



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

FERNANDO ABREU OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS EM ÁGUAS DO RIO TAPAJÓS,
AMAZÔNIA, BRASIL**

**SANTARÉM – PA
2022**

FERNANDO ABREU OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS EM ÁGUAS DO RIO TAPAJÓS,
AMAZÔNIA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do título de Mestre; Área de Concentração: Fisiologia Ambiental, Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Dra. Dávia Marciana Talgatti

**SANTARÉM – PA
2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- O48q Oliveira, Fernando Abreu
Quantificação de microcistinas em águas do rio Tapajós, Amazônia, Brasil./ Fernando Abreu Oliveira. – Santarém, 2022.
36 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Dávia Marciana Talgatti.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Cianotoxinas. 2. Cota Fluviométrica. 3. Cromatografia. 4. Floração de Cianobactérias. 5. Mudanças Climáticas. 6. Rio Tapajós. I. Talgatti, Dávia Marciana, *orient.*
II. Título.

CDD: 23 ed. 579.39098115

Bibliotecária - Documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB/2 566

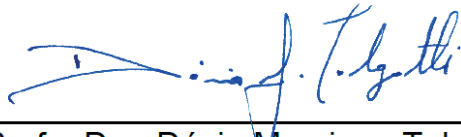
FERNANDO ABREU OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS EM ÁGUAS DO RIO TAPAJÓS,
AMAZÔNIA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do título de Mestre; Área de Concentração: Fisiologia Ambiental, Toxicologia Ambiental.

Conceito: Aprovado

Data de Aprovação: 14/11/2022



Prof. Dra. Dávia Marciana Talgatti – Orientadora
Universidade Federal do Oeste do Pará



Documento assinado digitalmente
RENATO DA SILVA BANDEIRA
Data: 30/11/2022 12:46:54-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Renato da Silva Bandeira – Membro da banca
Universidade Federal do Oeste do Pará

Paulo Sergio Taube Junior
Professor - IBEF/UFOPA
SUAPE: 1770173



Prof. Dr. Paulo Sergio Taube Junior – Membro da banca
Universidade Federal do Oeste do Pará

AGRADECIMENTO

À organização não-governamental The Nature Conservancy (TNC), através do Projeto “Águas do Tapajós” pelo financiamento deste estudo e à Fundação de Integração Amazônica (FIAM) pelo apoio e gerenciamento do recurso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências-UFOPA pelo apoio financeiro através do Edital PIP (2020 e 2021).

À minha orientadora Professora Dra. Dávia Marciana Talgatti por todo apoio na coordenação e nas orientações valiosas.

À Rede Integrada de Desenvolvimento Humano (RIDH-UFOPA) pelo apoio nas análises cromatográficas.

Aos professores Joacir e Deianira (UFOPA) pela assistência teórica na pesquisa.

Ao laboratório de Química Aplicada (UFOPA) por ceder a coluna cromatográfica e o manifold de extração SPE.

Ao laboratório de Gestão Ambiental (UFOPA) por ceder o espaço para a extração das amostras.

Ao laboratório de Biologia Ambiental pela realização das análises ambientais.

À minha família (Janaina, Maria Flor e Ana Bela) pela compreensão e apoio emocional. E a minha mãe (Ângela) pelo apoio em casa na minha ausência para as coletas.

RESUMO

As microcistinas são toxinas hepatotóxicas produzidas por cianobactérias (algas azul-esverdeadas) de água doce. A maior possibilidade de produção de microcistinas em concentrações alarmantes ocorre quando há densas concentrações de células de cianobactérias, chamadas também de florações. A eutrofização dos ambientes aquáticos e as mudanças climáticas modulam a formação de florações causando problemas para o abastecimento de água, recreação, consumo de peixes, e outros. As contaminações agudas por microcistinas podem causar a morte de animais aquáticos e terrestres, e em contaminações a longo prazo pode promover câncer primário de fígado em humanos. Este estudo objetivou quantificar microcistinas (MC-RR, MC-YR e MC-LR) em águas do rio Tapajós entre as cidades de Santarém e Itaituba-PA, próximo as comunidades ribeirinhas, e em diferentes cotas fluviométricas do rio, bem como correlacionar os parâmetros ambientais das águas com a concentração das microcistinas. As amostras de águas foram coletadas nos anos de 2020, 2021 e 2022, em períodos de seca, enchente, cheia e vazante do rio Tapajós. Trinta e oito amostras foram subdivididas em filtrado (extracelular) e biomassa (intracelular). As microcistinas foram extraídas e purificadas através de Extração de Fase Sólida e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção em arranjo fotodiodo. A análise foi validada conforme critérios da Resolução nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O método se mostrou linear e seletivo para as três microcistinas. Obtemos valores de exatidão (recuperação) entre 80,01 e 107,69%, valores de precisão com desvio padrão relativo entre 1,43 e 9,53%, valores de limite de detecção entre 0,104 e 0,174 µg/mL e limite de quantificação entre 0,167 e 0,205 µg/mL. Dez subamostras de filtrado e quatro subamostras de biomassa positivaram para microcistina, correspondendo a 26,31% e 10,53%, respectivamente. A microcistina predominante foi a MC-LR com o máximo de 1,353 µg/L na fração extracelular e de 0,120 µg/mL na fração intracelular. Nenhuma das amostras ultrapassou o limite recomendado pela Organização Mundial da Saúde de 24 µg/L

para água de recreação. Em termos de frequência observamos que há maior incidência de microcistinas na vazante e seca do rio Tapajós, com destaque para a comunidade de Parauá com três amostras positivas das quatro coletadas. Os resultados estão de acordo com outros dois estudos realizados anteriormente na foz do rio Tapajós, que obtiveram valores baixos de microcistinas. Além disso, os valores obtidos sugerem que em sistemas lóticos há menor concentração de microcistinas do que em sistemas lênticos. Entretanto, em rios caudalosos, como o Tapajós as células das cianobactérias podem acumular na margem destes rios (em enseadas), podendo produzir toxinas em níveis perigosos. As condições de temperatura, iluminação abundante, enseadas e as águas claras do rio Tapajós proporcionam um ambiente favorável para florações de cianobactérias. As populações ribeirinhas do rio Tapajós deste trecho, as que dependem mais do rio, estão mais suscetíveis a contaminações por microcistinas, pois o tratamento das águas superficiais para consumo é praticamente inexistente, a fervura da água não degrada as cianotoxinas e ainda há o risco pelo consumo de peixes que podem estar contaminados.

Palavras-chave: Cianotoxinas. Cota Fluviométrica. Cromatografia. Floração de Cianobactérias. Mudanças Climáticas. Rio Tapajós.

