the development of an automated analytical procedure based on multicommutation for the photometric determination of microcystins water. The flow module to implement the analytical procedure employed a syringe pump for solution propelling and solenoid valves for sampling control. The syringe pump was constructed in the laboratory CENA/USP, employed a step-motor to carry out the displacement of the syringe piston. As photodetectors was employed an Oriel Instrument photometer and a photometer developed in the laboratory CENA/USP based on a BURR-BRAWN photodiode and designed to be used in this procedure. A flow cell with optical pathlength of 40 mm and inner volume of 32 μL was tailored to allow easily coupling of radiation source (LED) and photodetector, forming a compact unit. The control of the flow system, including the step-motor was performed by a microcomputer using a software wrote in Quick BASIC 4.5. The signals generated by the photometers in difference of potential were converted to digital by a digital multimeter and sent to the microcomputer through the serial interface 232. The proposed system was employed for the photometric determination of microcystins in water. Accuracy was assessed comparing the results with those obtained using a ELISA instrument. The concentration response (0.1 - 0.8 μgL^{-1} microcystins) and limit of detection lower than 0.01 μgL^{-1} microcystins, indicated that the proposed system can be used in plants of water treatment where the ANVISA requirement must be maintained.

Keywords: Flow injection analysis, Multicommutation, Waters, Microcystins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula Microcistina.....	21
Figura 2. Modelo do processo de amostragem binária	30
Figura 2. Vista em corte da cela de fluxo.....	39
Figura 4. Diagrama do fotômetro	40
Figura 5. Diagrama da fonte de alimentação do fotômetro	41
Figura 6. Diagrama da Interface de controle.....	42
Figura 7. Diagrama da Interface de controle)	43
Figura 8. Diagrama da fonte de alimentação da interface de controle.....	45
Figura 9. Desenho da bomba de seringa.....	46
Figura 10. Diagrama do módulo de análise com válvula solenóide de 3 vias.....	47
Figura 11. Diagrama com válvula solenóide de estrangulamento.	47
Figura 12. Fluxograma do procedimento do kit ELISA.....	52
Figura 13. Registros referentes à determinação fotométrica de microcistina	58
Figura 14. Registros referentes à determinação fotométrica de microcistina.	60
Figura 15. Resposta dos fotômetros.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de LEDs encontrados comercialmente	36
Tabela 2. Sequência de funcionamento do módulo de análise	48
Tabela 3. Comparação dos resultados dos padrões	59
Tabela 4. Resultados obtidos variando do fundo de escala do fotômetro da Oriel ..	62
Tabela 5. Valores de absorvância das amostras analisadas	64
Tabela 6. Performance dos fotodetectores	65
Tabela 7. Determinação de microcistina em águas	67
Tabela 8. Comparação das características analíticas do sistema.....	68
Tabela 9. Resultado das análises das amostras águas	69
Tabela 10. Características do sistema com fotômetro montado no laboratório.	70

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Cianobactérias.....	17
2.2 Microcistinas	19
2.3 Espectrofotometria	26
2.4 Lei de Lambert-Beer	26
2.5 Análise por injeção em fluxo (FIA)	27
2.6 Multicomutação	29
2.7 Sistemas com o processo de multicomutação.....	30
2.8 LED como fonte de radiação em fotometria	36
3. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1 Equipamentos e acessórios.....	38
3.2 Detalhamento da cela de fluxo	39
3.3 Detalhamento do fotômetro	40
3.4 Detalhamento das interfaces eletrônicas	42
3.5 Descrição da bombe de seringa	45
3.6 Descrição dos módulos de análises	47
3.7 Reagentes e soluções	51
3.8 Procedimento do kit ELISA	51
3.9 Instruções	52
3.10 Especificação.....	53

3.11 Cuidados com o Kit	53
3.12 Procedimentos de análise do kit.....	54
3.13 Interpretação dos resultados	55
3.14 Amostras	55
3.15 Padrão de Microcistina	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Módulo de análise com válvulas de estrangulamento	57
4.2 Estudo do efeito do fundo de escala.....	61
4.3 Efeito do tempo de processamento da amostra para leitura	63
4.4 Comparação dos fotômetros	64
4.5 Análise das amostras	66
4.6 Emprego do fotômetro montado no laboratório	68
5. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são organismos procariontes pertencentes ao grupo das bactérias. Estima-se que o surgimento ocorreu há 3,5 bilhões de anos. Geralmente, são encontradas em ambientes aquáticos (fitoplâncton) e apresentam um crescimento em larga escala, conhecido como floração (*bloom*). São estáveis em água, podendo resistir a variações de temperatura na faixa de 15 a 30 °C e variações de pH entre 6 e 9. Evoluem em exposição prolongada à radiação solar e na presença de compostos nitrogenados e fosfatados, gerando a eutrofização dos ambientes aquáticos (LEMES; YUNES, 2006).

O uso em larga escala de compostos nitrogenados e fosfatados, tais como detergentes e fertilizantes, os quais terminam alcançando os corpos d'água, são considerados os principais fatores relacionados às florações de cianobactérias em águas superficiais, resultando na contaminação dos mananciais utilizados para o abastecimento público (CARMICHAEL, 1994; LINDNER et al., 2004). As cianobactérias normalmente apresentam-se em água limpa e de preferência com material orgânico, que serve como alimentação para viver, crescer e se multiplicar. A microcistina é a toxina que a cianobactéria libera para se defender no ambiente aquático.

O risco de proliferação de cianobactéria é maior em regiões de alta densidade populacional, onde não dispõem de eficiente sistema de tratamento de esgoto. O crescimento rápido dos microrganismos em águas superficiais ocorre com o predomínio de uma ou mesmo poucas espécies de cianobactérias produtoras de toxinas, ou metabólitos que inibem a predação por microcrustáceos, larvas de peixes, moluscos, etc. Esses consumidores primários irão preferir consumir as microalgas não tóxicas e com maior valor nutricional, contribuindo para a redução das microalgas, resultando em uma diminuição dos consumidores primários. Como resultado desses processos, tende-se a aumentar no meio aquático a participação das cianobactérias tóxicas como organismos fitoplanctônicos dominantes (SIVONEN; JONES, 1999).

A principal preocupação com a ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água é a capacidade desses microrganismos de produzir e liberar para o meio aquático toxinas (cianotoxinas), as quais podem trazer

sérios riscos à saúde humana. Esse risco pode ser relacionado à ingestão da água, ao contato com atividades de recreação no ambiente ou consumo de pescado contaminado. A principal via de intoxicação é oral através do consumo da água sem tratamento para remoção das toxinas (FALCONER, 1998; KUIPER-GOODMAN; FALCONER; FITZGERALD, 1999).

As florações de cianobactérias têm conseqüências danosas para os organismos vivos e para o meio ambiente, alterando o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Geralmente são visíveis, criando um biofilme superficial de cor verde, modificando a transparência da água e resultando a desoxigenação de lagos e rios. As substâncias liberadas produzem gosto e odor desagradáveis, interferindo na qualidade da água em reservatórios de uso humano.

A grande preocupação em relação às toxinas produzidas pelas cianobactérias é que elas não são facilmente removidas por processos convencionais de tratamento de água. Alguns estudos comprovam que tais toxinas resistem até mesmo à fervura. Dentre as cianobactérias, a microcistina LR (leucina-arginina) é a encontrada com maior freqüência (LEMES; YUNES, 2006).

Atualmente, há uma grande preocupação das autoridades sanitárias com a presença de toxinas liberadas por cianobactérias em águas superficiais usadas para abastecimento público. Essa preocupação tem como fundamento a comprovação de que tais toxinas representam um grande risco para a saúde (RAPALA et al., 2002; MORENO; REPETTO; CAMEÁN, 2003; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992). Segundo a literatura, já foram identificados mais de 60 tipos de microcistinas (OHTA et al., 1994; RAPALA et al., 2002), sendo citadas como as mais potentes causadoras de tumores (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; OHTA et al., 1994; RAPALA et al., 2002; MORENO; REPETTO; CAMEÁN, 2003).

Embora a literatura documente a existência de vários tipos de toxinas liberadas por cianobactérias em águas superficiais, (CARMICHAEL, 1994; LINDNER et al., 2004) o foco das agências reguladoras está direcionado para as microcistinas que apresentam alto potencial de toxidez (CARMICHAEL et al., 1988; CARMICHAEL, 1994; RAPALA et al., 2002; SHEN et al., 2003; LINDNER et al., 2004). Há registro de casos fatais ocorridos no Brasil relacionados à presença desta toxina em solução de hemodiálise (JOCHIMSEN et al., 1998; CARMICHAEL, et al., 2001; AZEVEDO et al., 2002; LAWTON et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu em $1 \mu\text{gL}^{-1}$ a concentração máxima de microcistina em águas para consumo (LINDNER et al., 2004; LAWTON et al., 2003). Este valor também foi adotado no Brasil através da Portaria nº1469 do Ministério da Saúde, Monitoramento de Cianobactérias e Cianotoxinas, a qual foi publicada em 29 de dezembro de 2000 (BRASIL, 2000). No presente, está em vigência a portaria nº 518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004), a qual manteve os mesmos níveis de concentração para esta toxina.

Para atender este requisito é necessário dispor de procedimentos analíticos de alta sensibilidade; em geral, tem sido empregada cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (ZECK; WELLER; NIESSNER, 2001), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) (AVERSANO; EAGLESHAM, QUILLIAM, 2004), eletroforese capilar com detecção por espectrofotometria ultravioleta (VASAS et al., 2002), etc.

Segundo J. Rapala et al. (2002) os procedimentos baseados na inibição da proteína fosfatase (Protein Phosphatase Inhibition Assay, PPI-Assay) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) são mais sensíveis que os baseados em cromatografia. A literatura consultada evidencia a necessidade de se dispor de procedimentos analíticos de fácil implementação, custo moderado e resposta rápida, para permitir a tomada de decisão em tempo hábil, evitar possível contaminação da água servida para consumo humano, da água destinada para recreação bem como para outras atividades econômicas.

Observa-se na literatura que, em grande parte, os estudos com microcistinas em águas empregam a metodologia *ELISA* (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) nos procedimentos para sua determinação (RAPALA et al., 2002; SHEN et al., 2003; LEMES; YUNES, 2006). Esta metodologia emprega instrumentação de custo moderado, baseada em detecção espectrofotométrica permitindo alcançar alta sensibilidade. Em geral, os reagentes necessários são adquiridos no mercado na forma de *Kits*, os quais são fornecidos acompanhados pelo receituário a ser seguido. Dado à sua praticidade, esses *Kits* alcançaram grande aceitação em todo mundo, pois dentre as vantagens oferecidas, está o fornecimento dos anticorpos imobilizados em suporte sólido.

O crescimento em larga escala do processo FIA (Análise por Injeção em Fluxo) juntamente com as virtudes de suas características analíticas como versatilidade, baixo consumo de reagentes, equipamentos de baixo custo, etc,

permitiu obter grandes benefícios no desenvolvimento de procedimentos com excelentes resultados e alta produtividade.

Com a evolução do processo FIA, surgiu a estratégia denominada multicomutação, permitindo que a manipulação das soluções de amostras e reagentes fossem controladas por um microcomputador. Como grande contribuição para a Química Limpa, podemos considerar que as vantagens deste processo permitem o controle necessário do tempo, garantindo uma boa repetibilidade dos resultados, e principalmente, a economia dos reagentes. Empregando um microcomputador com um software apropriado, é possível controlar o tempo de funcionamento das válvulas solenóide, que compõem o módulo de análise, garantindo a inserção de quantidade necessária de reagente para o desenvolvimento da reação envolvida no procedimento analítico. Fato este muito importante, tanto do ponto de vista econômico, como do ponto de vista ambiental, onde podemos destacar uma menor quantidade de resíduo gerado. Outro fator de suma importância é que, além do tempo da análise ser reduzido, o contato do analista passa a ser menor, evitando assim possíveis contaminações.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de instrumentação e procedimento automático para determinação de microcistinas em águas de represas, rios, lagos, etc. O procedimento de determinação foi implementado a partir de um *Kit* comercial, ELISA, o qual é composto por poços com anticorpo imobilizado e reagentes para o desenvolvimento das reações. No plano de pesquisa, foi proposto o desenvolvimento do instrumento de detecção fotométrica empregando LED como fonte de radiação e fotodiodo de alto desempenho para converter a absorção da radiação emitida pelo LED em diferença de potencial. Tendo em vista que, a alteração do meio reacional para melhorar a sensibilidade do método poderia não ser viável, foi desenvolvido um sistema de detecção fotométrica com sensibilidade suficiente para atender as exigências do Ministério da Saúde, que estabelece em $1 \mu\text{gL}^{-1}$ a concentração máxima de microcistina em águas para consumo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cianobactérias

Florações de algas azuis-esverdeadas, conhecidas como cianobactérias, são encontradas em lagos, tanques e rios eutrofizados no mundo todo. Em países tropicais, os tanques que são facilmente poluídos e expostos à altas temperaturas com uma intensa luminosidade, estabelecem ótimas condições para o crescimento desses microorganismos, os quais podem multiplicar-se até proliferarem causando uma chamativa coloração verde na água com aparência de um caldo. Prever como e onde as florações serão formadas é uma tarefa muito difícil (PITOIS; JACKSON; WOOD, 2000; TYAGI et al., 1999).

A duração e o tempo de permanência das florações de cianobactérias dependem largamente das condições climáticas da região. Em zonas temperadas, florações de cianobactérias tendem a surgir com mais frequência durante o final do verão e começo de outono com duração de 2 a 4 meses. Em regiões do Mediterrâneo ou clima subtropicais, as florações talvez possam iniciar mais cedo e persistir por um tempo maior. Na França, pode permanecer por um período de 4 meses. No Japão, em Portugal, Espanha, África do Sul e sul da Austrália as florações podem persistir por um período de 6 meses ou até mais. Em anos com seca predominante, áreas com clima tropical e subtropical da China, Brasil e Austrália, as florações de cianobactérias talvez possam ocorrer quase o ano todo (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Um tópico a ser abordado é a produção de toxinas pelos organismos. Cianobactérias são bactérias gram-negativas capazes de produzirem um alto índice de toxinas como metabólitos, tais como, as cianotoxinas. A classe das cianobactérias compreende 150 gêneros e aproximadamente 2000 espécies. Os organismos responsáveis pelo envenenamento liberado pela toxina da cianobactéria incluem aproximadamente 40 gêneros, sendo os mais conhecidos *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (*Planktothrix*) (CARMICHAEL et al., 2001).

Cianotoxinas são classificadas como biotoxinas responsáveis pelo envenenamento crônico e agudo de animais selvagens, domésticos e seres humanos.

Geralmente as toxinas de cianobactérias mais encontradas são as microcistinas e nodularinas. Infelizmente, as toxinas produzidas pelas cianobactérias não são removidas pelo processo do tratamento de água convencional como a floculação, sedimentação, filtração e cloração, e também, o tratamento que inclui permanganato de potássio ou cloreto (PITOIS; JACKSON; WOOD, 2001).

Para o desenvolvimento das cianobactérias é conveniente que as condições favoráveis do meio estejam com temperatura entre 15 a 30°C, pH neutro ou alcalino (entre 6 e 9), que haja presença de nutrientes como nitrogênio e fósforo e também a presença de vento constante.

As cianobactérias quando morrem ou envelhecem também liberam toxinas, potentes e as vezes, letais. Entre as toxinas liberadas podemos destacar a microcistina-LR, que faz parte do grupo hepatotóxica e anatoxina-a(s), saxitoxina e neosaxitoxina, que são consideradas neurotóxicas. Para que ocorra a morte de um ser humano, via ingestão de água contaminada devemos considerar: a concentração da toxina (em água), a quantidade presente, espécie, tamanho e idade da toxina (TOKARS et al., 1997).

O primeiro registro sobre intoxicação com cianotoxinas foi em 1878, o qual relatou mortes por envenenamento de gados, porcos, cachorros, peixes e morcegos no sul da Austrália. Casos de envenenamento de seres humanos que estavam praticando natação e canoagem, também na Austrália, foram relatados.

Um caso lamentável e bem conhecido no Brasil foi o ocorrido em Caruaru-PE no mês de fevereiro de 1996. Com problemas de mau fornecimento e escassez de água na cidade, um caminhão pipa abasteceu o reservatório do Instituto de Doenças Renais (IDR) com água contaminada com a toxina, ou seja, sem tratamento adequado. Os pacientes apresentaram muitos sintomas, entre eles toxemia (presença de produtos tóxicos no sangue), coagulopatia (distúrbio coagulação sanguínea), lentidão no sistema nervoso central e insuficiência hepática, levando a óbito 65 pessoas que estavam passando pelo tratamento de hemodiálise (ISMAIL; BECKER; HAKIM, 1996).

Devido a este grave acidente e ao melhor conhecimento dessa toxina, o Ministério da Saúde decretou a portaria nº 1469, "Monitoramento de Cianobactérias

e Cianotoxinas”, que foi publicada em 29 de dezembro de 2000. Atualmente existem recomendações sobre como deve ser o processo de retirada desses organismos da água para esta ser utilizada no consumo da população (CARLILE, 1994).

2.2 Microcistinas

As microcistinas são caracterizadas como heptapeptídeos cíclicos produzidas por cianobactérias, principalmente dos gêneros; *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Nostoc*.

A microcistina é uma das toxinas mais comuns entre as existentes, sendo liberada pela espécie *Microcystis aeruginosa*. É estimado que possam variar entre 500 e 4000 Daltons, entretanto, a maioria dos membros conhecidos estão entre 900 e 1100 Daltons, sendo conhecidas 65 isoformas da espécie. A maior causa de envenenamento originada pelas cianobactérias é devido á presença da Microcistina-LR (leucina-arginina). A diferença estrutural das diversas espécies de microcistinas consiste na variação do grau de metilação e nas variáveis isoméricas dos L-aminoácidos. Na Figura 1, é mostrada a forma estrutural da molécula da microcistina-LR, considerando as formas: Adda: Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico; Mdha: N-Metil-dehidro-alanina; Glu: Ácido- γ -glutamínico; Ala: Alanina; β -Me-Asp: Ácido β - β -metil-aspártico (CARMICHEL, 2001).

