

XXVI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS

VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS NÃO CONCENTRADAS

*Leopoldo Capanema de Almeida¹; Leide Gonçalves Cota²; Leonardo Pereira Dias Duarte³ &
Bárbara Caroline Ferreira Mota Alves⁴*

Abstract: This study evaluates the effectiveness of counting cyanobacteria in non-concentrated samples to meet the requirements of Ordinance n° 888 of the Brazilian Ministry of Health, which addresses the drinking water standards for human consumption. Samples with densities of approximately 100, 1,000, 5,000, 10,000, and 20,000 cells/mL were prepared from Laboratory Reference Material (LRM). The precision was evaluated using the Relative Standard Deviation (RSD), while the accuracy was determined through analyte recovery. The results showed that, although the precision and accuracy in the density range of 100 cells/mL were unsatisfactory, for higher concentrations these parameters showed smaller variations, with a maximum RSD of 20.06% and a minimum recovery of 83.17%. The linearity of the data, with a determination coefficient (R^2) of 0.9999, confirms the method's ability to obtain results directly proportional to the concentration of cyanobacteria. It is concluded that it is not strictly necessary to concentrate the samples before the quantitative analysis of cyanobacteria, facilitating the monitoring and management of water quality.

Resumo: Este estudo avalia a eficácia da contagem de cianobactérias em amostras não concentradas para cumprir os requisitos da Portaria GM/MS n° 888, de 4 de maio de 2021, que trata sobre o padrão de potabilidade da água para consumo humano. Foram preparadas amostras com densidades de aproximadamente 100, 1.000, 5.000, 10.000 e 20.000 células/mL a partir de Material de Referência de Laboratório (MRL). A precisão foi avaliada usando o Desvio Padrão Relativo (DPR) enquanto a exatidão foi determinada através da recuperação do analito. Os resultados mostraram que, embora a precisão e a exatidão na faixa de densidade de 100 células/mL tenham sido insatisfatórias, em concentrações mais elevadas esses parâmetros apresentaram variações menores, com DPR máximo de 20,06% e recuperação mínima de 83,17%. A linearidade dos dados, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0.9999, confirma a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração de cianobactérias. Conclui-se que não é estritamente necessário concentrar as amostras antes da análise quantitativa de cianobactérias, facilitando o monitoramento e a gestão da qualidade da água.

Palavras-Chave – Cianobactérias; Concentração de amostras; Potabilidade da água.

1) Copasa (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) – Laboratório Central. BR 356, KM 4. Belo Horizonte - MG. (31) 3250-2340. leopoldo.capanema@copasa.com.br

2) Copasa (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) – Laboratório Regional Norte. Av. Engenheiro Rolando Trindade Bassi, 14. Montes Claros - MG. (38) 3224-2530 leide.cota@copasa.com.br.

3) Copasa (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) – Laboratório Regional Sul. Rua Coronel Lemos s/n. Varginha - MG. (31) 99651-0031. leonardo.duarte@copasa.com.br

4) Copasa (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) – Laboratório Regional Norte. Av. Engenheiro Rolando Trindade Bassi, 14. Montes Claros - MG. (38) 3224-253. barbara.mota@copasa.com.br

INTRODUÇÃO

No Brasil, a portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021, que trata sobre o padrão de potabilidade da água para consumo humano, exige que as companhias de saneamento que operam sistemas de distribuição de água monitorem sistematicamente a densidade de cianobactérias em mananciais de abastecimento para apoiar medidas operacionais no tratamento de água (Almeida e Cota, 2024).

A legislação estabelece faixas de concentração de cianobactérias como gatilho para tais medidas: caso a densidade seja inferior a 10 mil células por mililitro, o monitoramento deverá ser realizado mensalmente. Se a concentração atingir 10 mil células/mL, a frequência deverá ser semanal. Finalmente, se a densidade for igual ou superior a 20 mil células/mL, além do monitoramento semanal da densidade de células, deve ser realizado também o monitoramento de cianotoxinas (BRASIL, 2021).

No Brasil, já foram registrados casos fatais de intoxicação por cianotoxinas, como os ocorridos na região de Itaparica (BA), em 1988 (Teixeira et al. 1993), e em Caruaru (PE), em 1996 (Jochimsen et al. 1998). Esses episódios evidenciam os riscos à saúde pública associados às florações de cianobactérias e reforçam a importância de que essas ocorrências sejam identificadas e reportadas rapidamente, permitindo a adoção de medidas preventivas e corretivas no tratamento da água. Nesse contexto, Gradíssimo et al. (2020) pontua que é necessário o monitoramento adequado da água utilizada não só para consumo humano, mas também para recreação, uma vez que a ineficiência do monitoramento e do tratamento da água são importantes agravantes em casos de contaminação por cianotoxinas.