ABSTRACT

Microcystins are hepatotoxic toxins produced by freshwater cyanobacteria (blue-green algae). The greater possibility of microcystin production in alarming concentrations occurs when there are dense concentrations of cyanobacteria cells, also called blooms. The eutrophication of aquatic environments and climate change modulate the formation of blooms causing problems for water supply, recreation, fish consumption, and others. Acute microcystin contamination can cause the death of aquatic and terrestrial animals, and in long-term contamination can promote primary liver cancer in humans. This study aimed to quantify microcystins (MC-RR, MC-YR and MC-LR) in Tapajós river waters between the cities of Santarém and Itaituba-PA, near the riverside communities, and in different fluviometric quotas of the river, as well as correlate the environmental parameters of the waters with the concentration of microcystins. Water samples were collected in 2020, 2021 and 2022, during periods of drought, flood, full and ebb of the Tapajós River. Thirty-eight samples were subdivided into filtrate (extracellular) and biomass (intracellular). The microcystins were extracted and purified through Solid Phase Extraction and analyzed by High Performance Liquid Chromatography with detection in photodiode arrangement. The analysis was validated according to the criteria of Resolution No. 166 of the National Health Surveillance Agency. The method was linear and selective for the three microcystins. We obtained accuracy values (recovery) between 80.01 and 107.69%, precision values with relative standard deviation between 1.43 and 9.53%, detection limit values between 0.104 and 0.174 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and quantification limit between 0.167 and 0.205 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ten filtrate subsamples and four biomass subsamples positive for microcystin, corresponding to 26.31% and 10.53%, respectively. The predominant microcystin was MC-LR with a maximum of 1.353 $\mu\text{g}/\text{L}$ in the extracellular fraction and 0.120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the intracellular fraction. None of the samples exceeded the World Health Organization recommended limit of 24 $\mu\text{g}/\text{L}$ for recreational water. In terms of frequency, we observed that there is a higher incidence of microcystins in the ebb and drought of the

Tapajós River, especially the community of Parauá with three positive samples of the four collected. The results are in agreement with two other studies previously conducted at the mouth of the Tapajós River, which obtained low values of microcystins. In addition, the values obtained suggest that in lotic systems there is a lower concentration of microcystins than in lentic systems. However, in mighty rivers such as Tapajós cyanobacteria cells can accumulate on the bank of these rivers (in coves), and can produce toxins at dangerous levels. The temperature conditions, abundant lighting, coves and clear waters of the Tapajós River provide a favorable environment for cyanobacteria blooms. The riverside populations of the Tapajós River of this stretch, those that depend more on the river, are more susceptible to contamination by microcystins, because the treatment of surface waters for consumption is practically non-existent, the boiling of water does not degrade cyanotoxins and there is still the risk of consumption of fish that may be contaminated.

Keywords: Cyanotoxins. Fluviometric Quota. Chromatography. Cyanobacterial Blooms. Climate Change; Tapajós River.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura genérica das microcistinas. Nas posições 2 e 4 dados como X e Z, respectivamente, são variáveis de aminoácidos e geralmente dados pelo código de uma letra para L-aminoácidos proteínogênicos. Por exemplo: L=L-leucina. R=L-arginina. Y=L-tirosina. R1 e R2 podem ser H ou CH₃ 13
- Figura 2** – Espectros típicos em HPLC-PAD de (a) MC-RR, (b) MC-YR e (c) MC-LR em acetonitrila/água na concentração de 1 µg/mL com o máximo de absorção em 238 nm 13
- Figura 3** – Mapa de identificação dos pontos de amostragem e da estação de monitoramento das cotas fluviométricas do rio Tapajós 16
- Figura 4** – Cotas fluviométricas do rio Tapajós com destaque para as datas de registros e cotas (m) mais próximas da data de amostragem 18
- Figura 5** – Esquema de extração de microcistinas 20
- Figura 6** – Espécies de cianobactérias que predominaram nas amostras e foram as formadoras das florações registradas. A, B. *Dolichospermum circinalis*. C, D. *Aphanocapsa sp.1.*. E. Seta vermelha: espécie de cianobactéria (*Pseudanabaena cf. mucicola*) acompanhante de florações de cianobactérias. F. seta preta: *Merismopedia sp.*, Seta amarela: filamento de *Dolichospermum circinalis* 24
- Figura 7** – Em (a) são os pontos positivos para microcistinas em relação ao período de seca, de enchente, de cheia e de vazante do rio Tapajós. Em (b) é a frequência de coleta dos pontos amostrados no rio Tapajós em relação a frequência de amostras positivas 28
- Figura 8** – Gráficos de Box Plox com a mediana e sem os valores de outliers (a) de pH, (b) de temperatura, (c) de amônia, (d) de clorofila *a*, (e) de fósforo total, (f) de nitrato e (g) de extinção de disco de Secchi 29
- Figura 9** – Análise de componente principal (ACP) das variáveis ambientais (pH, temperatura, amônia, clorofila *a*, fósforo total, nitrato e extinção de disco de Secchi) e as microcistinas (soma da fração extracelular) nos períodos de seca (NOV-2020), cheia (JUN-2021), vazante (SET-2021), seca (NOV-2021) e enchente (FEV-2022)..31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Identificação dos pontos de amostragem, localidades mais próximas, na margem mais próxima ou meio e suas coordenadas geográficas no rio Tapajós (Google) 17
- Tabela 2** – Validação do método para a matriz água, com a linearidade (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão de repetibilidade (DPR%), exatidão (recuperação média) 22
- Tabela 3** – Concentração de microcistinas em águas do rio Tapajós, nas cinco expedições e diferentes cotas fluviométricas do rio, nas frações do filtrado (extracelular) em $\mu\text{g/L}$ e da biomassa (intracelular) em $\mu\text{g/mL}$ 27
- Tabela 4** – Loadings da análise de componente principal entre as variáveis ambientais e as microcistinas (soma da fração extracelular) com os componentes principais 1 e 2 31
- Tabela 5** – Autovalores da análise de componente principal entre as variáveis ambientais e as microcistinas (soma da fração extracelular) 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1	PRODUTOS QUÍMICOS E PADRÕES	14
2.2	AMOSTRAGEM	15
2.3	COTAS FLUVIOMÉTRICAS DO RIO TAPAJÓS	17
2.4	AMOSTRAGEM E ANÁLISE PARA OBTENÇÃO DE DADOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DO MATERIAL FITOPLANCTÔNICO (CIANOBACTÉRIAS)	18
2.5	EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS..	19
2.6	ANÁLISE INSTRUMENTAL	20
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
2.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	22
2.9	CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINAS	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1	QUALIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS	23
3.2	OCORRÊNCIA DE MICROCISTINAS EM ÁGUAS DO RIO TAPAJÓS...	25
3.3	PARÂMETROS AMBIENTAIS	29
3.4	ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (ACP)	30
4	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	33

O artigo apresentado foi redigido conforme diretrizes de submissão da revista Toxicon. As normas indicadas para a redação de artigos pela revista estão disponíveis no link: <https://www.elsevier.com/journals/toxicon/0041-0101/guide-for-authors>.