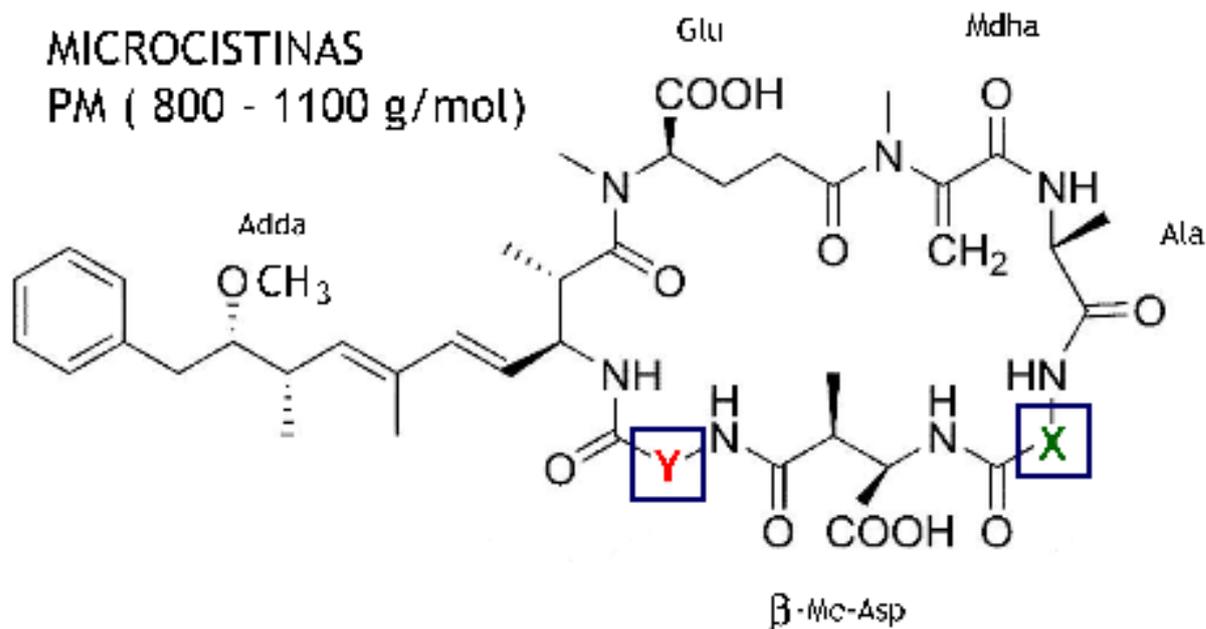


Figura 1. Fórmula estrutural da molécula Microcistina-LR (Leucina (X) + Arginina (Y)). (CHORUS; BARTRAM, 1999).

A microcistina-LR é uma molécula pequena, composta por sete aminoácidos conforme descrito no item anterior. A sua forma de atuação tem mostrado que a microcistina-LR atua inibindo enzimas intracelulares denominadas fosfatases, removendo os grupamentos de fosfato das proteínas. Isso promove uma alteração na estrutura do esqueleto celular, modificando a arquitetura e conseqüentemente a função das células do fígado. Estudos mostram que doses sub-letais das hepatotoxinas provenientes de cianobactérias estaria associada ao desenvolvimento de câncer hepático, uma suposição muito investigada na China, um país que apresenta um alto índice no crescimento da neoplasia (presença de tumores) na população, é a possibilidade de existir a presença de cianobactérias nos mananciais de água que abastece a população (CARMICHAEL, 1994).

Microcistinas são solúveis em água, metanol e etanol, e insolúveis em acetona, éter, clorofórmio e benzeno. Apresentam comportamento estável em água de reservatório, pelo prazo menor do que 01 semana, mas são estáveis por um período muito longo em água filtrada e desionizada. São resistentes a hidrólise química ou oxidação com pH próximo de neutro, resistindo a diversas horas de aquecimento. Em temperatura de aproximadamente 40°C e pH baixo (pH =1) pode

ocorrer hidrólise lenta em um período de 10 semanas, e em pH maior que 9, a hidrólise pode ocorrer em 12 semanas. Hidrólise química rápida pode ocorrer apenas sob condições de laboratório que são improváveis de serem alcançadas no ambiente aquático, por exemplo, em HCl 6M (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Microcistinas podem ser oxidadas pelo ozônio e outros agentes oxidantes fortes, são muito estáveis sob luz solar natural. Na presença de radiação ultravioleta com comprimento de onda próximo da região de máxima absorção da microcistina-LR e microcistina-RR, elas se decompõem rapidamente (HITZFELD; HOGER; DIETRICH, 2000).

Desde o início dos estudos ambientais (KAEBERNICK; NEILAN, 2001) há 20 anos, a formação de “blooms” de cianobactéria tem sido destacada, ocasionando grande desenvolvimento de técnicas de análise dessas toxinas, gerando importantes parâmetros para estudos na saúde pública e ambiental. Desde então, determinações da estrutura química e estudos ambientais de parâmetros do meio ambiente atingindo a produção de toxina têm proporcionado diversos caminhos para a regulação e função de algumas das funções dessa toxina.

Estudos avaliando o potencial para o uso de “cladocerans” (pequenos crustáceos) em biomonitoramento de toxinas de cianobactérias através de duas espécies de zooplankton (*Daphnia gessneri* e *Moina micrura*) foram cultivados em laboratórios para o uso de bioensaios em teste agudo (48 horas) e crônicos (10 dias). Amostras de água foram armazenadas em dois reservatórios e diluídas em água mineral em concentrações diferentes. Análises do fitoplâncton em amostras de água revelaram que as cianobactérias do grupo dominante foram representadas pelo gênero *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Microcistina* (FERRÃO-FILHO et al., 2008).

Amostras de tecido de fígado humano (amostras de pacientes com a síndrome de Caruaru-Brasil, 1996) contaminadas com a microcistina *Microcystis aeruginosa* foram estocadas por um período de 10 anos em condições apropriadas (-70°C). As análises foram realizadas empregando os métodos ELISA, LC/MS e GC/MS. Os resultados confirmaram a presença de microcistina *Microcystis aeruginosa* (MCYST) após o período de estocagem, indicando notável estabilidade ao longo do tempo (YUAN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006).

Florações de cianobactérias tóxicas em corpos d'água usadas como fonte para consumo humano, recreação e irrigação são freqüentes nos dias atuais, devido

a eutrofização do ambiente. O monitoramento das linhagens tóxicas é importante para prevenção dos efeitos adversos gerados por suas toxinas na saúde humana e animal. Métodos que podemos considerar rápidos e sensíveis, como contagem de células de cianobactérias, sua identificação por microscopia ótica e análises das toxinas para detecção, são usados em estações de abastecimento de água e em programas de monitoramento de mananciais de total interesse. Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos e propostos para o diagnóstico rápido e sensível da presença de cianobactérias tóxicas (FIORE et al., 2005).

O tratamento de água para hemodiálise, cuja função é a remoção da toxina microcistina, deve ser realizado seguindo a desionização e/ou osmose reversa, respeitando os critérios e manutenção adequada. Esses critérios variam de acordo com a característica do serviço (volume de água utilizado, tipo de membrana, frequência de regeneração, etc.)

Caso ocorra a presença de microcistina na água fornecida pelo sistema público, independente da sua concentração, aconselha-se a dosagem da microcistina na água pós desionização e/ou osmose reversa para garantir a eficiência da regeneração e manutenção do tratamento de água de cada Unidade. Após desionização e/ou osmose reversa da água a microcistina não deve ser encontrada (BRASIL, 2000).

Entre as diversas técnicas utilizadas para a determinação de microcistina em água, não há nenhuma técnica que possa fornecer uma medida exata da concentração da toxina em toxina de microcistina-LR equivalente, quando ocorre a mistura completa da toxina em amostras de água. Cada técnica gera um valor que requer suposições para derivar um resultado em toxicidade equivalente (NICHOLSON; BURCH, 2001). As técnicas devem ser selecionadas dependendo das informações disponíveis, ou seja, com informações simples, métodos de controle rápidos como microscópicos, podem ser usados para tomar uma decisão do tipo de bioensaio ou técnica físico-química a ser seguida (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Sem considerar o método de detecção a ser seguido, há um número de critérios na determinação da concentração de toxina em termos de toxicidade equivalente de microcistina-LR:

- 1) A toxina deverá ser identificada;

2) Um padrão analítico deve estar disponível, da toxina específica, para a concentração a ser determinada.

Microcistinas podem ser degradadas rapidamente, fotoquimicamente (durante processos analíticos) e microbiologicamente (MERILUOTO, 1997). Diversos procedimentos analíticos empregam a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para a determinação de microcistinas (NICHOLSON; BURCH, 2001). As fases estacionárias mais utilizadas são a RP C18 e C8. Entretanto, há um excelente estudo no qual foi utilizado a coluna C16 e comparada com a C18. A fase móvel usada para a detecção de microcistina com a coluna C18 é aquosa, podendo ser metanol ou acetonitrila (MERILUOTO; CODD, 2005).

Diferentes avanços em LC-MS (cromatografia líquida com detector de espectrometria de massa) tem resultado em pequenos (baixo) limites de detecção, por exemplo a aplicação do microbore-LC associada com um IT-MS (íon trap mobility spectrometer) para a análise de microcistina em amostra de água do meio ambiente. O preço da análise pela técnica LC-MS/MS é relativamente alto para análises de rotina, portanto as determinações iniciais nas amostras são realizadas freqüentemente pelo método ELISA. Amostras positivas e negativas selecionadas são confirmadas por LC-MS/MS depois da extração da fase sólida (SPE) (SPOOF et al., 2003). Com o uso de *Daphnia sp.* microcistinas podem ser detectadas sucessivamente, entretanto, a cultura padrão é realizada com trabalho muito intenso (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Atualmente existem diversos métodos analíticos para detecção de microcistina, onde podemos comparar: características, seletividade, limite de detecção, rapidez, etc.(MERILUOTO; CODD, 2005).

Microcistinas são encontradas na maioria da população de *Microcystis spp.*, na qual freqüentemente estas cianobactérias formam espumas em alta concentração. Isto também ocorre com microcistina encontrada em *Anabaena spp.*. Entretanto, *Planktothrix agardhii* nunca formam espumas e *P.rubescens* geralmente não formam espumas e, ainda, uma alta concentração de microcistinas são formadas em florações dessa classe. Oito microcistinas foram isoladas de treze classes de *Oscillatoria agardhii* coletadas em águas de diferentes lagos (todas as classes produzem de 2 a 5 microcistinas). Atualmente, a presença de microcistina foi mostrada em diversas classes de cianobactérias, denominadas *Microcystis (aeruginosa, wesenbergii e viridis)*, *Anabaena (flos-aquae)*, *Nostoc*, *Oscillatoria*

(*Planktothrix*) (*agardhii*, *rubescens* e *tenius*), *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* (*hibernicus*) e *Aphanocapsa* (*cumulus*) (CHORUS; BARTRAM, 1999) e (CARMICHAEL, 2001). Recentemente, duas novas microcistinas, *seco* [D-Asp] microcystin-RR e [D-ASP, D-Glu (Ome)] microcystin-RR, com a [D-Asp] microcistina-RR, foram isoladas de uma floração tóxica *P.rubescens* em Lake Bled, Eslovênia (GRACH-PROGREBINSKY; SEDMAK; CARMELI, 2004).

Fatores ambientais que talvez possam influenciar o crescimento e produção de cianobactérias como: nutrientes, luz, pH e temperatura, são estudados em culturas contínuas e em *batch*. A quantidade da produção de microcistina pela população de cianobactéria em cultura pode ser diretamente proporcional na razão do crescimento da toxina, onde os fatores ambientais foram limitantes para o mesmo (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Magalhães, De Soares e Azevedo (2001), mostraram o acúmulo de microcistina em tecido de músculo de peixe e crustáceos em uma costa do litoral do Brasil. O máximo encontrado em tecido de músculo de caranguejo foi 103,3 µg de microcistina eq/kg e em tecido de peixe 39,6 µg/kg pelo método ELISA. Em outro estudo mais recente, esses autores demonstraram acúmulo de microcistina em tecidos de vísceras e músculos de peixes, (*Tilapia rendalli*), da Lagoa de Jacarepaguá, no Rio de Janeiro, Brasil.

Microcistinas são toxinas intracelulares e enquanto estiverem vivendo dentro de células, são degradadas lentamente. São liberadas na água apenas quando as células morrem através do processo de tratamento de água, como por exemplo, a percloração ou aplicação de algum algicida. Uma vez liberada na água, as microcistinas podem persistir por um período relativamente longo antes de começar a ser afetada pela biodegradação ou fotólise (CHORUS; BARTRAM, 1999; DUY et al., 2000).

Chorus e Bartram (1999) relataram estudo sobre a ingestão de água contaminada após a natação com a cianobactéria *Microcystis spp.* Aproximadamente 852 pessoas participaram do estudo, onde foram constatadas evidências epidemiológicas no efeito da saúde depois da ingestão da água após a recreação. Resultados mostraram um elevado índice de diarreia, vômitos, úlceras na boca, febres, irritação nos olhos e orelhas em um período de 7 dias após a exposição. Sintomas aumentaram significativamente com a duração do contato da água e a densidade da célula da cianobactéria.

Diversos casos, aproximadamente 26, diagnosticaram doenças de pele e sintomas sistêmicos múltiplos associados com a exposição (alguns com água potável) em águas de rio ou água de chuva. Essas ocorrências foram relatadas na Austrália no período de 1991 a 1992. A água foi estocada em tanques abertos contendo florações *Anabaena* (WHO, 1998).

Um estudo foi realizado no Brasil entre novembro/1995 a outubro/1996, com 50 amostras de água coletadas em 05 regiões do Estado do Paraná. Neste estudo as amostras foram analisadas para detectar a presença da *Microcystis spp.* e microcystins *M.aeruginosa* pelo método ELISA, obtendo resultado positivo em todas as amostras. Amostras de 2 fontes águas usadas para recreação (natação-pesca), coletadas em maio/1996 apresentaram alta contaminação de microcistina (6,38 e 10,0 μgL^{-1}). Nesse trabalho nenhum caso de doenças em seres humanos foi registrado (HIROOKA et al. 1999).

Na China, há registro de um grande número de pessoas com carcinoma hepatocelular (HCC), sendo uma das doenças com maior número de incidências, podendo variar geograficamente de região para região. Há presença abundante de cianobactérias em água de superfície no sudeste da China, onde a incidência de carcinoma hepatocelular é muito alta (CHORUS; BARTRAM 1999).

Humanos podem estar expostos oralmente através da água de beber ou consumo de alimentos naturais com algas e dermatologicamente através do uso de água para recreação de lagos e rios (RAO et al., 2002). O menor caminho é a inalação pela exposição através do uso de água de chuva (CARMICHAEL, 2001).

Um caso de gastroenterite (infecção causada por vírus) pela contaminação com cianobactéria aconteceu com a população de várias cidades ao longo do rio Ohio, USA, em 1931. Em Harare, Zimbabwe, durante os anos de 1960-1965, crianças viviam em uma área da cidade onde bebiam água de um reservatório particular e desenvolviam gastroenterites a cada ano que surgiam florações de *Microcystis*. Outras crianças na cidade com diferentes distribuições de água não foram afetadas e nenhum agente infeccioso foi identificado (CHORUS; BARTRAM 1999).

2.3 Espectrofotometria

Todas as substâncias podem absorver energia radiante quando a luz as atravessa sendo parte dessa energia absorvida. A energia radiante não pode produzir algum efeito sem ser absorvida. A absorção da radiação eletromagnética na regiões ultravioleta (100-380 nm), visível (380-780nm) e infravermelho (780nm-1mm) dependem das estruturas das moléculas e é característica para cada substância química (HARRIS, 2005).

2.4 Lei de Lambert Beer

A Lei de Lambert-Beer, ou também conhecida como Lei de Beer, expressa o fundamento da espectrofotometria e é relacionada à absorção de radiação pela seguinte equação:

$$\text{Absorbância} = -\log(P/P_0)$$

Onde P_0 e P representam as intensidades dos feixes de radiação antes e depois de passar através da solução.

A absorbância representa uma relação direta com a concentração da espécie absorvente de radiação e é expressa pela seguinte equação:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde absorbância (A) é diretamente proporcional à concentração da espécie de interesse na amostra e que absorve radiação em uma dada faixa de comprimento de onda. Geralmente, a concentração da amostra (c) é expressa em moles por litro, o caminho óptico (b) é expresso em centímetros (cm), a grandeza (ϵ) é conhecida como absorvividade molar, sendo expressa nas unidades $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Esta equação, em geral, é conhecida como lei de Lambert-Beer, sendo a absorvância uma grandeza adimensional. A absorvidade molar (ϵ) é uma característica da substância em estudo.

2.5 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Em 1975, o pesquisador Jaromir Ruzicka deu início ao processo de análise em fluxo identificado e conhecido pela sigla FIA, do inglês, "Flow Injection Analysis" (RUZICKA; HANSEN, 1975). Como vantagem desse processo, podemos citar a diminuição da participação do analista, visando minimizar o risco de contaminação da amostra, causando redução dos custos, além de obter uma diminuição do consumo de amostras e reagentes em relação aos procedimentos manuais.

A análise química por injeção em fluxo tem como princípio básico a introdução da solução da amostra em um fluido transportador, sendo deslocada para a cela de fluxo onde ocorre a detecção. Ao longo do percurso analítico, a solução da amostra pode receber a adição de reagentes e passar por diversas etapas de processamento. Primeiramente, foi utilizada uma seringa hipodérmica para a inserção da alíquota da amostra no percurso analítico, dando origem ao nome do processo "Flow Injection Analysis". Inovações posteriores contribuíram para o desenvolvimento desse processo e entre eles podemos citar a utilização do injetor proporcional e da válvula rotatória (BERGAMIN FILHO et al., 1978b; RUZICKA et al., 1977).

Sistemas de análises em fluxo são classificados em fluxo segmentado por ar, monossegmentado e não-segmentado; e também pela forma como a alíquota da amostra é introduzida no percurso analítico, podendo ser contínua ou discreta/intermitente. A amostragem contínua pode ser segmentada por bolhas de ar ou não, enquanto a amostragem intermitente pode ser feita por aspiração, por bombeamento ou injeção da amostra (REIS et al., 1994). O fluxo gerado por aspiração contínua da amostra e reagente pode ser segmentado ou não, correspondente à técnica de análise em fluxo contínuo (CFA). Neste caso, a zona da amostra é segmentada pela adição controlada de várias bolhas de ar (KORN et al., 1996). A inserção da amostra em um sistema de fluxo não-segmentado abrange os

sistemas FIA, sendo que em geral a solução transportadora é um fluído inerte e a solução do reagente é adicionada por confluência (ALMEIDA et al., 2000). Em sistema de análise baseado no processo de fluxo monossegmentado (MSFA), a alíquota da solução da amostra é inserida no percurso analítico intercalada entre duas bolhas de ar (SMIDERLE; REIS; ROCHA, 1999).