Dentre os métodos normalizados utilizados para a análise quantitativa de cianobactérias estão, por exemplo, a norma técnica L5.303 da CETESB (Companhia Ambiental do estado de São Paulo) e o método SM10200 da APHA (American Public Health Association). Ambos estabelecem que as amostras podem ser concentradas antes da análise, embora não estipulem que esse passo seja obrigatório.

Além disso, técnicas de concentração de amostras, como filtração e centrifugação, podem apresentar desvantagens, incluindo seleção de organismos, perda, alteração de características e rompimento de células. Por outro lado, a sedimentação, embora seja um método não seletivo e não destrutivo, é demorada e pode não ser adequada para rotinas de monitoramento que exigem resultados rápidos (APHA, 2022; CETESB, 2012; Chorus e Welker, 2021; Sant'Anna et al. 2006).

Considerando que o propósito da Portaria GM/MS nº 888 é atendido com a detecção de florações com densidades iguais ou superiores a 10 mil células/mL, o presente estudo propõe investigar se a contagem de amostras não concentradas é capaz de garantir a potabilidade da água fornecida à população.

METODOLOGIA

Preparação das amostras

Devido à inexistência de Materiais de Referência (MR) e Materiais de Referência Certificados (MRC) para cianobactérias, as amostras utilizadas no estudo foram preparadas a partir de Material de Referência de Laboratório (MRL) produzido internamente.

Foram coletados seis litros de amostra ambiental em uma lagoa com floração de cianobactérias. Esse material foi concentrado por sedimentação e combinado para formar uma amostra única.

A partir do MRL foram preparadas amostras com densidades de aproximadamente 100, 1.000, 5.000, 10.000 e 20.000 células/mL. Para cada faixa de densidade foram produzidos seis frascos de amostra independentes.

Tanto o MRL quanto as amostras foram preservados com solução de lugol.

Caracterização do Material de Referência de Laboratório

Na análise qualitativa do MRL, foram observados os seguintes *taxa*: *Anagnostidinema*, *Raphidiopsis*, *Cuspidothrix*, *Aphanocapsa*, *Planktothrix*, *Arthrospira*, *Microcystis*, *Romeria*, *Merismopedia* e uma espécie não identificada pertencente à ordem Nostocales.

O material foi caracterizado quantitativamente pela contagem de 10 faixas em 33 câmaras de Sedgewick-Rafter. A média das densidades encontradas serviu como referência para calcular o volume necessário para produzir as diferentes densidades de cianobactérias nas demais amostras utilizadas no estudo.

Quantificação de cianobactérias

Cada amostra foi quantificada utilizando o método SM10200 para câmaras de Sedgewick-Rafter, com a contagem de 10 faixas por câmara. Para facilitar a contagem, foi empregado o método proposto por Jardim *et al.* (2002), onde a média de células de 30 organismos é utilizada como fator de multiplicação para o número de organismos encontrados.

Parâmetros de avaliação

Para avaliar se a contagem de amostras de cianobactérias sem concentração é adequada ao propósito da portaria de potabilidade foram usados parâmetros descritos pelo DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2020) e pelo Guia Para Validação de Métodos e Tópicos Relacionados da EURACHEM (2014).

Foram avaliadas a linearidade (capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais a sua concentração), exatidão (avaliado por meio da recuperação) e precisão (por meio do desvio padrão relativo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação de cianobactérias

A contagem das amostras com diferentes concentrações revelou as densidades de cianobactérias mostradas na Tabela 1.

Houve grande variação nas densidades observadas entre as réplicas, especialmente na faixa de 100 células por mililitro, onde a média registrada foi de 189,80 células/mL. Para as demais concentrações as diferenças foram menos acentuadas.