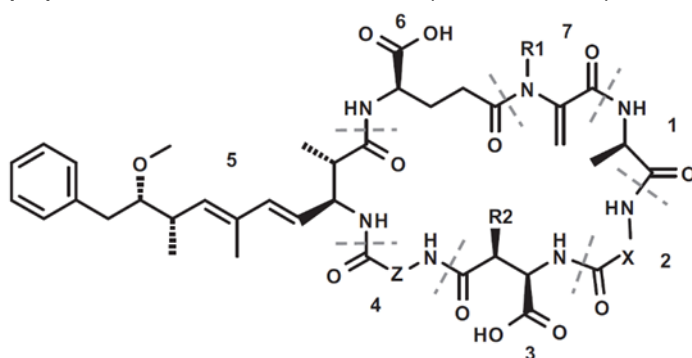
1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias ou “algas azul-esverdeadas” são microrganismos unicelulares procarióticos coloniais que tem a habilidade de sintetizar a clorofila *a* (GARCIA-PICHEL et al., 2019). Em águas ricas em nutrientes as cianobactérias podem formar densas florações, que podem cobrir metros até centenas de quilômetros quadrados. O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os principais nutrientes que promovem ou limitam o crescimento de cianobactérias e outros fitoplânctons em água doce. As cianobactérias que podem causar concentrações preocupantes para a saúde humana e outros animais aquáticos e terrestres são geralmente planctônicas, e por isso são muito estudadas. As mais conhecidas espécies de cianobactérias formadoras de florações superficiais são dos gêneros *Dolichospermum*, *Cuspidothrix*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Nodularia* (CHORUS; WELKER, 2021).

Algumas espécies de cianobactérias de água doce e salgada produzem cianotoxinas. Estas toxinas ficam retidas nas células de cianobactérias e são liberadas para a água após a *lise* celular (TSUJI et al., 2001). A toxicidade da floração de cianobactérias tem variação temporal e espacial, dependendo diretamente de clones de espécies tóxico-gênicos (SILVA; PELEJA; MELO, 2019; SVIRČEV et al., 2019). A exposição às cianotoxinas pode ocorrer por via oral, respiratória e dérmica. A contaminação por via oral ocorre pela água potável ou ingestão acidental em atividades aquáticas. E ainda, pela ingestão de alimentos contaminados como peixes, mariscos e crustáceos, bem como hortaliças pulverizadas com água contaminada. Um risco em particular para populações específicas pode ser causado através da hemodiálise, quando centros de diálises não tomam as medidas apropriadas e o dialisado é contaminado com cianotoxinas (CHORUS; WELKER, 2021; POURIA et al., 1998).

As microcistinas (MCs) são as cianotoxinas mais comuns produzidas por cianobactérias. As MCs são tóxicas para o fígado e a exposição em humanos e em vários animais pode resultar em insuficiência hepática e morte. As exposições em longos prazos ou em doses altas de microcistina leucina-arginina (MC-LR) aumenta o risco de formação de câncer primário de fígado. Em animais terrestres, a morte por microcistinas decorre de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. Sintomas característicos são aumento exagerado do volume hepático, liberação de hemoglobina, em contraste com a perda de sangue em outros órgãos, induzindo a um choque irreversível (KAMOGAE; HIROOKA, 2000; SVIRČEV et al., 2010). A capacidade hepatocarcinogênica das MCs se deve a inibição da proteína fosfatase 1 e 2A do hepatócito e a hiperfosforilação concomitante de proteínas celulares. Em doses abaixo de 20 µg/Kg de peso corpóreo em exposição prolongada a inibição das fosfatases induz a proliferação celular, hipertrofia hepática e promoção de tumor (BURATTI et al., 2017; FOURNIER et al., 2021). Outros estudos mostram que MCs podem afetar outros órgãos como os rins, o pulmão, o coração e o cérebro (WHO, 2020).

As MCs são heptapeptídeos cíclicos e foram caracterizadas pela primeira vez no início da década de 1980 e nomeadas em homenagem à cianobactéria *Microcystis aeruginosa* da qual foram inicialmente isoladas. A estrutura geral de uma MC é ciclo-(DAla¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷) (figura 1). A porção Adda é característica das MCs e das nodularinas, pois ocorrem exclusivamente nesses peptídeos de cianobactérias (WHO, 2020). As MCs são hidrofílicas e extremamente

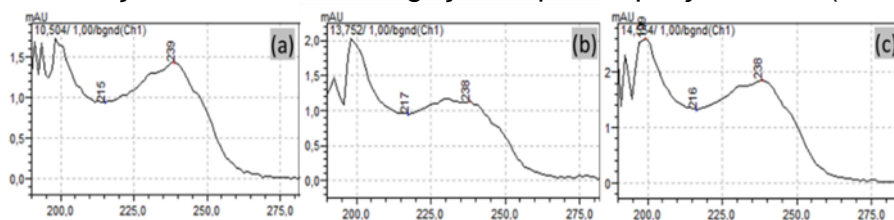


resistentes ao calor, à hidrólise e à oxidação. Nenhuma das MCs conhecidas demonstrou afetar o sabor e odor da água (MOHAMED, 2016; WHO, 2020).

Figura 1 – Estrutura genérica das microcistinas. Nas posições 2 e 4 dados como X e Z, respectivamente, são variáveis de aminoácidos e geralmente dados pelo código de uma letra para L-aminoácidos proteogênicos. Por exemplo: L=L-leucina. R=L-arginina. Y=L-tirosina. R1 e R2 podem ser H ou CH₃. Fonte: (CHORUS; WELKER, 2021; SVIRČEV et al., 2010).

Há pelo menos 279 variações de MCs reportadas pela literatura e as variações estruturais apresentam diferentes lipofilicidades e polaridades, que afetam sua toxicidade. Para florações de *Microcystis* as MC-LR, MC-RR e MC-YR (figura 1) são os congêneres mais abundantes. Para avaliação de risco, dados toxicológicos específicos para congêneres que não sejam MC-LR são escassos ou inexistentes, portanto, como estimativa padrão ou conservadora, eles são considerados igualmente tóxicos como MC-LR (FOURNIER et al., 2021; SVIRČEV et al., 2019).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em arranjo fotodiodo (HPLC-PAD) fornece um método acessível para a detecção e quantificação de MCs devido aos seus espectros característicos no Ultravioleta (UV). A maioria das MCs tem os espectros de absorção muito semelhantes (figura 2), com o máximo de absorção em 238 nm da ligação dupla na porção Adda (ISO 20179, 2005; LAWTON;



EDWARDS; CODD, 1994).

Figura 2 – Espectros típicos em HPLC-PAD de (a) MC-RR, (b) MC-YR e (c) MC-LR em acetonitrila/água na concentração de 1 µg/mL com o máximo de absorção em 238 nm. Fonte: arquivo do autor.

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu um guia provisório com valor máximo de 1 µg/L de MCs para água potável e recomenda um valor máximo de 24 µg/L para água de recreação. Além de estipular o valor de tolerância diária ingerida (TDI) para exposição crônica de 0,04 µg/Kg/dia de peso corpóreo para MC-LR (WHO, 2020). No Brasil, o Valor Máximo Permitido (VMP) em água potável é de 1 µg/L de microcistinas totais. Em estações de tratamento de água (ETA) quando a contagem ultrapassar 20.000 células/mL de cianobactérias é necessário fazer análise de

cianotoxinas enquanto mantiver a contagem ou realizar semanalmente análise de cianotoxinas na água bruta (BRASIL, 2021).

A eutrofização e as mudanças climáticas modulam florações de cianobactérias (PAERL et al., 2016; SUKENIK; QUESADA; SALMASO, 2015). A crescente ação humana em torno do rio Tapajós, em particular o crescimento da fronteira agrícola amazônica, contribui para o seu enriquecimento nutricional, favorecendo a formação de florações de cianobactérias (SILVA; PELEJA; MELO, 2019).