Entre as inovações relacionadas ao processo FIA podemos citar: sistema com zonas coalescentes para minimizar o consumo de reagentes (BERGAMIN et al., 1978b); extração por solvente orgânico para determinação de molibdênio em plantas (BERGAMIN FILHO et al., 1978a); emprego do injetor proporcional na determinação de cálcio, magnésio e potássio em digeridos de plantas (ZAGATTO et al., 1979a), alumínio (REIS et al., 1979), nitrogênio total e fósforo também em plantas (REIS et al., 1980); determinação simultânea de nitrato e nitrito em água (GINÉ et al., 1980); pré-concentração com resina de troca iônica (BERGAMIN FILHO et al., 1980) para determinação de amônio em água; adição de padrão (GINÉ et al., 1983) para determinar nitrato em extrato de plantas; sistema monossegmentado para minimizar a dispersão (REIS et al., 1988); dissolução eletrolítica, possibilitando análise de amostras sólidas (metálicas) (BERGAMIN et al., 1988).

A versatilidade do sistema de análise em fluxo permitiu sua incorporação em diversas áreas da química analítica: absorção atômica com chama (ZAGATTO et al., 1979b); espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (JACINTHO et al., 1981); fluorescência atômica (MOREDA-PINEIRO; CERVERA; DE LA GUARDIA, 1997); quimiluminescência (ZAITSU; NAKAYAMA; OHKURA, 1987), amperometria (ZHENG; ZHAN, 1999), espectrometria de plasma acoplada a massa (MICHALOWSHI et al., 1993), potenciometria com eletrodos íons seletivos (VIEIRA et al., 2003), etc.

2.6 Multicomutação

Com o passar do tempo surgiram modificações e inovações no processo FIA, e entre tais inovações destacamos o processo de multicomutação em sistemas de análise por injeção em fluxo (MCFIA) (REIS et al., 1994). O módulo de análise em um processo FIA usual tem como dispositivo central o injetor proporcional ou válvulas rotatórias de 6 e 8 vias (RUZICKA et al., 1977 e MURAKI et al., 1992). Em sistema de análise baseado no processo de multicomutação o módulo de análise tem como dispositivos básicos um conjunto de válvulas solenóides. O injetor proporcional, ou as válvulas rotatórias tem dois estados de repouso com movimento e solidário entre os dois estados. Desse modo, o deslocamento da parte móvel produz uma comutação entre todas as linhas de entrada e saída. Então, o sistema de análise em fluxo é projetado em função desta característica.

Em um sistema de análise em fluxo baseado no processo de multicomutação, o módulo de análise é constituído por um conjunto de válvulas solenóides, em geral uma para cada solução necessária ao procedimento analítico. As válvulas solenóides são dispositivos eletro-mecânico, as quais podem ser organizadas no módulo de análise para trabalhar como unidade de comutação discreta.

Os volumes das alíquotas das soluções da amostra e dos reagentes inseridos no percurso analítico são definidos pelo tempo de acionamento das válvulas solenóide e pela vazão do bombeamento ou aspiração das soluções. Estes parâmetros podem ser ajustados por software, e sem reconfigurar a estrutura física do módulo de análise. As válvulas solenóides foram empregadas para introdução de pequenas alíquotas da amostra e das soluções de reagentes no percurso analítico de modo independente. Esta técnica permite controlar de maneira independente, a inserção no percurso analítico das alíquotas da amostra e das soluções dos reagentes (ROCHA et al., 2002).

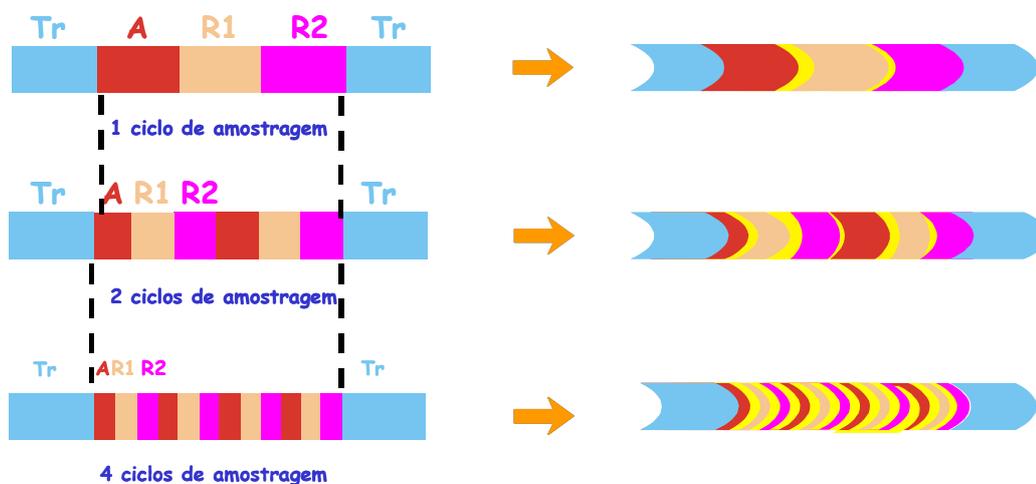


Figura 2. Modelo do processo de amostragem binária. Ilustração do aumento do número de interfaces amostra/reagente1/reagente2 quando se empregam diferentes ciclos de amostragem. fluído transportador, amostra, reagente 1, reagente 2 e produto da reação.

2.7 Sistemas com o processo de multicomutação

No primeiro trabalho sobre multicomutação (REIS et al., 1994), podemos citar a determinação espectrofotométrica de Fe(III) em material digerido de plantas, baseada na reação com tiocinato de potássio. Como parâmetros relevantes envolvidos no conceito de multicomutação foram discutidos alguns aspectos básicos referentes ao processo: emprego de um único canal de bombeamento para inserção das alíquotas de amostra e do reagente e deslocamento da zona da amostra para o detector; inserção de pequenos volumes controlados pelo tempo de inserção e inserção intermitente, evitando o desperdício de reagente. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

Dando seqüência ao processo de multicomutação, foi proposta a determinação de creatinina em urina (ARAUJO et al., 1995) baseada na reação de Jaffe's. O módulo de análise foi construído em função da cinética da reação, a qual era lenta, permitindo a parada de fluxo. O sistema proposto apresentou velocidade analítica de 24 determinações por hora.

Um trabalho com procura binária foi proposto por Korn et al. (1995), em um sistema de titulação espectrofotométrica empregando multicomutação, o qual permitia encontrar o ponto final da titulação sem o emprego de curva analítica. O procedimento analítico foi aplicado à titulação de um ácido forte (HCl) com base forte (NaOH), usando fenolftaleína como indicador. Uma titulação completa era realizada em menos de 3 minutos, tendo um consumo médio de 2 mL de titulante por determinação, e a precisão dos resultados era em torno de 99,99%.

Um módulo de análise para implementar a determinação espectrofotométrica seqüencial de amônio e fosfato em amostras de digeridos de plantas foi proposto por Kronka et al. (1996). As determinações foram baseadas nos métodos de azul de molibdênio e azul de indofenol. Neste módulo de análise seis soluções distintas foram processadas empregando apenas um único canal de bombeamento.

Martelli et al. (1997) propuseram um sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de níquel em ligas metálicas e na especiação de ferro(III) /ferro(II) em águas de rio, utilizando persulfato de potássio imobilizado em resina aniônica AG1-X8 como agente oxidante. O diagrama de fluxo foi desenvolvido para que a oxidação da espécie de interesse e o acondicionamento da resina pudessem ser efetuados em linha. A determinação de níquel baseou-se no método da dimetilglioxima, apresentando uma frequência analítica de 80 determinações por hora. Na determinação de Fe(III), foi usado tiocianato de potássio como reagente cromogênico, alcançando uma frequência analítica de 60 determinações por hora. Os resultados obtidos empregando o procedimento proposto para Fe(II) foram comparados com aqueles obtidos com o método espectrofotométrico, baseado na reação com 1,10 – fenantrolina.

Um procedimento para determinação de boro em material digerido de plantas foi proposto por Tumang et al. (1998), empregando a reação com o reagente cromogênico azometina-H. Tendo em vista que a cinética da reação era lenta, o módulo de análise foi projetado para permitir a retenção de múltiplas zonas de amostras. Empregando esta estratégia, foi possível estender o tempo de desenvolvimento da reação para 200 s, e mesmo assim obtendo uma frequência de amostragem 36 determinações por hora.

Outro procedimento de análise em fluxo com amostragem binária foi desenvolvido por Kronka e Reis (1998) para a determinação espectrofotométrica

sequencial de ferro e alumínio em material digerido de plantas, utilizando reagentes cromogênicos, 1,10 fenantrolina e cromoazurol S, respectivamente.

Um sistema explorando amostragem binária foi desenvolvido por Paim et. al., (1998) para a determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico em fármacos. A reação foi baseada na destruição do complexo $[\text{Fe}(\text{SCN})_n]^{(+3-n)-n}$ pela redução do Fe(III) com ácido ascórbico, sendo necessário manter um excesso do reagente cromogênico (SCN^-) em toda extensão da zona da amostra.

Um sistema em fluxo monossegmentado por ar implementado empregando multicomutação foi proposto por Smiderle; Reis e Rocha (1999) para determinação espectrofotométrica de Mn(II) em digeridos de soja. Neste caso, a reação tinha cinética lenta, o sistema monossegmentado permitiu que várias zonas de amostra fossem deslocadas através de um reator longo de 500 cm para permitir o desenvolvimento da reação, sem risco de interpenetração causada pela dispersão. Embora, o tempo de residência da zona da amostra tenha sido de 5 min., a frequência analítica foi de 50 determinações por hora.

Um procedimento para titulação automática em sistema de fluxo monossegmentado com amostragem binária foi desenvolvido por Martelli et al. (1999). A titulação potenciométrica ácido-base implementada, permitia que o volume da solução da amostra fosse mantido constante e a fração volumétrica do titulante variada, mantendo-se o volume final constante e adicionando-se diluente.

Comitre e Reis (2000) desenvolveram um procedimento simples e rápido para realizar a determinação de etanol em bebidas alcoólicas (uísque, conhaque e aguardente de cana) baseado em multicomutação e amostragem binária. O método foi baseado na oxidação do etanol pelo dicromato de potássio, apresentando 40 determinações por hora.

Um procedimento para titulação espectrofotométrica automática de ácido ascórbico em sucos de frutas e refrigerantes, baseada na variação da fração volumétrica, utilizando a reação com 1,2 dicloroindofenol foi explorada por Paim e Reis (2000). As etapas englobando as decisões dos volumes das soluções foram definidas em função da resposta do detector, onde a frequência de amostragem apresentada foi de 5 e 30 determinações por hora, dependendo do número de etapas até chegar ao final da titulação.

Um sistema em fluxo com a multicomutação para determinação espectrofotométrica de ácido láctico em material ensilado empregando a reação

enzimática foi desenvolvido por Tumang, Borges e Reis (2001). O método espectrofotométrico baseado na reação da enzima peroxidase oxidava o peróxido de hidrogênio formado pela primeira reação enzimática, promovendo a oxidação e condensação dos reagentes 4-clorofenol e 4 aminoantipirina pela enzima peroxidase e o produto da reação, a quinoneimina, sendo monitorado a 510 nm.

Borges, Martelli e Reis (2000), desenvolveram um procedimento automático de titulação potenciométrica baseada na técnica de análise em fluxo monossegmentado, utilizando o conceito de multicomutação e amostragem binária. O desempenho do sistema proposto foi avaliado para chegar até o ponto final na inserção contínua, durante o percurso analítico de diferentes misturas entre alíquotas de solução de amostra e de titulante. O volume da zona de amostra foi mantido constante e as diferentes misturas foram separadas por bolhas de gás, possibilitando a discriminação do sinal em relação a cada mistura.

Martelli et al. (2001), propuseram um sistema analítico para determinação de ácido láctico em iogurte por quimiluminescência utilizando um espectrofotômetro UV-Vis como detector. A reação enzimática com ácido láctico produzida pela reação do luminol com peróxido de hidrogênio, catalisada pelo hexacianoferrato(III) gerava radiação eletromagnética (quimiluminescência) com máximo em torno de 420 nm, sendo detectado pelo espectrofotômetro, o qual operava com a lâmpada desligada.

Tumang, Paim e Reis (2002), propôs um procedimento de titulação espectrofotométrica automática em fluxo visando à determinação de acidez total em material ensilado baseado no conceito de multicomutação e amostragem binária. Este trabalho resultou em uma estratégia para minimizar problemas com amostras coloridas, permitindo que as mesmas fossem analisadas sem nenhum tratamento prévio.

O procedimento de extração líquido-líquido em um sistema de análise em fluxo para a determinação espectrofotométrica de molibdênio em plantas proposto por Comitre e Reis (2003), empregou o processo de multicomutação para minimizar o consumo de reagentes e de solvente orgânico usado na extração. O método baseado na reação do molibdênio com tiocianato, seguido pela redução com cloreto estanhoso e extração com álcool isoamílico, apresentou uma redução do volume de solvente de 85% em comparação com sistema FIA usual, desenvolvido por Bergamin Filho et al. (1978a).

Sistemas de injeção em fluxo visando à determinação de parâmetros metabólicos tais como 3-hidroxiacetato (PIRES et al. (2003a), glicose (PIRES et al. (2003b) e colesterol (PIRES et al. (2003c)) em soro de sangue animal foram desenvolvidos baseados no conceito de multicomutação em fluxo, utilizando válvulas solenóides de três vias. Os métodos propostos foram baseados em reações enzimáticas, sendo que as enzimas foram imobilizadas em suporte sólido, os quais foram acoplados ao percurso analítico do módulo de análise. Neste caso, foi empregado um canal de bombeamento para cada solução, tendo em vista que a coluna de enzima apresenta um grande aumento da impedância hidrodinâmica do módulo de análise, o que inviabiliza a possibilidade de deslocamento das soluções por aspiração empregando um único canal de bombeamento. Entretanto, a adição discreta das soluções de reagentes manteve a condição de baixo consumo e redução do volume de efluente produzido.

Para a determinação de proteína total e albumina em plasma de sangue animal, Luca e Reis (2004) propuseram diferentes sistemas, onde o primeiro era constituído de injetor proporcional e válvula solenóide para a determinação de proteína total, possibilitando a diluição em linha e o segundo era baseado no conceito de multicomutação e amostragem binária, permitindo que uma alíquota da solução da amostra inserida fosse dividida através de dois percursos analíticos distintos, possibilitando as determinações de albumina e proteína total.

Fernandes et al. (2004), apresentaram um sistema de análise em fluxo para determinação de glicerol em vinho sem tratamento prévio da amostra. O sistema em fluxo empregou o conceito de multicomutação, onde a determinação de glicerol foi baseada na reação com *glicerol desidrogenase* na presença do cofator NAD^+ , resultando na oxidação do NAD^+ para NADH , monitorado a 340 nm.

Outro procedimento automático baseado em multicomutação foi desenvolvido por Fernandes e Reis (2004) para determinação de etanol. O procedimento empregou detecção por quimiluminescência, usando um detector constituído de uma cela de fluxo acoplada entre dois fotodiodos formando uma unidade compacta que foi acondicionada em uma caixa metálica. O procedimento para determinação de etanol foi baseado na reação enzimática usando álcool oxidase, produzindo acetaldeído e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com o luminol catalisado pelo hexacianoferrato de potássio, produzindo uma reação de quimiluminescência, apresentando máximo de emissão em torno de 420 nm.

Comitre e Reis (2005) propuseram um procedimento de extração líquido-líquido em um sistema de análise em fluxo para a determinação espectrofotométrica de chumbo em plantas, baseado no processo de multicomutação para minimizar o consumo de reagentes e solventes. O método foi baseado na reação do chumbo com a ditizona formando um quelato, o ditizonato de chumbo, solúvel em tetracloreto de carbono (CCl_4), monitorado a 520 nm empregando um fotômetro baseado em LED (Light Emitting Diode/Diodo Emissor de Luz) como fonte de radiação.

Um equipamento portátil para determinações seqüências de nitrato, nitrito, Fe(II) e Fe(III) em águas de rios foi desenvolvido por Feres e Reis (2005). Os procedimentos foram baseados no processo de multicomutação em fluxo, e a detecção fotométrica foi efetivada empregando um fotômetro desenvolvido no laboratório empregando um fototransistor (Til78) como detector e um LED ($\lambda = 535$ nm) como fonte de radiação.

Um procedimento automático baseado em multicomutação foi desenvolvido por Fernandes e Reis (2006) para determinação de ácido tartárico em amostras de vinho tinto. Foi empregado um módulo de análise de linha única, e o procedimento foi baseado na reação com o vanadato e a detecção por espectrofotometria a 490 nm. O consumo de reagente apresentado neste trabalho, apresentou uma redução em torno de 65% comparada com trabalhos anteriores.

Sistema de análise em fluxo utilizando fototransistor na determinação de etanol em vinho tinto foi explorado por Borges, Frizzarin e Reis (2006), onde o fototransistor funcionou como amplificador de corrente controlada pela absorção de radiação eletromagnética.

2.8 LED como fonte de radiação em fotometria

Os diodos emissores de luz (LEDs) são dispositivos de baixo custo, e atualmente são amplamente usados em detecção fotométrica. Como característica importante apresentam emissão com ótima estabilidade em comprimento de onda, intensidade do feixe de radiação, e largura espectral em torno de 30 nm (DASGUPTA et al., 1993).

O LED é um diodo semiconductor (junção P-N) e quando é energizado emite radiação eletromagnética. São empregados em maior escala em fotometria, os que emitem na região visível (400 – 700 nm) do espectro eletromagnético. A radiação emitida não é monocromática (como por exemplo, um laser), mas é composta por uma banda espectral considerada estreita ($\Delta\lambda \approx 30 \text{ nm}$), produzida pelas interações energéticas do elétron. O processo de emissão de luz é denominado eletroluminescência. Na tabela a seguir, são apresentados os LEDs mais utilizados em instrumentação analítica e suas respectivas características de emissão (BOYLESTAD, NASHELSKY, 1972).

Tabela 1. Características de LEDs encontrados comercialmente (DASGUPTA et al., 1993).

LED	Composição	λ_{max} (nm)	Faixa de intensidade (nm)
Azul	GaN	435,482	418-510
Verde	GaP	565	548-576
Amarelo	GaAsP/GaP	583	565-601
Vermelho	GaAsP	655	643-667
Infravermelho	GaAs	940	929-978

Fotodiodos ou fototransistores são geralmente utilizados como detectores da radiação emitida pelos LEDs. Os fotodiodos têm uso mais geral, pois apresentam menor tempo de resposta e maior faixa linear para a radiação incidente (TROJANOWICZ; WORSFOLD; CLINCH, 1988). Para uma melhor performance do fotômetro, utiliza-se fotodetectores conectados a amplificadores de sinal.

Um sistema FIA acoplado a um fotômetro com três LEDs para determinação de ferro, zinco e alumínio utilizando o reagente cromogênico alaranjado de xilenol foi proposto por Trojanowicz; Szpunarlobinska e Michalski (1991). Os LEDs verde, amarelo e vermelho foram alinhados a um fotodetector e a radiação emitida foi selecionada realizando as medidas fotométricas nas três regiões do espectro.