Tabela 1 – Densidade de cianobactérias em células/mL nas réplicas contadas em diferentes faixas de concentração

Densidade	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Média
100 cél/mL	0,00	526,53	526,53	0,00	0,00	85,71	189,80
1.000 cél/mL	1.559,18	1.216,33	693,88	861,22	1.130,61	1.065,31	1.087,76
5.000 cél/mL	7.208,16	5.428,57	5.772,45	4.416,33	7.502,04	4.665,31	5.832,14
10.000 cél/mL	10.722,45	14.310,20	10.783,67	9.861,22	12.644,90	13.036,73	11.893,20
20.000 cél/mL	25.000,00	24.564,94	21.281,63	26.355,10	24.497,96	22.085,71	23.961,22

Exatidão

A exatidão, parâmetro que mede a proximidade entre o valor verdadeiro e o valor medido de uma amostra, foi avaliada através de ensaio de recuperação do analito nas amostras com diferentes concentrações. A recuperação foi calculada através da equação (1):

$$\frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100\% \quad (1)$$

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Recuperação do analito nas amostras contadas em diferentes faixas de densidade

Densidade (Células/ mL)	Recuperação do Analito (%)						
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Média
100	0,00	402,58	402,58	0,00	0,00	65,53	145,11
1.000	119,21	93,00	53,05	65,85	86,44	81,45	83,17
5.000	110,22	83,01	88,27	67,53	114,72	71,34	89,18
10.000	75,40	96,68	99,68	90,93	96,68	99,68	90,93
20.000	95,57	93,84	81,36	100,75	93,65	84,43	91,60

Observa-se uma variação significativa na recuperação, principalmente na faixa de 100 células/mL, onde a recuperação média foi 145,11%, com valores extremos de 0,00% e 402,58%. Para

densidades mais altas, como 1.000, 5.000, 10.000 e 20.000 células/mL os valores de recuperação são mais consistentes, variando de 83,17 a 91,60%, sugerindo que a metodologia é mais adequada em concentrações mais elevadas.

Precisão

A precisão, definida como a proximidade entre os valores obtidos em medições repetidas de uma mesma amostra, foi avaliada pelo Desvio Padrão Relativo (DPR). O DPR é calculado pela equação (2):

$$DPR = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média}} \times 100\% \quad (2)$$

Os resultados de DPR para diferentes concentrações estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Desvio Padrão Relativo para réplicas das diferentes concentrações.

Densidade (células / ml)	Desvio Padrão Relativo (%)
100	126,47
1.000	17,49
5.000	20,06
10.000	13,05
20.000	7,08

Para a concentração de 100 células/mL o DPR foi de 126,47%, indicando uma baixa precisão. Já para concentrações mais altas os valores de DPR são significativamente menores, indo de 7,08% a 20,06%, indicando que a precisão das medições melhora com o aumento da concentração.

Linearidade

A linearidade (capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais a sua concentração) foi calculada a partir dos valores da média da densidade de cada faixa de concentração usando a equação de regressão linear (3).

$$y = a + bx \quad (3)$$

Onde:

y = número de células contadas;

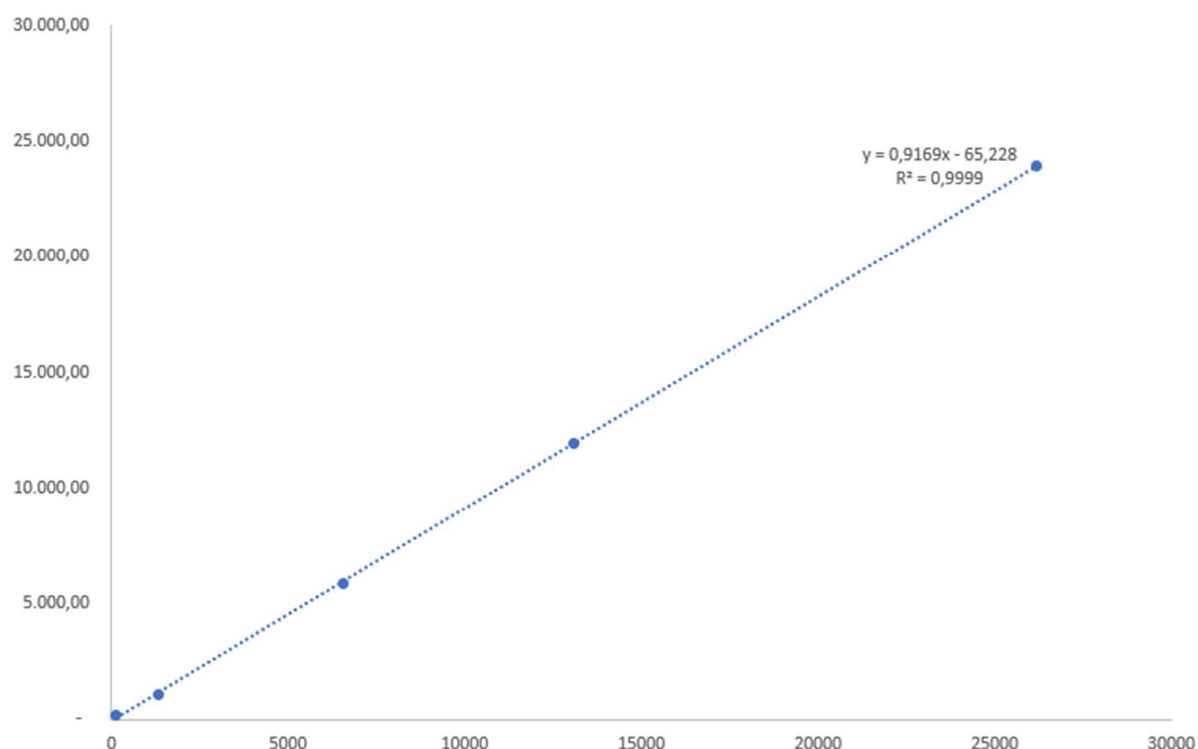
x = concentração em células/mL;