Os estudos de MCs em água bruta e em água potável demonstram a importância da detecção e quantificação dessas cianotoxinas nos corpos d'água. Na cidade de Caruarú, nordeste do Brasil, em fevereiro de 1996, pacientes de um centro de hemodiálise desenvolveram complicações hepáticas, após utilizarem água indevidamente tratada de um reservatório local com proliferação excessiva de algas azul-esverdeadas, levando a morte de 60 pacientes. Foram encontradas concentrações de 80 a 133 µg/L de microcistinas no fígado e no soro dos pacientes (POURIA et al., 1998). Em Santarém-PA, Brasil, em março de 2007, nas praias do Arariá e do Carapanari no rio Tapajós, MCs foram encontradas em água bruta em 0,23 e 0,55 µg/L de MC-LR, respectivamente. Cianobactérias do gênero *Anabaena* sp. (atualmente *Dolichospermum* sp.) foi predominante nessas duas amostragens (SÁ et al., 2010). Este estudo objetivou quantificar microcistinas (MC-RR, MC-YR e MC-LR) em águas do rio Tapajós entre as cidades de Santarém e Itaituba-PA, próximo as comunidades ribeirinhas, e em diferentes cotas fluviométricas do rio, bem como correlacionar os parâmetros ambientais das águas com a concentração das microcistinas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUTOS QUÍMICOS E PADRÕES

Os padrões de MC-RR, MC-YR e MC-LR (pureza $\geq 95\%$), os solventes orgânicos metanol e acetonitrila grau HPLC, o ácido trifluoracético grau HPLC e os cartuchos C18 (6 mL, 500 mg) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). A membrana de microfibras de vidro de 47 mm GF/A foi adquirida da GE Healthcare (Chicago, IL, EUA). O filtro de nylon 0,22 μm foi adquirido da Filtrilo (Colombo, PR, BRA).

2.2 AMOSTRAGEM

O rio Tapajós nasce no estado do Mato Grosso, percorre parte do sudoeste do estado do Pará e desagua no rio Amazonas, em frente a cidade de Santarém, é considerado um dos mais importantes rios para a navegação, com destaque para o transporte de grãos de soja, de pessoas e para o turismo. As amostragens foram realizadas em 10-17 de novembro-2020, 09-14 de junho-2021, 02-07 de setembro-2021, 15-20 de novembro-2021 e 05-10 de fevereiro-2022. As coletas foram realizadas próximo à margem direita do rio nos pontos P1 (Alter do Chão) e P7 (Cauaçu-Epá), próximo à margem esquerda do rio nos pontos P2 (Surucúá)-P6 (Apacê), P10 (Itaituba) e P11 (Itaituba-montante), e os pontos P8 (Barreiras) e P9 (Santarenzinho) estavam mais próximos da região central do rio Tapajós (Fig. 3). Todas as coletas foram realizadas no período diurno. Parte da amostragem foi realizada na parte mais larga do rio (P1-P6) e a outra na parte mais estreita do rio (P7-P11). Destaca-se o P1 por ter muitas praias entre as vilas de Alter do Chão e Ponta de Pedras, é uma área bastante utilizada para banho e outras atividades aquáticas, está localizado na mesma margem das cidades de Belterra e Santarém. Os P2 ao P9 estão localizados próximos as comunidades menores (Surucúá, Parauá, Surucá, Cametá, Apacê, Cauaçu-Epá, Barreiras e Santarenzinho). O P10 está em frente a cidade de Itaituba, na mesma margem, e fica próximo ao ponto de captação de água da Estação de Tratamento de Água (ETA) da cidade. O P11 fica a montante da cidade

de Itaituba e teoricamente não sofreria influência direta de esgotos desta cidade (figura 3 e tabela 1).

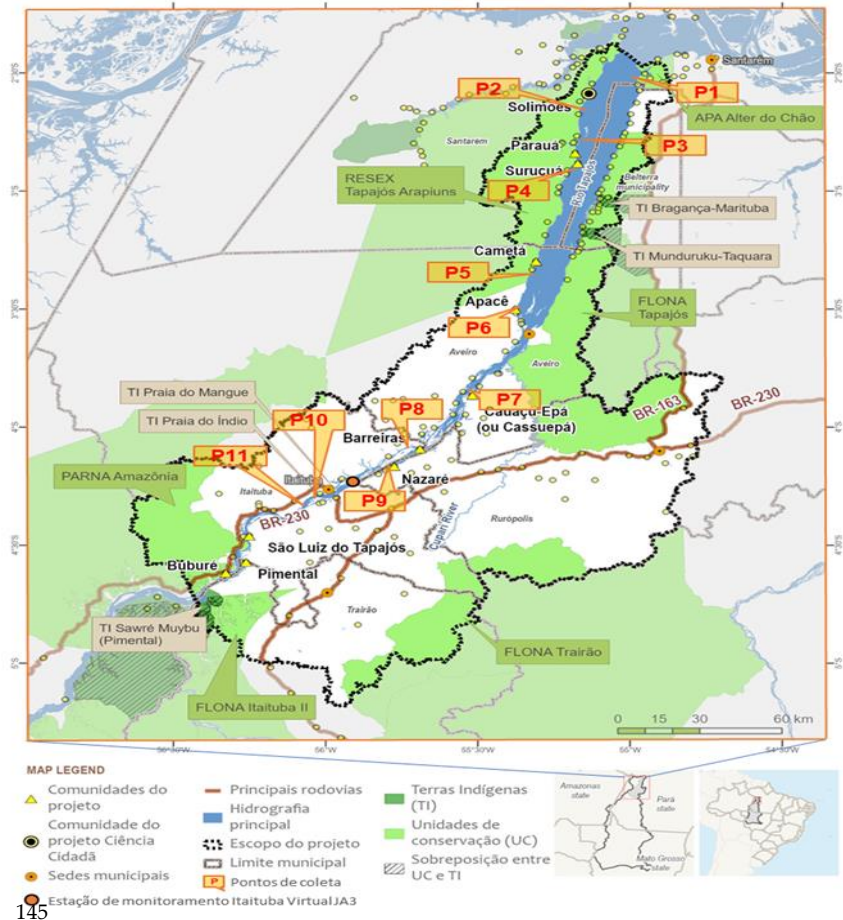


Figura 3 - Mapa de identificação dos pontos de amostragem e da estação de monitoramento das cotas fluviométricas do rio Tapajós. Fonte: The Nature Conservancy Brasil

As coletas foram autorizadas pelo órgão ambiental Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio do Ministério do Meio Ambiente (comprovante de registro nº 75196-1). Com a ajuda de uma lancha as amostras foram coletadas em frascos de vidro do tipo âmbar (análise de microcistinas) diretamente na lâmina d’água e foram submetidas a filtração, com filtro de microfibras de vidro (1,6 µm) no barco de apoio em até 6 horas para a separação da biomassa e do filtrado. Logo depois, as subamostras foram identificadas e refrigeradas em gelo até chegarem ao laboratório. Logo após a subamostra de biomassa foi armazenada à -20 °C e a subamostra de filtrado sob refrigeração de 2-4 °C até a extração. As amostras para análises ambientais foram coletadas na lâmina d’água em frascos de polipropileno do tipo âmbar. Com isso, as coordenadas medidas através de um aparelho de GPS

portátil (Garmin, modelo eTrex 10) e as distâncias em relação à margem através da régua do Google Maps (tabela 1).