Sistemas de análise em fluxo para determinação simultânea de fosfato e amônio em amostras de águas naturais, empregando dois fotômetros baseados em LEDs como fonte de radiação, e fotodiodos como detectores foram propostos por Fernandes e Reis (2002) e Rocha, Martelli e Reis (2004). Os sistemas utilizaram LEDs vermelhos com máximo de emissão em 660 nm. Para garantir a sensibilidade do método, Fernandes e Reis (2002) propuseram o aumento do tempo de residência da zona de amostra, enquanto Rocha, Martelli e Reis (2004) utilizaram resinas de troca aniônica e catiônica para a pré-concentração dos analitos.

O emprego de fotômetros baseados em LEDs e fotodiodos associados a sistemas de análises em fluxo é um recurso que tem sido empregado para miniaturização dos sistemas analíticos (DAYKIN; HASWELL, 1995; FERES; REIS, 2005), monitoramento de processos (HUANG et al., 1992; GABRIEL et al., 1998) e medidas em campo (CLINCH; WORSFOLD; CASEY, 1987).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e acessórios

A determinação de microcistina envolve muitas etapas sendo o volume final de 200 μL , portanto não é possível empregar as condições de leitura usuais em sistemas de análise química em fluxo, onde o volume usado por determinação, em muitos casos, é maior do que este, mesmo quando a cela de fluxo tem volume da ordem de 30 μL . O acoplamento do módulo de análise ao sistema de detecção requer um volume bem maior. Visando contornar essa dificuldade, desenvolveu-se os módulos de análise baseado no processo de multicomutação em análise por injeção em fluxo (MCFIA) (LAVORANTE; FERES; REIS, 2006).

Na montagem dos módulos de análises foram empregados os seguintes dispositivos: duas válvulas solenóide de estrangulamento modelos PN161P011, PN161P021 (Nresearch); uma válvula solenóide de três vias, modelo PN161T031 (Nresearch) uma bomba de seringa construída no laboratório; uma cela de fluxo projetada para este procedimento. Como fonte de radiação para detecção fotométrica foi empregado um LED de alto brilho ($\lambda_{\text{max}} = 458 \text{ nm}$). Na detecção fotométrica foram empregados dois dispositivos, um fotodetector modelo 70316 (Oriental Instruments) com ganho de 10^8 , e um fotômetro construído no laboratório para este projeto, empregando o fotodetector OPT301 (BURR BROWN) e o amplificador instrumentação AD524 (Analog Devices), o qual foi configurado para ganho de 100 vezes. Para controlar o módulo de análise e realizar a aquisição de dados foi empregado um microcomputador com um programa escrito em Quick BASIC 4.5. O controle do motor de passo da seringa e o acionamento das válvulas solenóide através da porta de impressora do microcomputador, foi realizado empregando uma interface de potência baseada no circuito integrado ULN2803. Uma fonte de tensão estabilizada em -12 e +12 V foi empregada para alimentar os dois fotômetros. A conversão de sinal de analógico para digital foi realizada utilizando um multímetro de bancada Minipa, modelo ET2231, resolução de 0,1 mV, o qual foi acoplado ao microcomputador através da interface serial RS232. Uma bomba de seringa

construída no laboratório empregando um motor de passo DM 51 (Digimoto) e um seringa de plástico com volume de 1mL também foram empregados.

3.2 Detalhamento da cela de fluxo

Na figura 3 é mostrado a cela de fluxo em corte, permitindo visualizar os detalhes de sua configuração. O núcleo da cela é um tubo de vidro de borosilicato com diâmetros internos e externo de 1,0 e 5,0 mm, respectivamente. Os dois conjuntos de placas (Pv) foram usinadas de forma que ao serem ajustadas por meio dos parafusos permitindo uma rigidez mecânica, além da vedação necessária para o bombeamento de fluido sem vazamento.

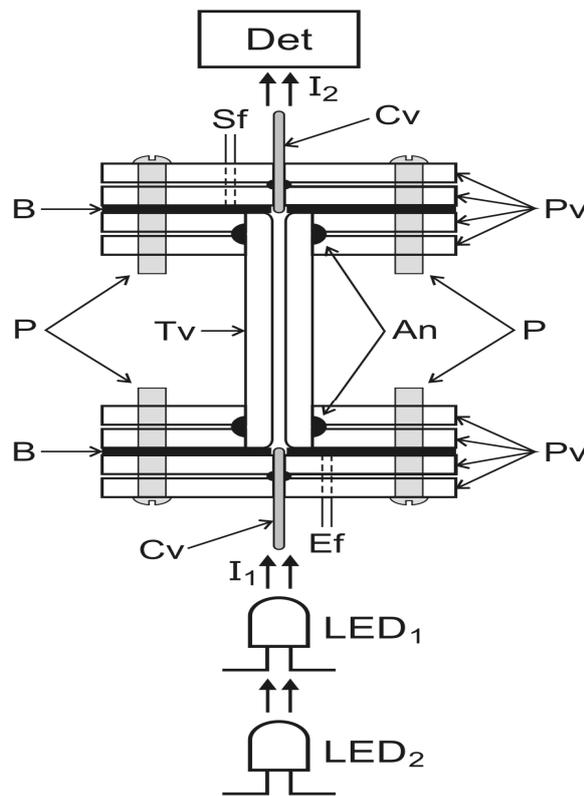


Figura 3. Vista em corte da cela de fluxo. B = tira de borracha, espessura 0,5 mm; P = parafusos; Tv = tubo de vidro, comprimento 40 mm, diâmetro externo 5 mm, diâmetro interno 1,0 mm, An = anéis de vedação do tipo O-ring; Pv = placas de PVC, superfície 5 X 10, espessura 5 mm; Cv = cilindros de vidro, 1,0 mm de diâmetro e 15 mm de comprimento; I₁ e I₂ = feixes de radiação entrando e saindo da cela de fluxo, respectivamente; Ef e Sf = entrada e saída de fluido, tubos de Tygon com diâmetro interno de 0,5 mm; LED₁ = λ_{max} 458 nm; LED₂ = λ_{max} 850 nm Det = fotodetector da Oriel ou o fotodetector construído para este trabalho.

Para simplificar a figura, foi omitido o acoplamento mecânico do LED e do fotodetector à cela de fluxo, os quais formavam uma unidade compacta. Os tubos de entrada e saída de fluido (Ef e Sf) foram colados nas placas de PVC em contato com as tiras de Borracha (B) e passavam livre através da placa externa. Em cada tira de borracha foi aberto um canal de 1 mm de largura para permitir o escoamento de fluido através da cela de fluxo.

Esta cela de fluxo tem um caminho óptico de 40 mm e diâmetro interno de 1,0 mm, portanto o volume é de 32 μL . As extremidades da cela foram alargadas para 2 mm, tendo como objetivos encaixar a ponta do cilindro vidro para molhar a transmissão de radiação e evitar retenção de bolhas de gás, em geral difícil de serem removidas por causa do fluxo de pequeno diâmetro.

3.3 Detalhamento do fotômetro

Na figura 4 é mostrado o diagrama do fotômetro desenvolvido para este trabalho. Este fotômetro tem como núcleo básico o fotodetector OPT301, o qual responde na faixa de comprimento de onda do ultravioleta próximo ($\lambda = 350 \text{ nm}$) ao infravermelho próximo ($\lambda = 1100 \text{ nm}$).

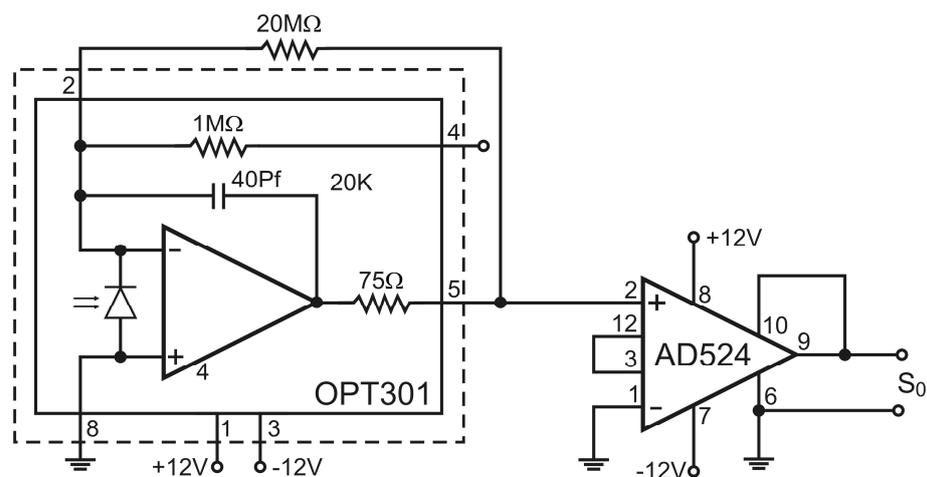


Figura 4. Diagrama do fotômetro. As linhas tracejadas indicam o invólucro do fotodetector OPT301. AD524 = amplificador de instrumentação; S_0 = saída de sinal em mV.

Este dispositivo tem um sistema de amplificação interna com ganho estabelecido pela resistência de $1\text{ M}\Omega$, para isso devemos conectar externamente o pino 4 ao pino de saída (5). O fabricante fornece ao usuário a possibilidade de trabalhar com ganho mais alto, conectando externamente o pino 2 ao pino 5, empregando um resistor de valor diferente, e neste caso, empregamos um resistor de $20\text{ M}\Omega$. Seria possível aumentar o ganho de sinal empregado na malha de realimentação um resistor de valor mais elevado, entretanto, verificou-se que o aumento do nível de ruído inviabilizava este recurso, então optamos pelo emprego um estágio de amplificação adicional. Neste estágio, empregamos um amplificador de instrumentação, o qual trabalha no conceito de amplificação diferencial e tem grande capacidade de rejeição de ruído. O amplificador de instrumentação AD524 permite escolher o ganho de sinal de 10, 100 e 1000 vezes. Neste caso, selecionamos ganho de 100 vezes, conectando entre si os pinos 3 e 12.

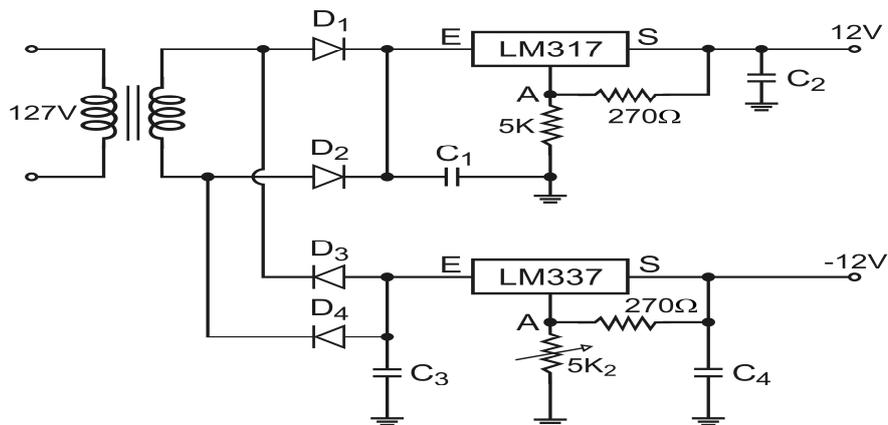


Figura 5. Diagrama da fonte de alimentação do fotômetro. D_1 , D_2 , D_3 e D_4 = diodos retificadores para corrente de 1A; C_1 e C_3 = capacitores eletrolíticos de $1000\ \mu\text{F}$, tensão de trabalho 30 V; E, A, S = entrada, ajuste e saída, respectivamente; C_2 e C_4 = capacitores de tântalo de $2\ \mu\text{F}$. Terminais de saída do transformado 12 +12 V e corrente de 1 A.

Os dois fotômetros empregados necessitavam de diferenças de potencial de -12 V e +12 V. Um parâmetro crucial em sistema de monitoramento de sinais é o ruído eletrônico onde a fonte de alimentação pode ser um potencial causador de ruído. As condições de alimentação do fotômetro da Oriel eram as mesmas do

fotômetro mostrado na Figura 4, portanto ambos foram alimentados com a mesma fonte, a qual é mostrada na Figura 5. Esta fonte atende as condições requeridas, estabilidade das diferenças de potenciais -12,0 V e +12,0 V e baixo nível de ruído.

As diferenças de potenciais de +12 e -12 V eram ajustadas através dos resistores variáveis acoplados aos terminais de ajuste dos dois reguladores de tensão.

3.4 Detalhamento das interfaces eletrônicas

O sinal de controle enviado pelo microcomputador através de cada linha da porta de impressora é no padrão TTL (Transistor-Transistor- Logic), portanto em nível lógico alto obedece a condição $2,5 < \text{sinal} \leq 5 \text{ V}$.

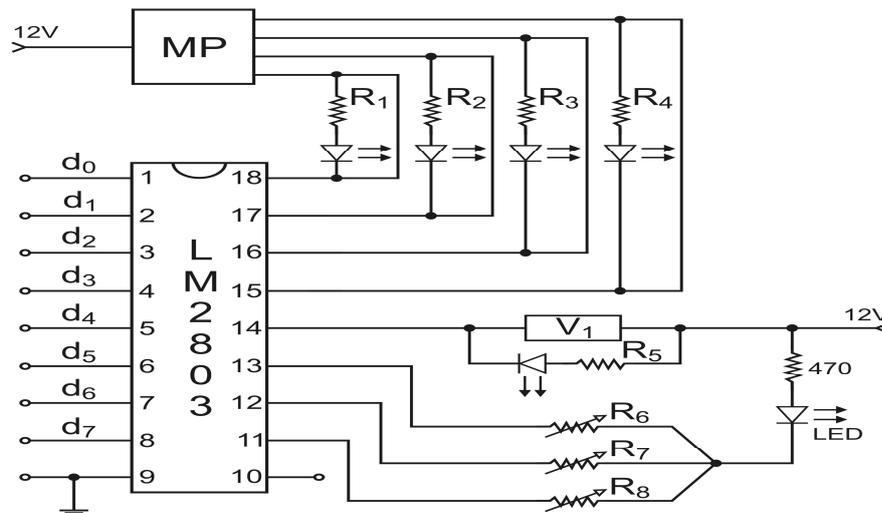


Figura 6. Diagrama da Interface de controle. $d_0, d_1, d_2, \dots, d_7$ = linhas de controle conectadas à porta de impressora; MP = motor de passo; R_1, R_2, \dots, R_5 = resistores $2,5 \text{ k}\Omega, 1/4\text{W}$, R_6, R_7 e R_8 = resistores variáveis de $5\text{k}\Omega$; V_1 = válvula solenóide de 3 vias. LED máximo de emissão em 458nm. Os LEDs acoplados aos resistores R_1, R_2, \dots, R_5 tem a função de indicar que quando está aceso a respectiva linha está ativada.

A intensidade da corrente fornecida em cada linha de controle é da ordem de poucos miliamperes. O motor de passo empregado na seringa e as válvulas solenóide necessitam de diferença de potencial de 12 Volts e intensidade de corrente acima de 100 mA. Em visto disso, foi necessário empregar uma interface de potência para permitir o controle dos dispositivos citados, através dos sinais gerados pelo microcomputador e enviados através da porta de impressora. As interfaces representadas nos diagramas das Figuras 6 e 7 permitem controlar diferença de potencial de 12 V, tendo uma diferença de potencial de entrada no padrão TTL.

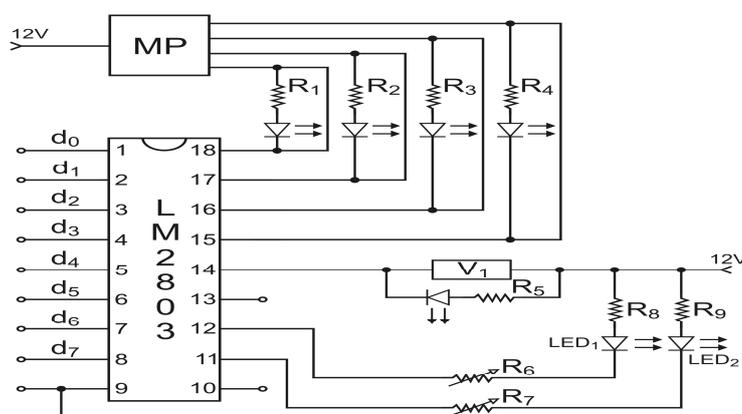


Figura 7. Diagrama da Interface de controle. R_6 , R_7 = resistores variáveis de $5k \Omega$; LED_1 e LED_2 , $\lambda_{max} = 458$ e 850 nm, respectivamente. Os outros símbolos já foram definidos na Figura 4.

O circuito integrado ULN2803 pode drenar uma corrente de 400 mA em cada linha. Os terminais de d_0 a d_7 indicados neste diagrama correspondem aos bits de D_0 a D_7 da porta da impressora, os quais se têm acesso através dos terminais de 2 a 9 do conector DB25. O terminal 9 foi ligado ao terminal 18 do conector DB25. Esta interface foi acoplada ao computador usando um cabo (flat cable) de 10 vias.

Quando empregamos LEDs como fonte de radiação eletromagnética em fotometrias, podemos ajustar a intensidade de emissão em função do fundo de escala desejado. Visando encontrar o fundo de escala mais apropriado, o LED foi acoplado à interface de controle para permitir a seleção de fundos de escala. Nesta configuração, 3 valores de fundo de escala eram obtidos ativando por software as linhas de controle d_6 , d_7 e d_8 do circuito integrado ULN2803 (Figura 6). Os valores

dos fundos de escala de 1200, 1950 e 2980 foram obtidos ajustando os resistores variáveis R_6 , R_7 e R_8 .

Na descrição da cela de fluxo (Figura 3) foi indicado que o diâmetro interno é de 1,0 mm. Bolhas de ar causam grandes distorções na detecção fotométrica empregando sistemas de análise em fluxo, sendo que micro-bolha é muito difícil de ser removida, principalmente em celas de fluxo de pequeno diâmetro interno. A leitura de sinais em 2 comprimentos de onda é um recurso que tem sido usado para contornar esse transtorno (ZAGATTO et al., 1990).

Imaginando que poderíamos ter esse tipo de problema, empregamos uma interface mostrada na Figura 7 semelhante à Figura 6, diferenciando no arranjo do acoplamento dos LEDs. No caso anterior, tínhamos um LED com 3 fundos de escala selecionados por software, e neste caso temos dois LEDs acoplados aos bits d_6 e d_7 , também selecionados por software. Utilizando este arranjo, o monitoramento da amostra poderia ser realizado em 458 e 850 nm.