a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica.

Os resultados obtidos indicam uma forte correlação entre os valores, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999.

Figura 1 – Gráfico de linearidade



CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que apesar da precisão e exatidão na faixa de 100 células/mL terem sido baixas, com uma grande variação nas réplicas, para concentrações mais elevadas, como 1.000, 5.000, 10.000 e 20.000 células/mL esses parâmetros apresentaram variações menores, com DPR máximo de 20,06% e recuperação mínima de 83,17%.

A linearidade dos dados, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0.9999, confirma a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração de cianobactérias.

Considerando-se os riscos potenciais de perda e destruição do analito relacionados aos diferentes métodos de concentração de amostra e que a portaria GM/MS n° 888 tem foco na presença de densidades acima de 10 mil células/mL, entende-se que não é estritamente necessária a concentração das amostras antes da análise quantitativa de cianobactérias.

De acordo com Müller (2011), técnicas para identificação, quantificação e controle de cianobactérias em águas de abastecimento exigem rapidez, a fim de assegurar um ritmo indispensável que permita suprir a demanda de análises e exigências impostas pela legislação.

Dessa forma, a análise direta das amostras, sem etapa de concentração, mostra-se vantajosa por ser mais rápida, reduzir o risco de seleção e minimizar perdas do analito, contribuindo para maior eficiência e confiabilidade nos resultados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.C.; COTA, L. G. (2024). “*Monitoring picocyanobacteria in supply reservoirs: inconspicuous blooms of Cyanogranis Hindák 1982*” in 37th SIL – International Congress on Limnology, Foz do Iguaçu, maio, 2024 p. 198.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2022). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (24th ed.). Washington, D.C.: American Public Health Association. Método 10200.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2021.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (2012). Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de água doce: métodos qualitativo e quantitativo (4ª ed.). São Paulo: CETESB.
- CHORUS, I.; WELKER, M. (2021). *Toxic Cyanobacteria in Water* (2nd edition). CRC Press, Boca Raton – FL. 394p.
- EURACHEM (2014). The fitness for the purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics. (2ª ed.)
- GRADISSÍMO, D.G., MOURÃO, M. M., SANTOS, A. V. (2020). Importância do monitoramento de cianobactérias e suas toxinas em águas para consumo humano. *Revista Brasileira de Criminalística*, 9(2), 15-21.
- INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. “Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008” (2020)
- JARDIM, F. A.; CAVALIEREI, S. O.; GALLINARI, P. C.; VIANNA, L. N. L. (2002). “*Metodologia para contagem de cianobactérias em células/mL: um novo desafio para o analista de laboratório*”. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*. 7(3-4) pp. 109-111.
- JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, M. M.; AN J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E.; ANTUNES, M. B.; DE MELO FILHO, D.A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. (1998). “*Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil*”. *N Engl J Med*. Março 26;338(13):873-8.
- MÜLLER, C. C. (2011). *Confiabilidade analítica dos ensaios quali-quantitativos de fitoplâncton para o monitoramento eficiente da qualidade dos mananciais*. 186 f. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANT’ANNA C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. (2006) *Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras*. Interciência, Rio de Janeiro; Sociedade Brasileira de Ficologia – SBFic.

TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. T.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. (1993). “Gastroenteritis epidemic in the area of Itaparica, Bahia, Brazil. Bull PAHO 27(3):244-53.