Identificação pontos de amostras	Comunidade/localidade	margem do rio	Distância da margem (m)	Coordenadas geográficas
P1	Alter do Chão/Ponta de Pedras	direita	1250	2°26'55.9"S, 54°57'12.6"W
P2	Surucuí	esquerda	625	2°38'10.7"S, 55°08'57.7"W
P3	Parauá	esquerda	622	2°46'28.0"S, 55°09'52.6"W
P4	Surucacá	esquerda	2760	2°44'57.7"S, 55°08'26.9"W
P5	Cametá	esquerda	342	3°26'01.5"S, 55°21'06.5"W
P6	Apacê	esquerda	860	3°29'15.8"S, 55°21'46.0"W
P7	Cauaçu-Epá	direita	84	3°51'20.5"S, 55°30'55.9"W
P8	Barreiras	meio	1220 (direita)	4°05'59.5"S, 55°40'46.7"W
P9	Santarenzinho	meio	1260 (esquerda)	4°10'45.3"S, 55°50'28.3"W
P10	Itaituba	esquerda	264	4°16'44.9"S, 55°59'02.0"W
P11	Itaituba (acima)	esquerda	260	4°17'28.4"S, 56°01'59.2"W

Tabela 1 - Identificação dos pontos de amostragem, localidades mais próximas, na margem mais próxima ou meio e suas coordenadas geográficas no rio Tapajós. Fonte: Google Maps.

2.3 COTAS FLUVIOMÉTRICAS DO RIO TAPAJÓS

As cotas fluviométricas do rio Tapajós foram calculadas através da estação de monitoramento Itaituba Virtual JA3, no município de Itaituba, da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA, 2022). O monitoramento tem lacunas temporais e as medidas fluviométricas do rio Tapajós usadas neste estudo foram as mais próximas da data da amostragem. A estação de monitoramento fica entre os pontos 9 e 10 (figura 3). A partir dos valores obtidos quanto a cota fluviométrica do rio Tapajós, procedeu-se a caracterização do nível do rio da seguinte forma: 1) Período de seca (novembro-2020 e outubro a novembro de 2021); 2) Período de enchente (dezembro-2020 a março-2021 e dezembro-2021 a fevereiro-2022); 3) Período de cheia (abril a



Figura 4 – Cotas fluviométricas do rio Tapajós com destaque para as datas de registros e cotas (m) mais próximas da data de amostragem. Fonte: OpenStreetMap (ANA, 2022).

2.4 AMOSTRAGEM E ANÁLISE PARA OBTENÇÃO DE DADOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DO MATERIAL FITOPLANCTÔNICO (CIANOBACTÉRIAS)

Em cada ponto foram coletadas, na subsuperfície da água (entre 20 e 30 cm de profundidade), amostras para o estudo qualitativo e quantitativo da comunidade fitoplanctônica (para análise e quantificação das florações de cianobactérias). As coletas para as análises quantitativas foram realizadas com frascos de 500 ml e as qualitativas com auxílio de rede de plâncton (abertura de 20 μ m). A rede de fitoplâncton foi lançada na água durante 15 vezes seguidas no ponto de coleta, anotando-se o tempo total dos lançamentos. O tempo variou de acordo com a quantidade de material fitoplanctônico contido na água. Após a coleta o material para análise quantitativa foi fixado com Lugol (4%) e o material proveniente da coleta com

rede (qualitativa) foi fixado com formaldeído (4%). Na sequência, o material fixado foi armazenado em refrigerador do Laboratório de Algas e Plantas da Amazônia do Campus de Oriximiná da Ufopa.

A identificação do material foi realizada (amostras qualitativas) em Microscópio Óptico da marca Zeiss modelo Scope A1 (com câmara de captura AxioCam 506) com Contraste de Interferência Diferencial do Laboratório de Algas e Plantas da Amazônia (LAPAM) do Campus de Oriximiná da Ufopa.

A quantificação das cianobactérias foi realizada de acordo com a metodologia específica (UTERMÖHL, 1958). Em microscópio invertido da marca Zeiss, modelo Primovert (com sistema de captura de imagem modelo AxionCam 105 color) do Laboratório de Algas e Plantas da Amazônia (LAPAM) do Campus de Oriximiná da Ufopa, em aumento de 400 vezes. A densidade de cianobactérias e do fitoplâncton autóctone foi expressa em ind/mL (indivíduos por mililitro).

2.5 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS

O procedimento de extração foi baseado na “ISO 20179: Water Quality – Determination of microcystins – Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultravioleta (UV) detection” (ISO 20179, 2005). Para extrair as MCs da biomassa, o filtro utilizado na filtração de separação filtrado/biomassa (microfibra de vidro) foi enxaguado com um volume de 12 a 15 mL com solução de extração, metanol a 75% em água. A solução foi sonicada por 2 min em um banho ultrasônico. Depois disso, a solução foi centrifugada a 3046 g por 10 min à temperatura ambiente, utilizando tubo Falcon de polipropileno de 15 mL. Antes da aplicação das amostras, os cartuchos de octadecilsilano (C18) foram condicionados com 4 mL de metanol grau HPLC e 4 mL de água ultrapura, deixando uma pequena película de água no final antes da aplicação da amostra. Então um

volume do sobrenadante foi aplicado ao cartucho de C18 a uma taxa de fluxo de 225
máximo 10 mL/min sob vácuo. 226

Para extrair as MCs do filtrado foram adicionados 5 mL de metanol grau HPLC 227
na subamostra. E após a agitação, a subamostra foi aplicada ao cartucho 228
condicionado a uma taxa de fluxo de no máximo 10 mL/min sob vácuo. Depois que as 229
subamostras de biomassa e de filtrado passaram pelo cartucho, os cartuchos foram 230
lavados com 4 mL de solução de diluição padrão, metanol à 20% em água. Logo após, 231

as MCs do cartucho
foram eluidas com 2
mL de solução de
eluição, metanol à
90% em água
contendo 0,1% em
volume de ácido
trifluoracético (TFA)
para um frasco de
coleta.