Para alimentar estas interfaces (Figura 6 e 7) também era necessário dispor de uma de alimentação apropriada, isto é, capaz de fornecer a corrente necessária para alimentar as bobinas do motor de passo mantendo constante uma diferença de potencial de 12 V. O diagrama da fonte de alimentação desta interface é mostrado na Figura 8 e é formada por 2 reguladores de voltagem para garantir o fornecimento de corrente necessária, mantendo a diferença de potencial, a qual pode ser ajustada através do resistor variável acoplado aos reguladores de voltagem LM317. Neste caso foi empregado um transformador de voltagem com entrada de 127 V e saída - 12+12V e corrente de 2 A.

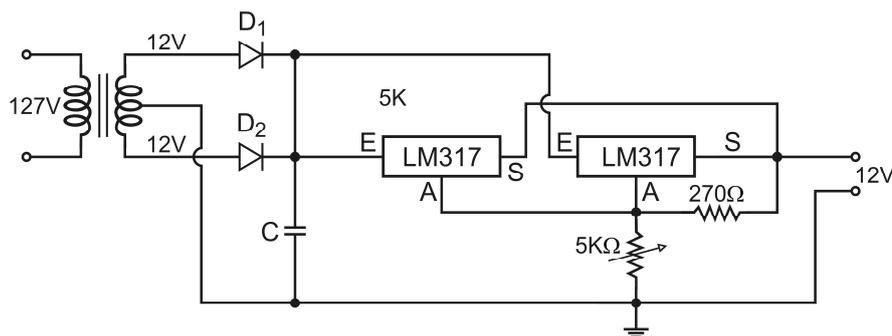


Figura 8. Diagrama da fonte de alimentação da interface de controle. D_1 e D_2 = diodos retificadores para 3A; C = capacitor eletrolítico de 2000 μF , tensão de trabalho 30 V; E, A e S = entrada, ajuste e saída, respectivamente do LM317.

3.5 Descrição da bomba de seringa

Na Figura 9 é mostrado o diagrama da montagem da bomba de seringa. Ao eixo do motor de passo foi acoplado um parafuso, o qual foi usinado em latão com diâmetro de 15 mm e rosca com passo de 1 mm. Uma porca para o fuso foi usinada no centro de uma placa de latão de 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,5 de espessura, onde foi fixado o êmbolo da seringa, conforme mostra a Figura 9.

O corpo da seringa foi preso por parafuso a uma placa de acrílico fixada na placa de PVC usada como base de sustentação do motor de passo. Quando o motor de passo era colocado em funcionamento, o parafuso girava solidário ao eixo do motor, e deslocava o êmbolo da seringa para frente ou para trás, com o objetivo de encher ou esvaziar a seringa, dependendo direção do movimento.

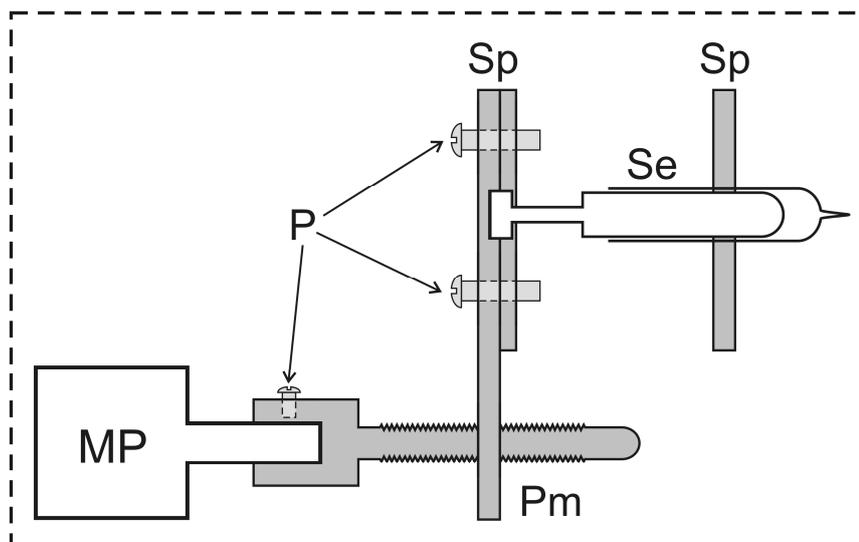


Figura 9. Desenho da bomba de seringa. Mp = motor de passo, Pm = parafuso com rosca de passo de 1 mm; P = parafusos; Sp = placas de suporte; Se = seringa, volume de 1mL.

O controle do interfaceamento do motor de passo, mostrado nas Figuras 6 e 7, foi realizado através do microcomputador, onde se observa que o mesmo foi acoplado ao circuito integrado ULN2803 para ser controlado através dos bits d_0 , d_1 , d_2 e d_3 . Nesta configuração, quando o microcomputador enviava seqüencialmente aos bits d_0 , d_1 , d_2 e d_3 sinais de controle (pulsos 5 v), o motor girava no sentido horário (direita). Quando a seqüência de pulsos era invertida d_3 , d_2 , d_1 e d_0 , o motor girava no sentido anti-horário (esquerda).

O motor empregado tem um ângulo de rotação 7,5 graus por pulso, dessa forma com uma seqüência de 4 pulsos, o ângulo de rotação era de 30 graus. A rosca do parafuso acoplado ao eixo do motor foi usinada com passo de 1,0 mm, portanto eram necessários 48 passos para deslocar o êmbolo da seringa 1,0 mm para frente e para trás, dependendo do sentido de rotação programado. Estabeleceu-se em 0,05 s a duração de cada pulso de controle enviado às interfaces de controle (Figuras 6 e 7), portanto a velocidade de deslocamento do êmbolo da seringa era de 24 mm min^{-1} .

3.6 Descrição dos módulos de análise

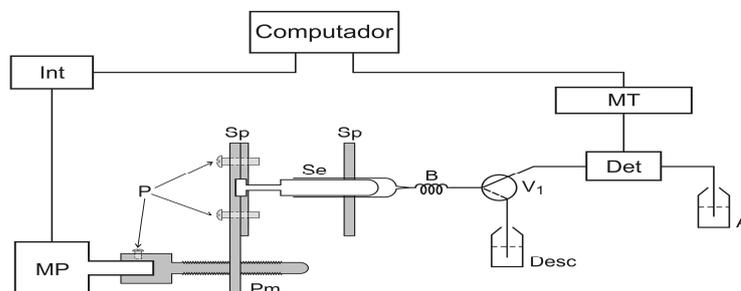


Figura 10. Diagrama do módulo de análise com válvula solenóide de 3 vias. B = linha de fluxo, 20 cm, diâmetro interno 0,8 mm; V = válvula solenóide de 3 vias; Det = fotômetro; A = amostra ou solução de referência; Desc = descarte; Mt = multímetro digital com resolução de 0,1 mV; Int = interface de controle (Fig.6). Os outros símbolos foram definidos na Figura 11.

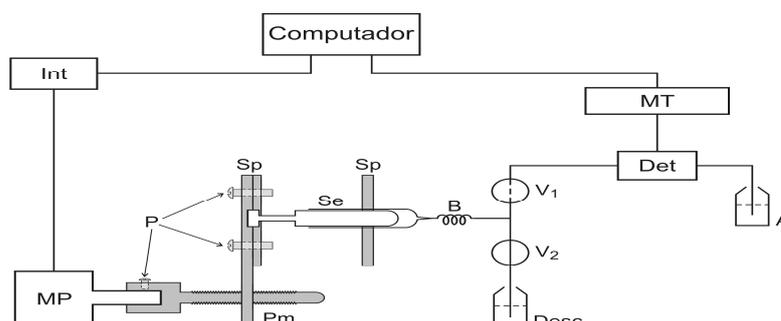


Figura 11. Diagrama do módulo de análise com válvula solenóide de estrangulamento. V_1 e V_2 = válvulas solenóides de estrangulamento, normalmente fechada e normalmente aberta, respectivamente. A linha contínua e tracejada nos símbolos de V_2 e V_1 indica passagem de fluido com a válvula desligada e ligada, respectivamente. Os outros símbolos foram definidos na Fig.10.

As condições de preparo da amostra para determinação fotométrica de microcistina resultavam em um volume final de 200 μL , assim o módulo de análise foi desenvolvido considerando-se esta restrição e a necessidade de fazer as leituras em triplicatas. Para propulsão de fluido foi empregada a bomba de seringa descrita na Figura 9. Foram desenvolvidos dois módulos de análise e os respectivos

diagramas de fluxo são mostrados nas Figuras 10 e 11. A sequência de funcionamento dos módulos de análise é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência de funcionamento do módulo de análise.

Etapa	Atividade	Rotação do motor	Número de ciclos	Válvula V ₁	Volume (µL)
1	Seringa para o início	Direita	X	0	-
2	Operador coloca na água	-	-	0	-
3	Aspira água	Esquerda	120	0	176,5
4	Lê a referência	-	-	0	
5	Esvazia a cela	Esquerda	120	0	176,5
6	Descarte	Direita	240	1	352,8
7	Operador coloca na água	-	-	0	
8	Aspira amostra	Esquerda	80	0	117,6
9	Leitura de sinal	-	-	0	
10	Aspira amostra	Esquerda	20	0	29,4
11	Leitura de sinal	-	-	0	
12	Aspira amostra	Esquerda	20	0	29,4
13	Leitura de sinal	-	-	0	
14	Esvazia a cela	Esquerda	120	0	176,5
15	Descarte	Direita	120	1	176,5

Os dois detectores empregados (Oriol) e o desenvolvido neste trabalho (Figura 4) geravam os sinais analíticos em mV, sendo equivalente a leitura feita em transmitância. Verificou-se que a magnitude do sinal gerado em mV dependia da intensidade da radiação emitida pelo LED, dessa forma, visando verificar a

existência de alguma implicação no resultado da análise, foi elaborada a montagem mostrada na Figura 4. O LED foi acoplado de modo que era possível selecionar três valores distintos de fundo de escala, sendo que seus valores eram ajustados através dos resistores variáveis acoplados entre o LED e os terminais de controle do circuito integrado (CI) ULN2803.

Os dois fotômetros geravam os sinais referentes à absorção da amostra em mV, portanto era necessário calcular a absorbância. As diferenças de potenciais geradas pelos dois fotodetectores eram diretamente proporcionais às intensidades dos feixes de radiação incididos sobre eles, então equação abaixo foi inserida no software para calcular a absorbância.

$$\text{Absorb} = -[\text{Log}(S_v - S_{v_0}) / (R_v - S_{v_0})] ; \quad \text{Equação(1)}$$

Onde:

S_v = leitura com LED azul em mV;

R_v = leitura de referência em mV;

S_{v_0} = leitura no escuro, realizada com o LED apagado.

A leitura no escuro do fotômetro da Oriel Instruments era em torno de 0,4 mV, e do fotômetro montado no laboratório era em torno de 4mV. Embora estes sinais fossem estáveis, o computador era instruído para os ler no início do processamento de cada amostra. Os dados gerados em mV e em absorbância eram salvos no formato ASCII para permitir posterior processamento.

O estudo referente ao efeito do fundo de escala foi realizado empregando o interfaceamento mostrado na Figura 6. O LED está acoplado às linhas de controle do CI ULN2803 através dos resistores variáveis R_6 , R_7 e R_8 . O dreno de corrente através destes resistores era selecionado através dos bits de entrada d_5 , d_6 e d_7 . Quando o computador enviava um sinal em torno de 5 V através do bit d_5 , fechava o circuito formado pelo LED e pelo resistor R_6 . A corrente que fluía através do circuito podia ser ajustada modificando o valor da resistência. A intensidade de emissão do LED era proporcional à intensidade da corrente passando através do circuito, e o sinal gerado pelo fotodetector era proporcional intensidade do feixe de radiação, portanto o valor do fundo de escala era ajustado por meio desse resistor. Então,

valores distintos de fundo escala 1200, 1950 e 2980 foram ajustados através dos resistores R_6 , R_7 e R_8 , respectivamente.

O controle do módulo de análise e a aquisição de dados era feita pelo microcomputador utilizando um software escrito em linguagem Quick BASIC 4.5. Quando o software era iniciado, solicitava os valores dos parâmetros de controle mostrados na Tabela 2. Primeiro passo era posicionar o êmbolo da seringa na posição de referência, o qual arbitrariamente foi definido o número 10 escrito no corpo de seringa. O operador indicava a posição do êmbolo, e o microcomputador calculava o número de passos (X) a serem executados. Após esta etapa era solicitado ao operador para colocar o recipiente com água para aspiração, então a etapa 3 era executada.

Após encher a cela com água, eram realizadas as leituras com o LED nos 3 fundos de escala. O microcomputador ativava em sequência as linhas d_5 , d_6 e d_7 e realizava as leituras correspondentes aos fundos de escala de 1200, 1950 e 2980 mV (leituras de referência R_{V01} , R_{V02} , R_{V03}). Também, realizava as leituras no escuro (S_{V01} , S_{V02} , S_{V03}) com o LED desligado. Estes dados eram salvos e usados para calcular a absorvância.

A partir da etapa 8, o microcomputador executava todas as operações indicadas e ao finalizar a etapa 15, voltava para de número 7 para iniciar o processamento de outra amostra. Nesta sequência eram executadas 3 replicatas, e as leituras eram feitas nos 3 fundos de escala estabelecidos. Após cada leitura, era calculada a absorvância empregando a Equação(1) definida na página anterior.

Após a definição do fundo de escala, os experimentos foram realizados empregando o interfaceamento mostrado na Figura 7. Observa-se nesta figura, que os LEDs azul ($\lambda = 458 \text{ nm}$) e o de infravermelho estão acoplados ao CI ULN2803 para serem ativados através das linhas de controle d_6 e d_7 . A forma de operação era semelhante à descrita para o estudo dos fundos de escala. Entretanto, o microcomputador era instruído para ativar somente as linhas de controle d_6 e d_7 . Em cada caso eram feitas 10 leituras e as médias calculadas eram usadas como referência (R_f e R_v) para calcular a absorvância. Neste caso, o fundo de escala do LED azul ($\lambda = 458 \text{ nm}$) foi ajustado para 3000 mV e o de infravermelho para 800mV.

3.7 Reagentes e soluções

Água purificada com condutividade elétrica menor que $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ foi utilizada na lavagem de material e preparo das soluções.

Um Kit Microcistina Placa com 96 poços para análise quantitativa, seguindo o Método de Imunoensaio competitivo – ELISA (Enzyme-Linked Imunosorbent Assay).

3.8 Procedimento do Kit ELISA

O kit da Beacon Microcistina utilizado para este ensaio compreende placa com 96 poços, e o método de imunoensaio competitivo por ELISA (Enzyme-Linked Imunosorbent Assay). O kit contém soluções de referência com concentrações de 0; 0,1; 0,3; 0,8; 1,0; e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistina, e permite a quantificação de microcistina em águas tão baixas quanto $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Os componentes que fazem parte do kit são:

- 01 placa contendo 12 tiras com 8 poços com anticorpos imobilizados;
- 01 frasco de solução de lavagem concentrada (wash solution);
- 01 frasco de conjugado enzimático microcistina-HRP (microcystin-HRP);
- 01 frasco de anticorpo anti-microcistina (anti-microcystin);
- 01 frasco de substrato (substrate);
- 01 frasco de solução “STOP” (stop solution);
- 01 frasco controle negativo ($0,0 \mu\text{g L}^{-1}$ microcystin-LR);
- 01 frasco de cada solução de referência de microcistina-LR com concentrações de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$; $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$; $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$; $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$;
- 01 frasco com a solução de controle de microcistina ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$).

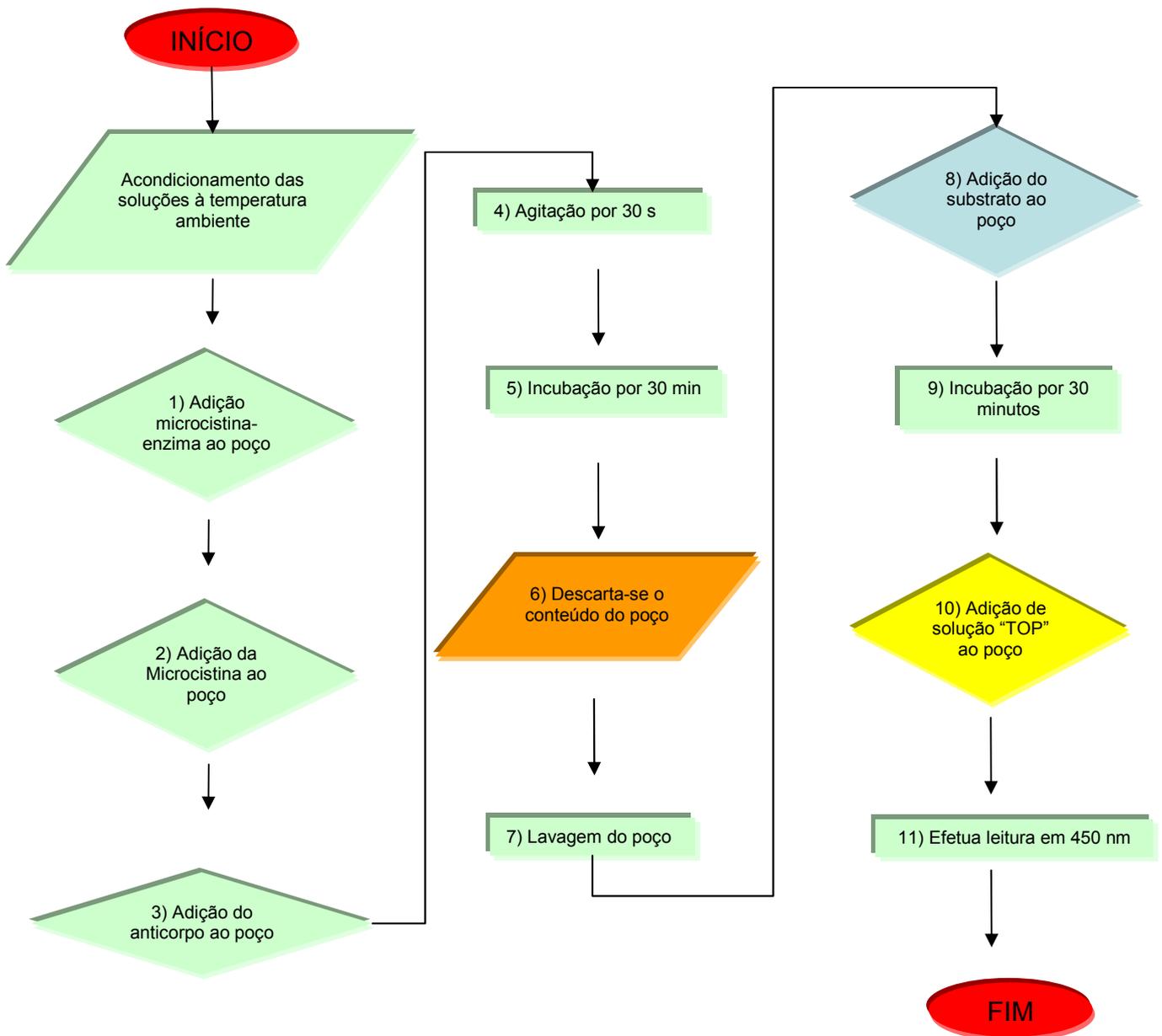


Figura 12. Fluxograma do procedimento do kit ELISA.

3.9 Instruções

O Kit Microcistina utiliza anticorpos policlonais que se unem as microcistinas e ao conjugado microcistina-enzima. A toxina microcistina presente na amostra compete com o conjugado microcistina-enzima (peroxidase) por um número limitado de sítios de ligação de anticorpos. Os anticorpos de cabra anti-IgG de coelho estão

imobilizados nos poços da placa. Após a etapa de lavagem é adicionado o substrato, sendo que o resultado do processo competitivo é visualizado com o desenvolvimento de coloração azul. Após um intervalo de 30 min é adicionada a solução de ácido clorídrico (1 molL^{-1}) (solução stop) para interromper o processo reacional. Após essa etapa a solução adquire uma coloração amarela. Como ocorre com todo imunoenensaio competitivo (Competitive Immunoassay), a concentração de toxina é inversamente proporcional à intensidade da cor da solução. Então, a diminuição da intensidade da cor apresenta uma correspondência com a concentração de microcistina na amostra. Portanto, a solução que apresenta cor mais intensa tem baixa concentração de microcistina e o inverso ocorre com a solução que apresenta cor mais clara.

3.10 Especificação

O kit da Beacon Microcistina Placa não apresenta diferença entre microcistina-LR e outras variantes de microcistina, porém detecta a quantificação em vários níveis.

O kit demonstra as diversas variantes de microcistina que podemos considerar: Microcistina-LR - 100% em reação cruzada; Microcistina-RR – 87%; Microcistina-YR – 48% e Nodularina – 31%.

Como vantagem da técnica ELISA para detecção de microcistina, podemos considerar a alta sensibilidade.

3.11 Cuidados com o Kit

Todos os componentes do Kit sem exceção, devem ser armazenados em ambiente com temperatura entre $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 8°C , quando não estiveram em uso.

Os componentes não podem ser congelados, nem ser expostos a temperatura superior a 37°C .

Todos os reagentes e amostras devem alcançar a temperatura ambiente antes de iniciar a análise.

O kit não deve ser usado após a data de validade.

Não se devem misturar reagentes ou tiras de placas de kits que apresentem diferentes números de lote.

3.12 Procedimentos de análise do kit

O procedimento para a determinação de microcistina consiste nas seguintes etapas:

- 1º- Reagentes do kit e amostras são mantidos à temperatura ambiente durante 30 minutos antes do teste;
- 2º- Prepara-se a solução de lavagem diluída adicionando 5 mL de solução de lavagem concentrada em 495 mL de água;
- 3º- Adição do conjugado toxina-enzima peroxidase (50 µL) em cada poço;
- 4º- Adição das soluções de referência (soluções padrão) ou amostras (50 µL) nos poços;
- 5º- Adição de anticorpo anti- toxina (50 µL) em cada poço;
- 6º- Agita-se a placa rápida e cuidadosamente (durante 20-30 segundos), e então cobre-se os poços com parafilme;
- 7º- Espera-se um intervalo de tempo de 30 minutos;
- 8º- Após a incubação, descarta-se o conteúdo dos poços;
- 9º- Preenche-se os poços com a solução de lavagem diluída e descarta-se em seguida. Esta operação é repetida 4 vezes, totalizando 5 lavagens. Inverte-se a placa (poços) em papel absorvente para retirar o máximo de água possível;
- 10º- Adição de Substrato (100 µL) em cada poço;
- 11º- Cobre-se os poços e espera-se 30 minutos;
- 12º- Adição de 100 µL da solução “Stop” em cada poço;
- 13º- Leitura direta nos poços a 450 nm.

Nota: Para evitar contaminação, utiliza-se uma ponteira limpa para cada solução. “Stop Solution”, ácido clorídrico 1mol L⁻¹.

O procedimento usual (Beacon Analytical Systems) é feito utilizando um equipamento Elisa (Drake Equipamentos, São Paulo), modelo Quick Elisa. Tal procedimento é realizado no Laboratório Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

3.13 Interpretação dos resultados

Para verificar a eficiência de detecção do kit Beacon, utiliza o controle positivo de Microcistina, $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ (controle de microcistina), este valor deve estar dentro da faixa que corresponde a $0,80 - 1,30 \mu\text{gL}^{-1}$.

3.14 Amostras

As amostras de água foram coletadas em vários lugares da cidade de Piracicaba/SP: Pontos diversos do rio Piracicaba, lagoa da Rua do Porto, lagoas do campus da ESALQ, lago de propriedade particular e ribeirão Corumbataí, Bairro Guamium.

Para as amostras coletadas, fez-se o disco de Secchi, medindo a profundidade da coleta e realizando algumas medidas físicas, como pH e temperatura de cada coleta. Posteriormente, foram filtradas utilizando filtro $0,45 \mu\text{m}$ (Whatman) para remoção de sólidos em suspensão e estocadas em frascos de micro centrífuga (frasco ependorf) a temperatura de -4°C .

3.15 Padrão de Microcistina

Foi adquirido um padrão de microcistina –LR com lote G001 800201, de origem Cepa Microcystis RST 9501, grau de pureza > 90% com concentração de $500 \mu\text{gml}^{-1}$. O padrão MC-LR estava em meio de metanol e devido a isto, fez-se estudo da preparação das soluções de referência em água e em meio metanol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Módulo de análise com válvulas de estrangulamento

Conforme foi indicado no item 3.1, foram projetados dois módulos de análises, sendo que um empregava válvulas solenóide 3 vias (Figura 10), e o outro válvulas estrangulamento (Figura 11). Estes dois módulos de análises foram experimentados visando selecionar aquele que permitisse o melhor aproveitamento do volume da amostra, que era de 200 μL . Os registros mostrados nas Figuras 14 foram obtidos empregando o módulo de análise da Figura 11.

O sexto conjunto de registros é um padrão de controle que acompanha o Kit, e segundo o fornecedor o valor deve estar entre 0,8 e 1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ microcistina. Observa-se pela altura dos registros que a concentração de microcistina está dentro da faixa esperada. Este resultado indica que não ocorreu erro de preparação das soluções ou contaminação.

O sétimo registro corresponde à leitura do branco feito com a água usada para preparar as soluções de referência a partir do padrão de microcistina adquirido no mercado interno. Os registros obtidos com as soluções preparadas usando este padrão de microcistina, apresentam uma tendência semelhante à observada com os do Kit, exceto para a solução de 0,062 $\mu\text{g L}^{-1}$ microcistina, indicando que provavelmente alguma micro-bolha possa ter ficado retida no caminho óptico da cela de fluxo. Os registros seguintes correspondem às soluções de referência preparadas em metanol e observa-se que as respostas não têm correspondência com o esperado. Este teste foi realizado tendo em vista que a solução estoque estava em metanol.

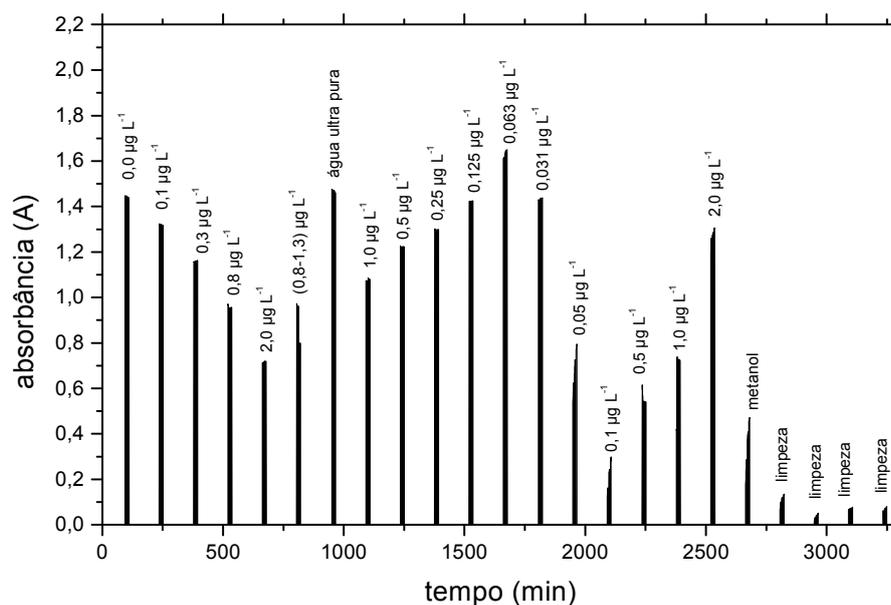


Figura 13. Registros referentes à determinação fotométrica de microcistina. A partir da esquerda, os primeiros cinco conjuntos de registros correspondem às soluções de referência do Kit Microcistina ELISA. Concentrações 0,0 ; 0,1; 0,3; 0,8 e 2,0 µg L⁻¹ Microcistina. O sexto conjunto corresponde ao padrão de controle que acompanha o Kit. Os registros do sétimo ao décimo terceiro correspondem às soluções de referências preparadas no laboratório diluindo com águas a solução estoque de 500 µg mL⁻¹. Os demais registros representam as mesmas soluções de referência preparadas em metanol.

Na Tabela 3 são mostrados valores em absorvância, onde se observa que a precisão é boa, principalmente considerando-se que as concentrações são muito baixas. Considerando-se que os registros obtidos com as soluções de referências preparadas em metanol, indicavam comportamento discrepante, os valores máximos não foram processados para obter uma curva analítica.

Tabela 3. Comparação dos resultados dos padrões preparados no laboratório e os obtidos com o Kit.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Absorbância ($A \pm SD$)	RSD (%)
Padrão kit 1	0,00	1,45 \pm 0,04	2,7
Padrão kit 2	0,10	1,32 \pm 0,03	2,2
Padrão kit 3	0,30	1,16 \pm 0,02	1,7
Padrão kit 4	0,80	0,96 \pm 0,01	1,0
Padrão kit 5	2,00	0,72 \pm 0,02	2,7
Padrão kit 6	controle (0,8-1,3)	0,95 \pm 0,02	2,1
Água Ultra Pura	Água (Branco)	1,47 \pm 0,00	0,0
Amostra 1	1,00	1,08 \pm 0,00	0,0
Amostra 2	0,50	1,22 \pm 0,00	0,0
Amostra 3	0,25	1,30 \pm 0,03	3,2
Amostra 4	0,13	1,42 \pm 0,02	1,4
Amostra 5	0,06	1,64 \pm 0,02	1,2
Amostra 6	0,03	1,43 \pm 0,03	2,1

SD = Desvio padrão referente à 3 determinações consecutivas.

RSD = Desvio padrão relativo.

Aplicando-se um processamento de regressão linear usando os valores de absorbância versus as respectivas concentrações de microcistina, encontramos as seguintes equações lineares:

$$Y_1 = -0,321X_1 + 0,615; R^2 = 0,9856$$

$$Y_2 = -0,291X_2 + 1,37; R^2 = 0,9988$$

Onde Y_1 e X_1 representam a absorbância e concentração de microcistina nas soluções de referência do Kit, respectivamente; e Y_2 e X_2 representam a absorbância e a concentração de microcistina nas soluções de referência preparadas no laboratório.

Estes dados indicam que poderíamos empregar essa solução estoque em trabalho de rotina. Entretanto, há dois obstáculos que devem ser considerados. A

imprevisibilidade do fornecedor, pois demorou mais de um ano para se efetivar a compra, e o segundo está relacionado ao acesso aos anticorpos, cuja disponibilidade comercial está vinculada à aquisição do Kit.

Visando verificar a estabilidade da solução estoque preparada, o mesmo experimento foi repetido no dia seguinte, obtendo os resultados mostrados no Figura 15. Comparando com os registros dessa figura com os da Figura 14, observa-se que são idênticos, portanto a solução estoque preparada no laboratório poderia ser usada em período mais longo.

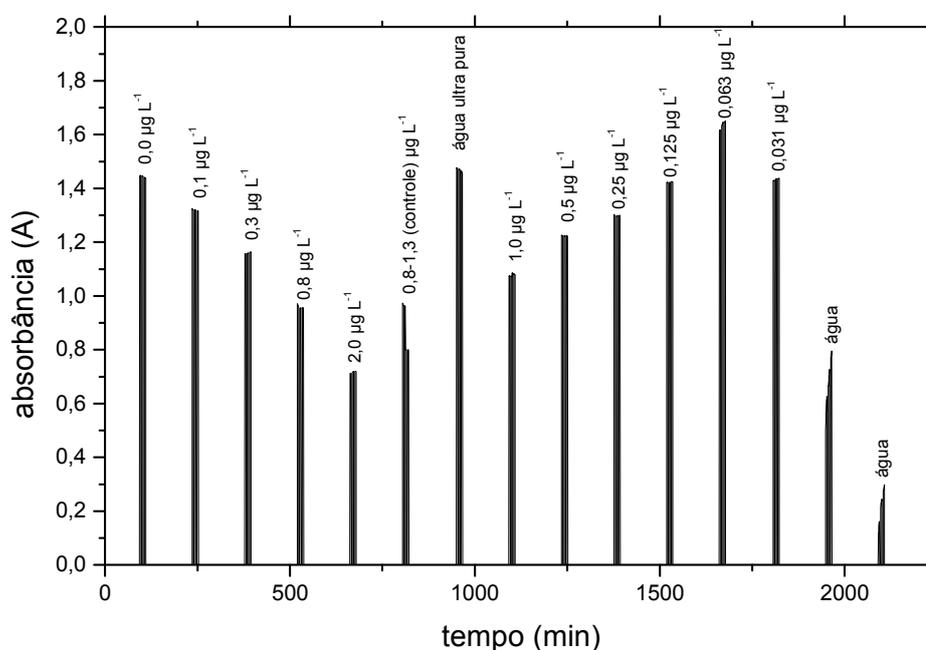


Figura 14. Registros referentes à determinação fotométrica de microcistina. As soluções de referência foram as mesmas usadas para obter os registros da Figura 14, e foram processadas na mesma ordem.

4.2 Estudo do efeito do fundo de escala

A intensidade do feixe de radiação emitido pelo LED aumenta com intensidade da corrente circulando através do circuito elétrico do LED. A diferença de potencial gerada pelo fotômetro é função da intensidade do feixe de radiação incidindo sobre a superfície ativa do fotodetector. Então, controlando a intensidade da corrente que drenava através do LED, poderíamos controlar a diferença de potencial gerada pelo fotômetro. Absorbância é uma grandeza relativa, dada pela equação $A = -\log(I/I_0)$, onde I_0 e I representam as intensidades do feixe de radiação eletromagnética antes e depois de atravessar o meio em estudo, respectivamente. Em um meio ideal, onde não haveria absorção ou espalhamento de radiação I seria igual I_0 .

Nos fotômetros desenvolvidos para este projeto, a diferença de potencial gerada era diretamente proporcional a intensidade de corrente aplicada ao LED, portanto a absorbância poderia ser calculada em função das diferenças de potenciais geradas pelo fotômetro. Do ponto de vista técnico era mais fácil determinar a diferença de potencial do que intensidade do feixe de radiação, ou a intensidade de corrente. Neste caso, a absorbância foi calculada empregando a Equação(1) descrita abaixo.

$$\text{Absorb} = -[\text{Log}(S_v - S_{v_0}) / (R_v - S_{v_0})] ; \text{Equação(1)}$$

Onde:

S_v = leitura com LED azul em mV;

R_v = leitura de referência em mV;

S_{v_0} = leitura no escuro, realizada com o LED apagado.

Segundo esta equação, o valor da absorbância não depende do valor inicial do fundo de escala (S_{v_0}), entretanto não saberíamos se a resposta dos dispositivos eletrônicos dependeriam da intensidade do inicial do feixe de radiação. As interfaces eletrônicas mostradas nas Figuras 6 e 7 permitem variar a intensidade de emissão dos LEDs, variando a intensidade de corrente drenava através de sua malha de alimentação, então este recurso foi empregado para gerar três fundos de escala. Os experimentos foram realizados instruindo o software para ler cada solução nos 3

fundos de escala previamente estabelecidos e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos variando do fundo de escala do fotômetro da Oriel.

Fundo de Escala	Equação linear	R ²	LD (µgL ⁻¹)
Curva analítica com 5 pontos: 0; 0,1; 0,3; 0,8 e 2,0 (µgL⁻¹)			
(1200) mV	y = 997,18 - 72,09x	0,9860	0,19
(1200) abs	y = 0,79 - 0,12x	0,9686	0,27
(1950) mV	y = 1726,85 - 22,87x	0,9858	0,17
(1950) abs	y = 0,79 - 0,12x	0,9685	0,24
(2980) mV	y = 2537,56 - 130,48x	0,9401	0,23
(2980) abs	y = 0,79 - 0,12x	0,9689	0,23
Curva analítica com 4 pontos: 0; 0,1; 0,3 e 0,8 (µgL⁻¹)			
(1200) mV	y = 1002,44 - 93,63x	0,9720	0,15
(1200) abs	y = 0,80 - 0,18x	0,9627	0,18
(1950) mV	y = 1735,27 - 158,83x	0,9718	0,13
(1950) abs	y = 0,80 - 0,18x	0,9621	0,16
(2980) mV	y = 2563,03 - 234,82x	0,9724	0,13
(2980) abs	y = 0,80-0,18x	0,9630	0,15
Curva analítica com 3 pontos 0; 0,1; e 0,3 (µgL⁻¹)			
(1200) mV	y = 1008,56 - 149,21x	0,9859	0,09
(1200) abs	y = 0,82 - 0,31x	0,9887	0,11
(1950) mV	y = 1745,95 - 255,84x	0,9898	0,08
(1950) abs	y = 0,82 - 0,31x	0,9899	0,09
(2980) mV	y = 2578,34 - 374,06x	0,9868	0,08
(2980) abs	y = 0,82 - 0,31x	0,9895	0,09

LD = limite de detecção

R² = coeficiente de correlação linear

Os resultados obtidos em experimento anterior (Tabela 4) mostraram que o método empregado não obedece a lei de Lambert-Beer. Para as medições feitas com o equipamento ELISA, obteve-se coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,9856$ e para o fotômetro da Oriel $R^2 = 0,9988$. Observa-se que os dados da tabela acima estão na mesma ordem. Tendo em vista que a resposta não perfeitamente linear, investigou-se as curvas de regressão obtidas para 5, 4 e 3 pontos. Observa-se uma melhoria significativa nos limites de detecção quando a curva analítica foi tomada considerando as 3 soluções de referência de menor concentração. Observa-se também, que este efeito foi independente do fundo de escala escolhido. Esta é uma informação de suma importância, pois indica que a resposta do equipamento de detecção não depende do fundo de escala estabelecido. Igualmente importante é que o limite de detecção estimado é 10 vezes menor do que a concentração mínima de microcistina estabelecida pela ANVISA para águas servidas para consumo (BRASIL, 2001).