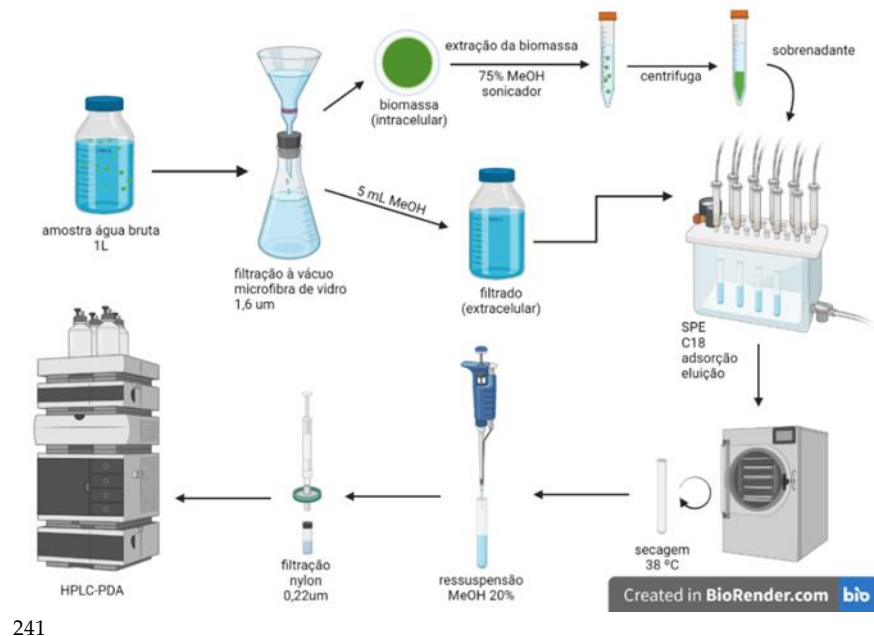


Figura 5 – Esquema de extração de microcistinas. Fonte: (BIORENDER, 2022)

O eluato foi evaporado em estufa controlada a temperatura de 38 °C. Após a 243
evaporação o eluato foi ressuspenso em 500 µL com solução de diluição padrão, a 244
amostra foi homogeneizada e filtrada através de seringa de vidro/filtro de nylon (25 245
mm/0,22 µm) para um vial de 1,5 mL (figura 5). Em seguida, os extratos foram 246
armazenados sob refrigeração abaixo de -20 °C para posterior análise cromatográfica. 247

2.6 ANÁLISE INSTRUMENTAL 248

O cromatógrafo utilizado foi um HPLC da Shimadzu, de injeção manual (20 µL). 249
As fases móveis utilizadas foram água do tipo 1 com 0,05 % de TFA (A) e acetonitrila 250

com 0,05 % de TFA (B). A vazão analítica foi de 1 mL/min. A separação das MCs foi alcançada através de uma coluna C18 (150 mm x 4,6 mm, tamanho da partícula de 5 μ m) da PerkinElmer (Waltham, MA, EUA), a uma temperatura controlada em 22 °C e equipada com um pré-coluna C18 (10Lx4,6). O programa de gradiente foi de 30 %B em 0,01 min, 30 %B em 1,00 min, 40 %B em 9 min, 75 %B em 15 min, 100 %B em 17 min, 100 %B em 19 min, 30 %B em 19,1 min e 30 %B em 28 min. Nestas condições as MCs saíram em 10,556 min (MC-RR), em 13,825 min (MC-YR) e em 14,627 min (MC-LR). Os picos das amostras que saíram em \pm 2 % do tempo de retenção foram integrados para avaliação espectral.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico Past, versão 4.03 (HAMMER, 1999) e o Excel® 365 (MICROSOFT, 2022).

2.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método para os três analitos, MC-RR, MC-YR e MC-LR, seguiu critérios da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 166 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), de 24 de julho de 2017. Os parâmetros avaliados foram a exatidão, a precisão de repetibilidade, a seletividade, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ) e a linearidade.

Para o parâmetro de linearidade foram utilizadas curvas de calibração com os níveis de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 μ g/mL em solução de metanol grau HPLC (20 %) para os 3 analitos, os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram valores maiores que 0,9950, com coeficiente angular da equação da reta significativamente maior que zero, levando em consideração um nível de significância de 5 % (ANVISA, 2017). A injeção de cada nível foi realizada em triplicata e as médias das respostas foram utilizadas para cálculo. Foram realizados testes de Grubbs (G) para avaliação de valores extremos, onde os valores foram menores que G tabelado de 1,15 e todos os níveis

foram aprovados (GRUBBS, 1950). Foram realizados testes Cochran (C) para avaliar a variância dos níveis de concentração, onde os valores foram menores que de C tabelado de 0,684 e todos os níveis foram aprovados (COCHRAN, 1950). Foram realizados testes de Shapiro-Wilk (W) para avaliar a normalidade dos resíduos, onde não se rejeitou a normalidade pois os valores foram maiores que o W tabelado de 0,881 e os níveis foram aprovados (SHAPIRO; WILK, 1965). E foram realizados testes de Durbin-Watson (DW) para avaliar a independência dos resíduos, onde não foi rejeitada a independência dos resíduos pois os valores foram maiores que o DW tabelado de 1,75 e os níveis foram aprovados (DURBIN; WATSON, 1950).

O método foi considerado seletivo, pois os 3 analitos apresentaram uma boa homogeneidade espectral na concentração de 0,6 µg/mL e não foram detectadas impurezas nos picos nesta concentração. E os picos dos analitos apresentaram resolução da linha de base entre picos maiores que 1,5.

Para os parâmetros de precisão de repetibilidade, exatidão e o LQ foram feitas

						3 curvas preparadas
R ² *	LD*	LQ**	Precisão**	Recuperação média**	Sinal ruído	individualmente, que
	µg/mL	µg/mL	DPR%	%	(S/N)	contemplaram o
MC-RR	0,9961	0,148	1,4	104,6	23	intervalo da curva de
			7,1	89,6	26	calibração no nível
			7,6	93,3	26	mais baixo, nível
MC-YR	0,9971	0,174	4,7	87,1	15	mais baixo, nível
			5,5	93,7	17	médio e nível mais
			7,3	100,0	18	alto, ou seja, 0,2, 0,6
MC-LR	0,9978	0,167	4,7	87,4	25	alto, ou seja, 0,2, 0,6
			5,3	89,0	31	e 1,0 µg/mL.
			9,5	89,9	28	

Tabela 2 - Validação do método para a matriz água, com a linearidade (R²), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão de repetibilidade (DPR%), exatidão (recuperação média). *As concentrações utilizadas para esse parâmetro foi de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 µg/mL; ** As concentrações utilizadas para esse parâmetro foi de 0,2, 0,6 e 1,0 µg/mL. Fonte: arquivo do autor.

O LD foi calculado multiplicando o desvio padrão por 3,3 e dividindo pela inclinação da curva de calibração. A precisão foi aprovada para os 3 analitos pois o desvio padrão relativo (DPR) ≤ 11 %. Para a exatidão o critério de aceitação foi uma recuperação de 80 e 110 % e todos os níveis foram aprovados. A exatidão foi quantificada dividindo a concentração experimental pela teórica e depois multiplicando por 100. E para o LQ, usando-se nível mais baixo de 0,2 $\mu\text{g/mL}$, foi considerado um valor de sinal ruído (S/N) do pico ≥ 10 juntamente com os critérios da precisão e exatidão, e o nível mais baixo foi aprovado (ANVISA, 2017) (tabela 2).