4.3 Efeito do tempo de processamento da amostra para leitura

Conforme indicado na parte experimental, o preparo das amostras para a determinação de microcistina envolve várias etapas, sendo que a etapa final inclui a adição de uma solução ácida à amostra para interromper a reação. A partir desse instante era necessário verificar se os valores de leitura permaneciam estáveis. Então, um lote de amostras foi preparado e as leituras da absorção foram efetivadas em duas etapas com intervalo de tempo de 3 horas entre eles. Analisando os resultados mostrados na Tabela 5, observa-se que ocorreu um decréscimo em média entre 5 e 10 %, portanto o tempo de leitura após o preparo da amostra é um parâmetro que não pode ser desprezado, embora não seja crítico. Este fato alivia a pressão sobre o operador, pois podemos imaginar que atrasos da ordem de 10 ou 20 minutos não terá efeito significativo sobre a exatidão dos resultados.

Tabela 5. Valores de absorvância das amostras analisadas na leitora Elisa e no fotômetro, em um período de 3 horas.

1ºtira	Abs.	2ºtira	Abs.	3ºtira	Abs.
am. 1	1,010	am. 9	1,065	am. 17	0,894
am. 2	1,082	am. 10	1,013	am. 18	0,989
am. 3	1,164	am. 11	1,152	am. 19	1,099
am. 4	1,155	am. 12	1,144	am. 20	1,116
am. 5	1,131	am. 13	0,573	am. 21	0,322
am. 6	1,196	am. 14	0,591	am. 22	0,319
am. 7	1,166	am. 15	1,104	am. 23	0,330
am. 8	1,145	am. 16	1,140	am. 24	0,323

Após 3 horas

1ºtira	Abs.	2ºtira	Abs.	3ºtira	Abs.
am. 1	1,000	am. 9	1,023	am. 17	0,816
am. 2	1,067	am. 10	0,969	am. 18	0,896
am. 3	1,134	am. 11	1,084	am. 19	1,002
am. 4	1,126	am. 12	1,088	am. 20	1,004
am. 5	1,100	am. 13	0,534	am. 21	0,310
am. 6	1,158	am. 14	0,546	am. 22	0,303
am. 7	1,128	am. 15	1,038	am. 23	0,298
am. 8	1,122	am. 16	1,058	am. 24	0,318

4.4 Comparação dos fotômetros

Visando comparar o desempenho do fotômetro desenvolvido no laboratório com o da Oriel, dois conjuntos de soluções de referência iguais foram processadas com os dois instrumentos, empregando o módulo de análise com os mesmos parâmetros descritos na Tabela 2. Observa-se nesta figura que há uma diferença significativa entre os máximos dos registros relacionados à detecção do branco e da solução de referência com a concentração de $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistina. Este resultado indica que o sistema tem sensibilidade para determinação de concentrações de microcistina com valor menor do que $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$.

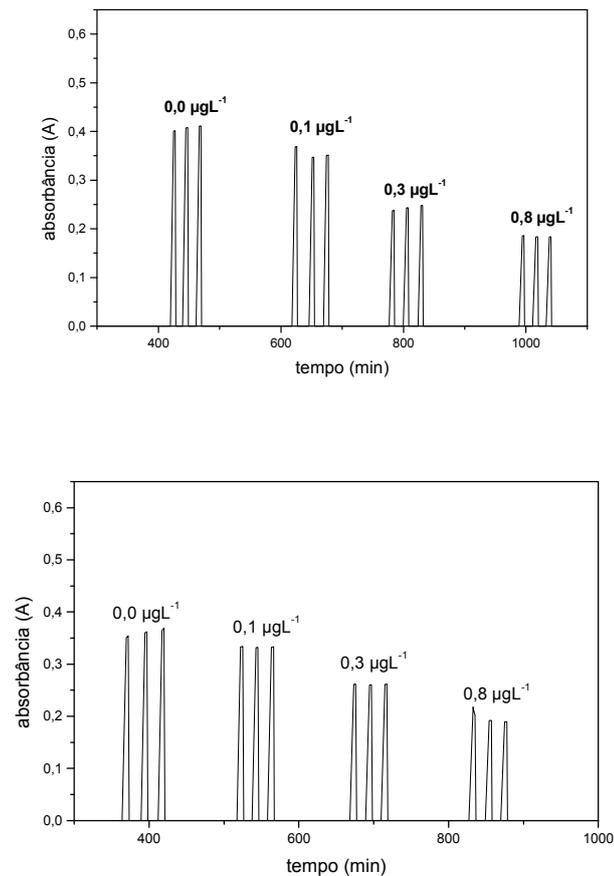


Figura 15. Resposta dos fotômetros. Os registros da primeira figura obtidos com o fotômetro da Oriel e os da segunda com o fotômetro do laboratório. Os números sobre os registros são as concentrações de microcistina.

Tabela 6. Performance dos fotodetectores.

Fotômetro da Oriel		Limite de detecção (μgL^{-1})
$Y_1 = 0,4095 - 0,533X$	$R^2 = 0,9989$	0,04
$Y_2 = 0,3804 - 0,2688X$	$R^2 = 0,9381$	0,08
Fotômetro do laboratório		Limite de detecção (μgL^{-1})
$Y_1 = 0,3689 - 0,357X$	$R^2 = 1$	0,02
$Y_2 = 0,3535 - 0,2169X$	$R^2 = 0,9720$	0,03

Analisando os dados da Tabela 6, verifica-se que os limites de detecção estimados para o fotômetro do laboratório são melhores que os obtidos para o da Oriel. Os coeficientes de regressão linear são melhores, mas devemos levar em conta as soluções de referências não foram as mesmas. Entretanto, o melhor limite de detecção é um indicador de que o fotômetro desenvolvido no laboratório tem um baixo nível de ruído.

4.5 Análises das amostras

Foram analisadas amostras coletadas no Rio Piracicaba e nas Lagoas da ESALQ/USP. As análises foram feitas com as replicatas coletadas em cada ponto. A temperatura e o pH de cada amostra foram medidos no momento da coleta. O valor do pH variou entre 6,41 a 7,66 e a temperatura entre 23,2 a 24,2 °C.

Análises de amostras coletadas em um sítio de propriedade particular foram realizadas seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Medidas como temperatura e pH foram realizadas no momento da coleta, onde o pH variou entre 5,20 a 7,20 e a temperatura registrada foi de 24°C. Amostras do rio Corumbataí na região do bairro Guamium, também foram coletadas em diversos pontos. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação de microcistina em águas.

Amostra	Elisa (μgL^{-1})	Fotômetro - Abs (μgL^{-1})	Fotômetro - mV (μgL^{-1})
padrão 1	0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
padrão 2	0,10	0,10 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01
padrão 3	0,30	0,32 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01
padrão 4	0,80	0,80 \pm 0,03	0,85 \pm 0,01
padrão 5	2,00	1,95 \pm 0,06	1,98 \pm 0,09
controle 6	0,71	0,73 \pm 0,02	0,74 \pm 0,01
amostra 1	0,00	0,08 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
amostra 2	0,08	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
amostra 3	0,17	0,19 \pm 0,02	0,19 \pm 0,00
amostra 4	0,20	0,24 \pm 0,00	0,23 \pm 0,00
amostra 5	1,54	1,46 \pm 0,05	1,60 \pm 0,05
amostra 6	0,00	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00
amostra 7	1,20	0,88 \pm 0,02	0,89 \pm 0,00
amostra 8	0,11	0,19 \pm 0,02	0,18 \pm 0,00
amostra 9	0,20	0,24 \pm 0,00	0,24 \pm 0,01
amostra 10	0,08	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00

SD = desvio padrão referente a 3 replicatas

Tabela 8. Comparação das características analíticas do sistema com detector da Oriel para a determinação de microcistina em águas. Curva analítica com 4 pontos.

Parâmetros	Elisa	Fotômetro - Abs	Fotômetro - mV
Resposta linear	$y = 0,525 - 0,434X$	$y = 0,404 - 0,191X$	$y = 2020,7 - 818,97X$
Concentração (μgL^{-1})	0,1 - 0,8	0,1 - 0,8	0,1-0,8
Coeficiente de correlação (R^2)	0,9783	0,9986	0,9998
LD (μgL^{-1})		0,04	0,005

LD = limite de detecção e SD = desvio padrão para $n=3$

Observa-se que a correlação linear obtida com os dados do fotômetro da Oriel foi melhor que a obtida com os do detector ELISA. Estes dados foram obtidos com um fundo de escala de 3000 mV. Então, comparando-os com os dados da Tabela 6 para este fundo de escala, observa-se que houve ganho significativo no limite de detecção estimado.

4.6 Emprego do fotômetro montado no laboratório

Os resultados apresentados foram obtidos empregando o fotômetro da Oriel, o qual apresentou bom desempenho. Trata-se de um equipamento comercial, portanto era esperado que tivesse uma boa resposta. Conforme mostrado na parte experimental (Figura 4), foi desenvolvido um fotômetro empregando fotodiodo e amplificador operacional. Este equipamento foi desenvolvido tendo objetivo obter um sistema de baixo custo e bom desempenho, e também adquirir experiência no desenvolvimento de instrumento de detecção de alta sensibilidade.

O fotômetro foi utilizado para realizar os experimentos com o mesmo LED, a mesma cela de fluxo e o mesmo módulo de análise empregado com o fotômetro da Oriel. Os resultados obtidos empregando este equipamento são mostrados na

Tabela 9, onde observa-se que não há diferença significativa com os obtidos com o equipamento ELISA.

Tabela 9. Resultado das análises das amostras águas para determinação de microcistina empregando o fotômetro desenvolvido no laboratório.

Amostra	Elisa (μgL^{-1})	Fotômetro - Abs (μgL^{-1})	Fotômetro - mV (μgL^{-1})
padrão 1	0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
padrão 2	0,10	0,10 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00
padrão 3	0,30	0,29 \pm 0,00	0,30 \pm 0,00
padrão 4	0,80	0,81 \pm 0,03	0,76 \pm 0,01
padrão 5	2,00	2,03 \pm 0,01	2,01 \pm 0,02
controle 6	1,04	1,1 \pm 0,01	0,96 \pm 0,00
amostra 1	0,04	0,10 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01
amostra 2	0,14	0,14 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00
amostra 3	0,09	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00
amostra 4	0,07	0,08 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00
amostra 5	0,07	0,09 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
amostra 6	0,10	0,10 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00
amostra 7	0,13	0,11 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
amostra 8	0,06	0,09 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00
amostra 9	0,26	0,24 \pm 0,00	0,24 \pm 0,00
amostra 10	0,15	0,17 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00

SD = desvio padrão referente a 3 replicatas

Comparando os dados da Tabela 7 e 9, verifica-se que o desempenho do fotômetro proposto é idêntico ao do fotômetro da Oriel. O equipamento da Oriel custou US\$ 1.200,00 há 7 anos enquanto que no fotômetro proposto os componentes importados são fotodetector e o amplificador de instrumentação, os quais custaram há 4 anos US\$ 22,00 e US\$ 32,00, respectivamente. Este último tem

um custo muito menor e um desempenho semelhante ao importado, isso indica que equipamento de alto desempenho pode ser desenvolvido no laboratório de química analítica. A comparação estatística dos resultados mostrados através do test-t pareado, indicaram que os mesmos não apresentam diferença significativa em um nível de confiança de 95%.

Tabela 10. Características analíticas do sistema com fotômetro montado no laboratório.

Parâmetros	Elisa	Fotômetro - Abs	Fotômetro - mV
Equação linear	$y = 0,4233 - 0,2748x$	$y = 0,369 - 0,364x$	$y = 1983,81 - 433,4x$
Coeficiente de correlação R^2	0,9693	0,9988	1
LD (μgL^{-1})		0,01	0,002

LD = limite de detecção e SD = desvio padrão para $n=3$

O máximo de absorvância do composto é 450 nm e tem uma largura de banda da ordem de 30 nm. O LED empregado tem máximo de emissão em 458 nm e uma largura de banda de 25 nm, portanto há uma boa abrangência entre as bandas de emissão do LED e de absorção do composto. Os resultados obtidos demonstram que esta fonte de radiação é apropriada para determinação de microcistina em águas. O emprego de um LED de alto brilho (10000 mcd) com feixe de emissão em ângulo estreito (15°) permitiu o emprego de uma cela de fluxo com caminho óptico de 40 mm. Os limites de detecção estimados com os dois equipamentos permitem o emprego para o monitoramento de microcistina em águas para consumo, onde segundo a resolução da ANVISA o limite máximo é $1 \mu\text{gL}^{-1}$. Os limites de detecção mostrados nas Tabelas 8 e 10 indicam também que os dois instrumentos podem ser usados para o monitoramento de águas para hemodiálise, onde segundo a ANVISA, a microcistina deve estar ausente, portanto é necessário dispor de equipamentos de alta sensibilidade.

O desempenho em termos de baixo limite de detecção em boa parte pode ser atribuído à geometria da cela de fluxo mostrada na Figura 3, a qual foi desenvolvida para este projeto. O emprego dos cilindros de vidro como guia de onda para levar feixe de radiação do LED à solução dentro da cela de fluxo e desta até o foto

detector, é um fator de inovação ainda não explorado. Teve como vantagem minimizar perda de radiação por espalhamento, efeito observado quando é usada celas de fluxo feitas com tubos de vidro.

Conforme indicado na Tabela 2, entre o processamento de cada amostra, a cela de fluxo era esvaziada, aspirando ar através dela. Esta estratégia tinha como objetivo evitar a diluição da amostra, que ocorreria se a cela estivesse cheia com água como ocorre em sistemas FIA usuais. O volume da amostra era 200 μL , portanto não poderia ser usado para lavar a cela de fluxo. A implementação desta estratégia permitiu que mesmo com um volume de amostra tão pequeno, a detecção fosse efetuada com 3 replicadas. A cela de fluxo foi montada na posição vertical, e as extremidades do canal interno do tubo de vidro foram alargadas para 2 mm, visando facilitar a liberação das bolhas de ar. Com esta geometria, as bolhas de ar eram facilmente aspiradas para fora. Com isso, o esvaziamento da cela entre o processamento das amostras pode ser implementado sem transtornos causados pelas bolhas.

Tendo em vista que micro bolhas de ar poderiam ficar retidas na cela de fluxo, foi instalado o LED de infravermelho ($\lambda = 850 \text{ nm}$), visando usar o recurso de leitura em dois comprimentos de onda para corrigir a variação causada pelas bolhas (ZAGATTO et al., 1990). Dessa forma, na execução da etapa de leitura, o computador ligava seqüencialmente os dois LEDs e fazia as respectivas leituras. Analisando os dados verificou-se que não havia diferenças significativa entre eles, indicando que não ocorreu retenção de bolhas na cela de fluxo. Então, os dados referentes a essa correção não foram utilizados.

Como propulsor de fluido foi empregado uma bomba de seringa desenvolvida para este projeto. Conforme indicado na parte experimental, o ângulo de rotação do motor por passo era de 7,5 graus, portanto eram necessários 48 passos para completar uma volta. O deslocamento da seringa era de 1,0 mm por volta, e o volume deslocado, determinado por pesagem, era de 17,6 μL . Esta característica do propulsor de fluido, facilitava a manipulação de pequenos volumes de amostra. Esta facilidade foi explorada para conseguir a inserção de 3 replicadas da amostra. O tubo que conduzia a amostra do recipiente (poço) até a entrada da cela de fluxo tinha um volume de 20 μL . O volume da cela de fluxo era 32 μL . Na Tabela 2 está indicado que na primeira etapa de amostragem (etapa 8) era aspirado 117,6 μL .

Este volume garantia o completo enchimento da cela de fluxo. Nas etapas seguintes (10 e 12) era aspirado 29,4 μL em cada caso. Observa-se que no total era utilizado 178,4 μL da solução de referência ou da amostra.

5. CONCLUSÃO

O sistema de determinação proposto apresentou ótimo desempenho permitindo alcançar limite de detecção abaixo do valor estabelecido pela ANVISA para microcistina em águas potáveis.

O emprego da bomba de seringa em sistema baseado em multicomutação mostrou que este dispositivo é viável, o que agrega valor ao trabalho, pois é um dispositivo de baixo custo e alto desempenho como propulsor de fluido.

O fotômetro desenvolvido no laboratório apresentou sensibilidade suficiente para atender as exigências do Ministério da Saúde, que estabelece em $1 \mu\text{gL}^{-1}$ a concentração máxima de microcistina em águas para consumo.

A cela de fluxo com caminho óptico de 40 mm e volume interno de 32 μL foi um dispositivo chave para alcançar a sensibilidade necessária para atender os objetivos do projeto.

Pela primeira vez em sistemas de análise química em fluxo foi empregado o procedimento de esvaziamento da cela de fluxo entre as amostras. A geometria da cela permitiu que esta etapa foi executada sem a retenção de bolhas no caminho óptico, o que comprometeria os resultados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.M.N.V.; ARAUJO, M.C.U.; LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Precipitation titrations using an automatic titrator based on a multicommutated unsegmented flow system. **Analyst**, Cambridge, v.125, n.2, p.333-340, 2000.
- ARAÚJO, A.N.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Multicommutation in flow-analysis. 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.310, n.3, p.447-452, 1995.
- AVERSANO, C.D.; EAGLESHAM, G.K.; QUILLIAM, M.A.J. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1028, p.155-164, 2004.
- 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**, Amsterdam, v.181/182, p.441-446, 2002.
- BEACON ANALYTICAL SYSTEMS INC. **Kit Microcistina Placa**. Portland.
- BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J.X.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Solvent-extraction in continuous-flow injection analysis. Determination of molybdenum in plant material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.101, n.1, p.9-16, 1978a.
- BERGAMIN FILHO, H.; REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; ZAGATTO, E.A.G. Ion-exchange in flow-injection analysis. Determination of Ammonium-Ions at the $\mu\text{g L}^{-1}$ level in Natural-Waters with Pulsed Nessler Reagent. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.117, p.81-89, 1980.
- BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; REIS, B.F. Merging zones in flow injection analysis. Part 1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.101, n.1, p.17-23, 1978b.
- BERGAMIN, H.; KRUG, F.J.; REIS, B.F.; NOBREGA, J.A.; MESQUITA, M.; SOUZA, I.G. Online electrolytic dissolution of alloys in flow-injection analysis. 2. Spectrophotometric determination of molybdenum in steels. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.214, n.1-2, p.397-400, 1988.
- BORGES, E.P.; MARTELLI, P.B.; REIS, B.F. Automatic stepwise potentiometric titration in a monosegmented flow system. **Mikrochimica Acta**, Wien, v.135, n.3-4, p. 179-184, 2000.
- BORGES, S.S.; FRIZZARIN, R.M.; REIS, B.F. An automatic flow injection analysis procedure for photometric determination of ethanol in red wine without using a chromogenic reagent. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.385, n.1, p.197-202, 2006.