2.9 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINAS

As microcistinas nas amostras de filtrado e as amostras de biomassa foram calculadas de acordo com as fórmulas (A.1) e (A.2) para a obtenção da concentração das MCs na amostra inicial (ISO 20179, 2005).

$$(A.1) \quad \rho_{\text{MC,fil}} = \frac{(y-b) \cdot V_r}{a \cdot V_{\text{am}}}$$

Onde, $\rho_{\text{MC,fil}}$ é a concentração de cada microcistina no filtrado em micrograma por litro, $\mu\text{g/L}$; V_r é o valor de ressuspensão em mililitros, mL; V_{am} é o valor da amostra em litros, L; y , b , a são valores da curva de linearidade.

$$(A.2) \quad \rho_{\text{MC,bio}} = \frac{(y-b) \cdot f \cdot V_{\text{ex}}}{a \cdot V_{\text{am}}}$$

Onde, $\rho_{\text{MC,bio}}$ é a concentração de cada microcistina na biomassa em micrograma por litro, $\mu\text{g/mL}$; V_{ex} é o volume de extração em mililitros, mL; V_{am} é o valor da amostra em mililitros, mL; f é o fator de diluição no passo da extração; y , b , a são valores da curva de linearidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 QUALIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS

A quantificação das amostras fitoplanctônicas foi realizada em amostras cujos dados de Clorofila *a* ultrapassaram 5 mg/L, assim se destacando da amostragem e indicando possíveis florações algais. Dentre estas, as maiores concentrações de

células por mL de água foram registradas em Suruacá (fevereiro-22),

onde registrou-se 37889 cel/mL, seguida de Suruacá (setembro-21)

com 11074 cel/mL e a menor concentração foi registrada em Apacê (junho-21) com 1974 cel/mL.

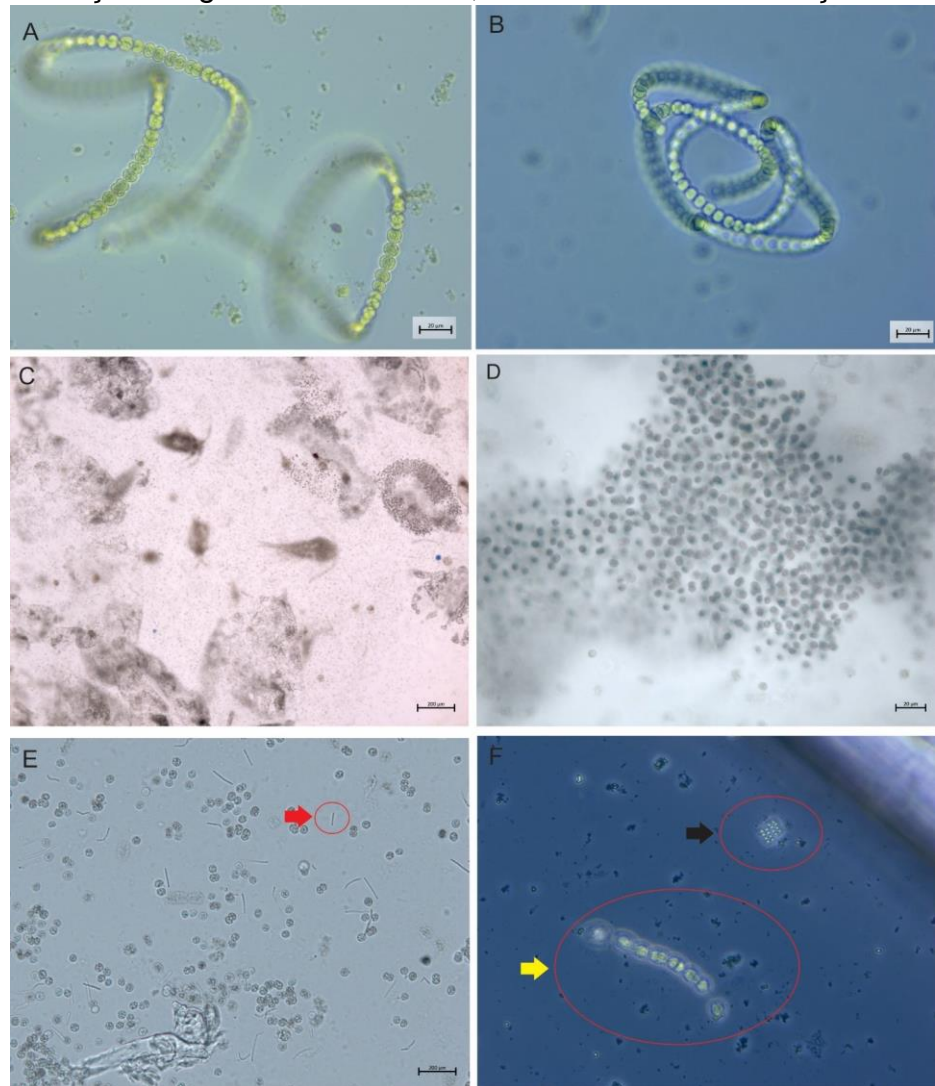


Figura 6 – Espécies de cianobactérias que predominaram nas amostras e foram as formadoras das florações registradas. A, B. *Dolichospermum circinalis*. C, D. *Aphanocapsa sp.1.*. E. Seta vermelha: espécie de cianobactéria (*Pseudanabaena cf. mucicola*) acompanhante de florações de cianobactérias. F. seta preta: *Merismopedia sp.*, Seta amarela: filamento de *Dolichospermum circinalis*. Fonte: arquivo Dávia Talgatti

Nas amostras com maiores números de células contadas ocorreu a dominância de espécies de cianobactérias do gênero filamentoso *Dolichospermum*, enquanto nas amostras com menor número de células ocorreu maior diversidade de espécies, com registros de diatomáceas (principalmente gênero *Aulacoseira*) e *Chlorophyta*

(principalmente do gênero *Dictyosphaerium* e da classe *Chlorophyceae*), além de *Dinophyta* e cianobactérias coloniais.

As análises qualitativas mostraram a predominância de cianobactérias na maioria das amostras. Abaixo são apresentadas as imagens das principais espécies registradas durante a amostragem.

3.2 OCORRÊNCIA DE MICROCISTINAS EM ÁGUAS DO RIO TAPAJÓS

Os resultados mostraram que em doze amostras foram detectadas microcistinas. Sendo que, dez (26,31%) subamostras na fração extracelular e quatro (10,53%) subamostras na fração intracelular. Duas delas foram detectadas tanto intra como extracelular. A maior frequência foi de microcistina-LR (31,58%), detectadas e quantificadas nas subamostras 17b, 21f, 22b, 23f, 24f, 25f, 26f, 27f, 28f, 29f, 30f e 32f. Em duas subamostras (25b e 27b) a MC-LR foi detectada, porém não foi quantificada por estar abaixo do limite de quantificação. Anteriormente, em um estudo semelhante ao nosso, a MC-LR foi o congênere dominante em 64% das amostras de águas analisadas na Bélgica e Luxemburgo (WILLAME et al., 2005).