BOYLESTAD, R.L.; NASHELSKY, L. **Electronic devices and circuit theory**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1972. 794 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 518, 25 de março 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos 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, 26 mar. 2004. p.266-270.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469, 29 dezembro 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos 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, 19 jan. 2001. p.18-22.

CARLILE, P.R. **Further studies to investigate Microcystin-LR and Anatoxin-A removal from water**. Buckinghamshire: Foundation for Water Research, 1994. 44p. (FWR Reports, FR0458). Disponível em: <http://www.atlas.c...listons/fr0458.htm>, Acesso em: Abril, 1994.

CARMICHAEL, W.W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria, "The CyanoHabs". **Human and Ecological Risk Assessment**, Oxford, v.7, p.1393-1407, 2001.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v.270, p.78, 1994.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGELSHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.109, n.7, p.663-668, 2001.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.R.; GORHAM, P.R.; HARADA, K.I.; YU, M.J.; KRISHNAMURTHY, T.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.L.; RUNNEGAR, M.T.C.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, Oxford, v.26, p.971-973, 1988.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water**. A Guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon, 1999. 416p.

CLINCH, J.R.; WORSFOLD, P.J.; CASEY, H. An automated spectrophotometric field-monitor for water-quality parameters – determination of nitrate. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.200, n.1, p.523-531, 1987.

COMITRE, A.L.D.; REIS, B.F. Automatic flow procedure based on multicommutation exploiting liquid-liquid extraction for spectrophotometric lead determination in plant material. **Talanta**, London, v.65, n.4, p.846-852, 2005.

COMITRE, A.L.D.; REIS, B.F. Automatic multicommutated flow system for ethanol determination in alcoholic beverages by spectrophotometry. **Laboratory Robotics and Automation**, New York, v.12, n.1, p.31-36, 2000.

COMITRE, A.L.D.; REIS, B.F. Liquid-liquid extraction procedure exploiting multicommutation in flow system for the determination of molybdenum in plants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.479, n.2, p.185-190, 2003.

DASGUPTA, P.K.; BELLAMY, H.S.; LIU, H.H.; LOPEZ, J.L.; LOREE, E.L.; MORRIS, K.; PETERSEN, K.; MIR, K.A. Light-emitting diode based flow-through optical-absorption detectors. **Talanta**, London, v.40, n.1, p.53-74, 1993.

DAYKIN, R.N.C.; HASWELL, S.J. Development of a micro flow-injection manifold for the determination of orthophosphate. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.313, n.3, p.155-159, 1995.

DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.; CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, New York, v.163, p.113-186, 2000.

FACCHIN, I.; MARTINS, J.W.; ZAMORA, P.G.P.; PASQUINI, C. Single-phase liquid-liquid extraction on monosegmented continuous-flow systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.285, n.3, p.287-292, 1994.

FALCONER, I.R. Algal toxins and human health. In: HRUBEC, J. (Ed.). **The handbook of environmental chemistry**. Part C. Quality and treatment of drinking water II. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998, v.5, p.53-82.

FERES, M.A.; REIS, B.F. A downsized flow set up based on multicommutation for the sequential photometric determination of iron (II)/iron (III) and nitrite in surface water. **Talanta**, London, v.68, n.2, p.422-428, 2005.

FERNANDES, E.N.; DE CAMPOS MOURA, M.N.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F. Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry. **Microchemical Journal**, New York, v.77, n.2, p.107-112, 2004.

FERNANDES, E.N.; REIS, B.F. Automatic flow procedure for the determination of ethanol in wine exploiting multicommutation and enzymatic reaction with detection by chemiluminescence. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.87, n.4, p.920-926, 2004.

FERNANDES, E.N.; REIS, B.F. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.557, n.1-2, p.380-386, 2006.

FERNANDES, R.N.; REIS, B.F. Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of

ammonium and *ortho-fosfato* in natural water. **Talanta**, London, v.58, n.4, p.729-737, 2002.

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.S.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v.72, n.2, p.479-489, 2008.

FIGLIORE, M.F.; ETCHEGARAY, A.; LORENZI, A.S.; SILVA, C.S.P. Monitoramento de cianobactérias produtoras de toxinas através de métodos moleculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA FICOLOGIA, 2005, Salvador-BA. **Formação ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2005. p.33-56.

GABRIEL, D.; BAEZA, J.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.359, n.1-2, p.173-183, 1998.

GINÉ, M.F.; BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.114, p.191-197, 1980.

GINÉ, M.F.; PACKER, A.P.; BLANCO, T.; REIS, B.F. Flow system based on a binary sampling process for automatic dilutions prior to flame atomic spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.323, p.47-53, 1996.

GINÉ, M.F.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; JACINTHO, A.O. A simple procedure for standard additions in flow-injection analysis-spectrophotometric determination of nitrate in plant-extracts. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.155, p.131-138, 1983.

GRACH-POGREBINSKY, O.; SEDMAK, B.; CARMELI, S. Seco [D-Asp]microcystin-RR and [D-Asp³] microcystin-RR and [D-Asp³, D-Glu(OMe)⁶] microcystin-RR, two new microcystins from a toxic water bloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v.67, n.3, p. 337-342, 2004.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6^oed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2005. 876p.

HIROOKA, E.Y.; PINOTTI, M.H.P.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. **Natural Toxins**, New York, v.7, p.103-109, 1999.

HITZFELD, B.C.; HOGGER, S.J.; DIETRICH, D.R. Cyanobacterial toxins, removal during drinking water treatment, and human risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.108, p.113-122, 2000.

HUANG, J.; LIU, H.; TAN, A.; XU, J.; ZHAO, X. A dual wavelength light-emitting diode based detector for flow-injection analysis process analysers. **Talanta**, London, v.39, n.6, p.589-592, 1992.

ISMAIL, N.; BECKER, B.; HAKIM, R.M. Water treatment for hemodialysis. **American Journal of Nephrology**, Basel, v.16, p.60-72, 1996.

JACINTHO, A.O.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN, H.; KRUG, F.J.; REIS, B.F.; BRUNS, R.E.; KOWALSKI, B.R. Flow-injection systems with inductively-coupled argon plasma atomic emission-spectrometry. 1. Fundamental considerations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.130, n.2, p. 243-255, 1981.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; An, J.; CARDO, D.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.338, n.13, p.873-878, 1998.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.35, p.1-9, 2001.

KALBERG, B.; PACEY, G.E. **Flow injection analysis: a practical guide**. Amsterdam: Elsevier, 1989. (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, 10).

KORN, M.; GOUVEIA, L.F.B.P.; DE OLIVEIRA, E.; REIS, B.F. Binary search in flow titration employing photometric end-point detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.313, n.3, p.177-187, 1995.

KORN, M.; PAIM, A.P.S.; BARROS, V.A.F.; REIS, B.F. Development of software to perform data acquisition and processing in routine analysis employing flow injection analysis. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.3, p.302-306, 1996.

KRONKA, E.A.M.; REIS, B.F. Spectrophotometric determination of iron and aluminum in plant digests employing binary sampling in flow analysis. **Química Analítica**, São Paulo, v.17, n.1, p.15-20, 1998.

KRONKA, E.A.M.; REIS, B.F.; KORN, M.; BERGAMIN FILHO, H. Multicommutation in flow analysis. Part 5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.334, n.3, p.287-293, 1996.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.R.; FITZGERALD, D.J. (1999). Human health aspects. 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.114-153.

LAVORANTE, A.F.; FERES, M.A.; REIS, B.F. Multi-commutation in flow analysis: A versatile tool for the development of the automatic analytical procedure focused on the reduction of reagent consumption. **Spectroscopy Letters**, London, v.39, n.6, p.631-650, 2006.

LAWTON, L.A.; ROBERTSON, P.K.J.; CORNISH, B.J.P.A.; MARR, I.L.; JASPARS, M. Processes influencing surface interaction and photocatalytic destruction of microcystins on titanium dioxide photocatalysts. **Journal of Catalysis**, New York, v.213, p.109-113, 2003.

LEMES, G.A.F.; YUNES, J.S. O ambiente e as cianobactérias. **Ecos**, Carreiros, v.25, p.9-11, 2006.

LINDNER, P.; MOLZ, R.; YACOUB-GEORGE, E.; DÜRKOP, A.; WOLF, H. Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.521, p.37-44, 2004.

LUCA, G.C.; REIS, B.F. Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to carried out on line dilution and reagents solutions handling. **Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v.60, n.3, p.579-583, 2004.

MAGALHÃES, V.F.; De SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil), ecological implication and human health risk. **Toxicon**, Oxford, v.39, p.1077-1085, 2001.

MARTELLI P.B.; REIS, B.F.; ARAUJO, A.N.; CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO, B.S.M. A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt. **Talanta**, London, v.54, n.5, p.879-855, 2001.

MARTELLI, P.B.; REIS, B.F.; KORN, M.; LIMA, J.L.F.C. Automatic potentiometric titration in monosegmented flow system exploiting binary search. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.387, n.2, p.165-173, 1999.

MARTELLI, P.B.; REIS, B.F.; KORN, M.; RUFINI, I.A. The use of ion exchange resin for reagent immobilization and concentration in flow systems. Determination of nickel in steel alloys and iron speciation in waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.8, n.5, p.479-485, 1997.

MERILUOTO, J. Chromatography of microcystins. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.352, p.277-298, 1997.

MERILUOTO, J.; CODD, G.A. (Ed.). **TOXIC**: cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Abo, Finland: Abo Akademi University Press, 2005.

MICHALOWSKI, J.; KOJLO, A.; TROJANOWICK, M.; SZOSTEK, B.; ZAGATTO, E.A.G. Simultaneous determination of sucrose and reducing sugars using indirect flow-injection biamperometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.271, n.2, p.239-246, 1993.

MOREDA-PINEIRO J.; CERVERA, M.L.; DE LA GUARDIA M. Direct determination of arsenic in sea-water by continuous-flow hydride generation atomic fluorescence

spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v.12, n.12, p.1377-1380, 1997.

MORENO, I.; REPETTO, G.; CAMEÁN A. Interés toxicológico de las microcistinas. **Revista de Toxicología**, Pamplona, v.20, p.159-165, 2003.

MURAKI, H.; HIGUCHI, K.; SASAKI, M.; KORENAGA, T.; TÔEI, K. Fully automated system for the continuous monitoring of ammonium ion in fish farming plant sea water by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.261, n.1-2, p.345-349, 1992.

NICHOLSON, B.C.; BURCH, M.D. **Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines**. Canberra: Commonwealth of Australia, 2001. 64p.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.118, p.420-424, 1992.

OHTA, T.; SUEOKA, E.; IIDA, N.; KOMORI, A.; SUGANUMA, M.; NISHIWAKI, R.; TATEMATSU, M.; KIM, S.J.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. **Cancer Research**, Baltimore, v.54, p.6402-6406, 1994.

PAIM, A.P.S.; KRONKA, E.A.M.; REIS, B.F.; KORN, M. Spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs employing binary sampling in flow system. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.1, p.47-50, 1998.

PAIM, A.P.S.; REIS, B.F. An automatic spectrophotometric titration procedure for ascorbic acid determination in fruit juices and soft drinks based on volumetric fraction variation. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.16, n.5, p.487-491, 2000.

PIRES, C.K.; MARTELLI, P.B.; REIS, B.F.; LIMA, J.L.F.C.; SARAIVA, M.L.M.F.S. An automatic flow procedure for the determination of 3-hydroxybutyrate in animal serum and plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.9, p.2457-2460, 2003a.

PIRES, C.K.; MARTELLI, P.B.; REIS, B.F.; LIMA, J.L.F.C.; SARAIVA, M.L.M.F.S. Multicommutated flow system for the determination of glucose in animal blood serum exploiting enzymatic reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Automated Methods & Management in Chemistry**, Nasr City, Cairo, v.25, n.5, p.109-114, 2003b.

PIRES, C.K.; REIS, B.F.; GALHARDO C.X.; MARTELLI, P.B. A multicommutated flow procedure for the determination of cholesterol in animal blood serum by chemiluminescence. **Analytical Letters**, New York, v.36, n.14, p.3011-3024, 2003c.

PITOIS, S.; JACKSON, M.H.; WOOD, B.J.B. Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters. **International Journal of Environmental Health Research**, London, v.10, p.203-218, 2000.

PITOIS, S.; JACKSON, M.H.; WOOD, B.J.B. Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae, an overview. **Journal of Environmental Health**, Denver, v.64, p.25-32, 2001.

RAO, P.V.L.; GUPTA, N.; BHASKAR, A.S.B.; JAYARAJ, R. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. **Journal of Environmental Biology**, New Delhi, v.23, p.215-224, 2002.

RAPALA, J.; ERKOMAA, K.; KUKKONEN, J.; SIVONEN, K.; LAHTI, K. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison of methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 466, p.213-231, 2002.

REIS, B.F.; ARRUDA, M.A.Z.; ZAGATTO E.A.G.; FERREIRA, J.R. An improved monosegmented continuous-flow system for sample introduction in flame atomic spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.206, n.1-2, p.253-262, 1988.

REIS, B.F.; BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J. Merging zones in flow injection analysis. 3. Spectrophotometric determination of aluminum in plant and soil materials with sequential addition of pulsed reagents. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.107, p.309-317, 1979.

REIS, B.F.; GINE, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A. Multicommutation in flow-analysis. 1. Binary sampling-concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.293, n.1-2, p.129-138, 1994.

REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; KRUG, F.J.; BERGAMIN, H. Merging zones in flow-injection analysis. 4. Simultaneous spectrophotometric determination of total nitrogen and phosphorus in plant-material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.119, n.2, p.305-311, 1980.

ROCHA, F.R.P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A.S.; SANTOS, J.L.M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications, and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.468, n.1, p.119-131, 2002.

RODENAS-TORRALBA E.; ROCHA F.R.P.; REIS B.F.; MORALES-RUBIO A.; DE LA GUARDIA M. Evaluation of a multicommutated flow system for photometric environmental measurements. **Journal of Automated Methods & Management In Chemistry**, Nasr City, Cairo, art. n° 20384, 2006.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.78, n.1, p.145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H.; MOSBAEK, H; KRUG, F.J. Exchange of comments-pumping pressure and reagent consumption in flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.49, n.12, p.1858-1861, 1977.

SHEN, P.P.; SHI, Q.; HUA, Z.C.; KONG, F.X.; WANG, Z.G.; ZHUANG, S.X.; CHEN, D.C. Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. **Environment International**, New York, v.29, p.641-647, 2003.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxin. 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.41-111.

SMIDERLE, M.; REIS, B.F.; ROCHA, F.R.P. Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.386, n.1-2, p.129-135, 1999.

TOKARS, J.I.; ALTER, M.J.; MILLER, E.; MOYER, L.A.; FAVERO, M.S. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States - 1994. **ASAIO Journal**, Lippincott, v.43, n.1, p.108-119, 1997.

TROJANOWICZ M.; WORSFOLD, P.J.; CLINCH, J.R. Solid-state photometric detectors for flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.7, n.8, p.301-305, 1988.

TROJANOWICZ, M.; SZPUNARLOBINSKA, J.; MICHALSKI, Z. Multicomponent analysis with a computerized flow-injection system using led photometric detection. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v.1, n.3-4, p.159-169, 1991.

TUMANG, C.A.; BORGES, E.P.; REIS, B.F. Multicommutation flow system for spectrophotometric L (+) lactate determination in silage material using an enzymatic reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.438, n.1-2, p.59-65, 2001.

TUMANG, C.A.; PAIM, A.P.S.; REIS, B.F. Automatic flow system titration based on multicommutation for spectrophotometric determination of total acidity in silage extracts. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.85, n.2, p.328-332, 2002.

TUMANG, C.D.; DE LUCA, G.C.; FERNANDES, R.N.; REIS, B.F.; KRUG, F.J. Multicommutation in flow analysis exploiting a multizone trapping approach spectrophotometric determination of boron in plants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.374, n.1, p.53-59, 1998.

TYAGI, M.B.; THAKUR, J.K.; SINGH, D.P.; KUMAR, A. et al. Cyanobacterial toxins, the current status. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v.9, p.9-21, 1999.

VASAS, G.; GÁSPÁR, A.; SURÁNYI, G.; BATTÁ, G.; GYÉMÁNT, G.; HAMVAS, M. M.; MÁTHÉ, C.; GRIGORSZKY, I.; MOLNÁR, E.; BORBÉLY, G. Capillary electrophoretic assay and purification of Cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin

from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (Blue-Green *Sinapis* Test). **Analytical Biochemistry**, New York, v.302, p.95-103, 2002.

VIEIRA, J.A.; RAIMUNDO JUNIOR, I.M.; REIS, B.F.; CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; ARAÚJO, N.N. Monosegmented flow potentiometric titration for the determination of chloride in milk and wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.14, n.2, p.259-264, 2003.

WHO, **Guidelines for drinking-water quality**: addendum to volume 2, health criteria and other supporting information. Geneva: WHO, 1998. p.94-110.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, Oxford, v.48, p.627-640, 2006.

ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; JORGENSEN, S.S.; REIS, B.F. Merging zones in flow injection analysis. Part 2. Determination of Calcium, Magnesium and Potassium in Plant Material by Continuous Flow Injection Atomic Absorption and Flame Emission Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.104, n.2, p.279-284, 1979a.

ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; BERGAMIN, H.; JORGENSEN, S.S.; REIS, B.F. Merging zones in flow injection analysis. 2. Determination of calcium, magnesium and potassium in plant material by continuous-flow injection atomic-absorption and flame emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.104, n.2, p.279-284, 1979b.

ZAGATTO, E.A.G.; ARRUDA, M.A.Z.; JACINTHO, A.O.; MATTOS, I.L. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.234, n. 1, p. 153-160, 1990.

ZAITSU, K.; NAKAYAMA, M.; OHKURA, Y. Sensitive flow-injection determination of L-lactate in human blood with immobilized enzyme columns and fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.201, p.351-355, 1987.

ZECK A.; WELLER M.G.; NIESSNER, R. Multidimensional biochemical detection of microcystins in liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v.73, p.5509-5517, 2001.

ZHENG, X.; ZHAN, Z. Flow injection chemiluminescence determination of ionized using on-line electrogenerated BrO⁻ as an oxidant. **Analyst**, Cambridge, v.124, p.763-766, 1999.