Os teores de MC-LR variaram de 0,149 a 1,353 µg/L na fração extracelular e de 0,060 a 0,120 µg/mL na fração intracelular. Somente na subamostra 25f foi identificada a MC-RR. Não foi detectada a MC-YR em nenhuma das amostras. Quatro amostras de água foram retiradas em florações de cianobactérias, mas somente em uma delas foi detectada MC (subamostra 17b). Logo, na maioria das amostras detectadas MCs não encontramos floração aparente. As MCs detectadas nestas amostras podem ter sido adsorvidas ao sedimento, que é misturado na coluna d'água, principalmente em períodos de níveis fluviométricos mais baixos do rio Tapajós, na vazante Set-2021 (8,52 m) e seca Nov-2021 (6,45 m) (figura 4). A adsorção de microcistinas a sedimentos foi estudada por Tsuji et al., (2001) em lagos japoneses, onde 60% das onze amostras coletadas em sedimentos apresentaram resultados positivos

para MC. Em um outro estudo foi verificada a eficiência da remoção de MC-LR por 381
 sedimento de argila natural, obtendo um resultado de 81% de remoção de MC da água 382
 potável (MORRIS et al., 2000). Mostrando dessa forma que parte das MCs ficam 383
 adsorvidas aos sedimentos. À jusante da amostra 31, coletada em uma floração de 384
 cianobactérias, foi encontrada MC na fração extracelular, possivelmente decorrente 385
 da floração próxima (tabela 3). 386

Identif. Pontos amostragem	Ident. subamostra	Data Coleta	Rio Tapajós Cota	extracelular ($\mu\text{g/L}$)/intracelular ($\mu\text{g/mL}$)		
				MC-RR	MC-YR	MC-LR
1 (P2)	1f/1b	10/11/2020	5,28	ND/ND	ND/ND	ND/ND
2 (P5)	2f/2b	11/11/2020	5,28	ND/ND	ND/ND	ND/ND
3 (P6)	3f/3b	12/11/2020	5,59	ND/ND	ND/ND	ND/ND
4 (P7)	4f/4b	12/11/2020	5,59	ND/ND	ND/ND	ND/ND
5 (P8)	5f/5b	13/11/2020	5,59	ND/ND	ND/ND	ND/ND
6 (P9)	6f/6b	14/11/2020	5,59	ND/ND	ND/ND	ND/ND
7 (P10)	7f/7b	15/11/2020	5,59	ND/ND	ND/ND	ND/ND
8 (P1)*	8f/8b	17/11/2020	5,59	ND/ND	ND/ND	ND/ND
9 (P4)	9f/9b	09/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
10 (P3)	10f/10b	10/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
11 (P6)	11f/11b	10/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
12 (P5)	12f/12b	10/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
13 (P7)	13f/13b	11/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
14 (P8)	14f/14b	12/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
15 (P9)	15f/15b	13/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
16 (P10)	16f/16b	14/06/2021	11,02	ND/ND	ND/ND	ND/ND
17 (P3)*	17f/17b	02/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	ND/0,120
18 (P4)*	18f/18b	02/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	ND/ND
19 (P5)	19f/19b	04/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	ND/ND
20 (P6)	20f/20b	04/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	ND/ND
21 (P7)	21f/21b	04/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	0,231/ND
22 (P8)	22f/22b	05/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	ND/0,060
23 (P9)	23f/23b	06/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	1,353/ND
24 (P10)	24f/24b	07/09/2021	8,52	ND/ND	ND/ND	0,732/ND
25 (P11)	25f/25b	07/09/2021	8,52	0,541/ND	ND/ND	0,279/<LQ
26 (P3)	26f/26b	15/11/2021	6,45	ND/ND	ND/ND	0,278/ND
27 (P6)	27f/27b	16/11/2021	6,45	ND/ND	ND/ND	0,530/<LQ
28 (P7)	28f/28b	17/11/2021	6,45	ND/ND	ND/ND	0,342/ND
29 (P8)	29f/29b	18/11/2021	6,45	ND/ND	ND/ND	0,273/ND
30 (P10)	30f/30b	20/11/2021	6,45	ND/ND	ND/ND	0,246/ND
31 (P4)*	31f/31b	05/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND

32 (P3)	32f/32b	06/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	0,149/ND
33 (P6)	33f/33b	06/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND
34 (P5)	34f/34b	07/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND
35 (P7)	35f/35b	07/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND
36 (P8)	36f/36b	08/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND
37 (P9)	37f/37b	09/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND
38 (P10)	38f/38b	10/02/2022	10,43	ND/ND	ND/ND	ND/ND

Tabela 3 - Concentração de microcistinas em águas do rio Tapajós, nas cinco expedições e diferentes cotas fluviométricas do rio, nas frações do filtrado (extracelular) em $\mu\text{g/L}$ e da biomassa (intracelular) em $\mu\text{g/mL}$. ND: não detectado; <LQ: a toxina foi detectada (LD), mas estava abaixo do limite de quantificação (LQ); *: amostras coletadas em florações de cianobactérias. Fonte: arquivo do autor.

Pela primeira vez microcistinas são detectadas em água superficial no rio Tapajós acima do município de Santarém. Os valores encontrados neste estudo, variando de 0,149 a 1,353 $\mu\text{g/L}$ na fração extracelular, estavam abaixo do valor máximo recomendado pela OMS de 24 $\mu\text{g/L}$ para MCs em água de recreação (WHO, 2020). Outros dois estudos corroboram com nossos resultados, pois encontraram microcistinas em níveis baixos na foz do rio Tapajós. O primeiro deles quantificou através de método de HPLC e ELISA níveis de MC-LR a 0,23 e 0,55 $\mu\text{g/L}$ em duas amostras de águas de praias próximas à Santarém (SÁ et al., 2010). O outro estudo quantificou pelo método ELISA MC-LR em todas as amostras do período (outubro-2010 a setembro-2011) e em níveis de 0,010 a 0,103 $\mu\text{g/L}$ (SILVA; PELEJA; MELO, 2019).

Dos pontos que foram detectadas MCs (12/38) em seis (50%) deles confirmados no período de vazante, em cinco (42%) confirmados no período de seca e em um (8%) confirmado no período de enchente. Nenhuma amostra foi confirmada no período de cheia do rio Tapajós (figura 7).

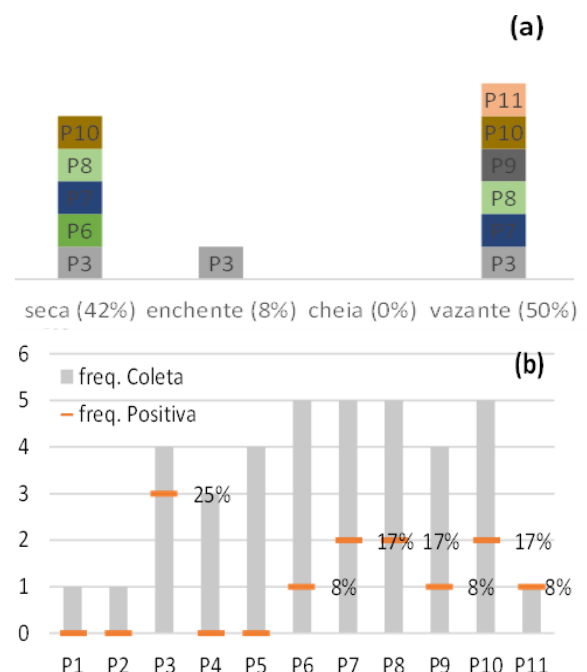


Figura 7 – Em (a) são os pontos positivos para microcistinas em relação ao período de seca, de enchente, de cheia e de vazante do rio Tapajós. Em (b) é a frequência de coleta dos pontos amostrados no rio Tapajós em relação a frequência de amostras positivas. Fonte: arquivo do autor.

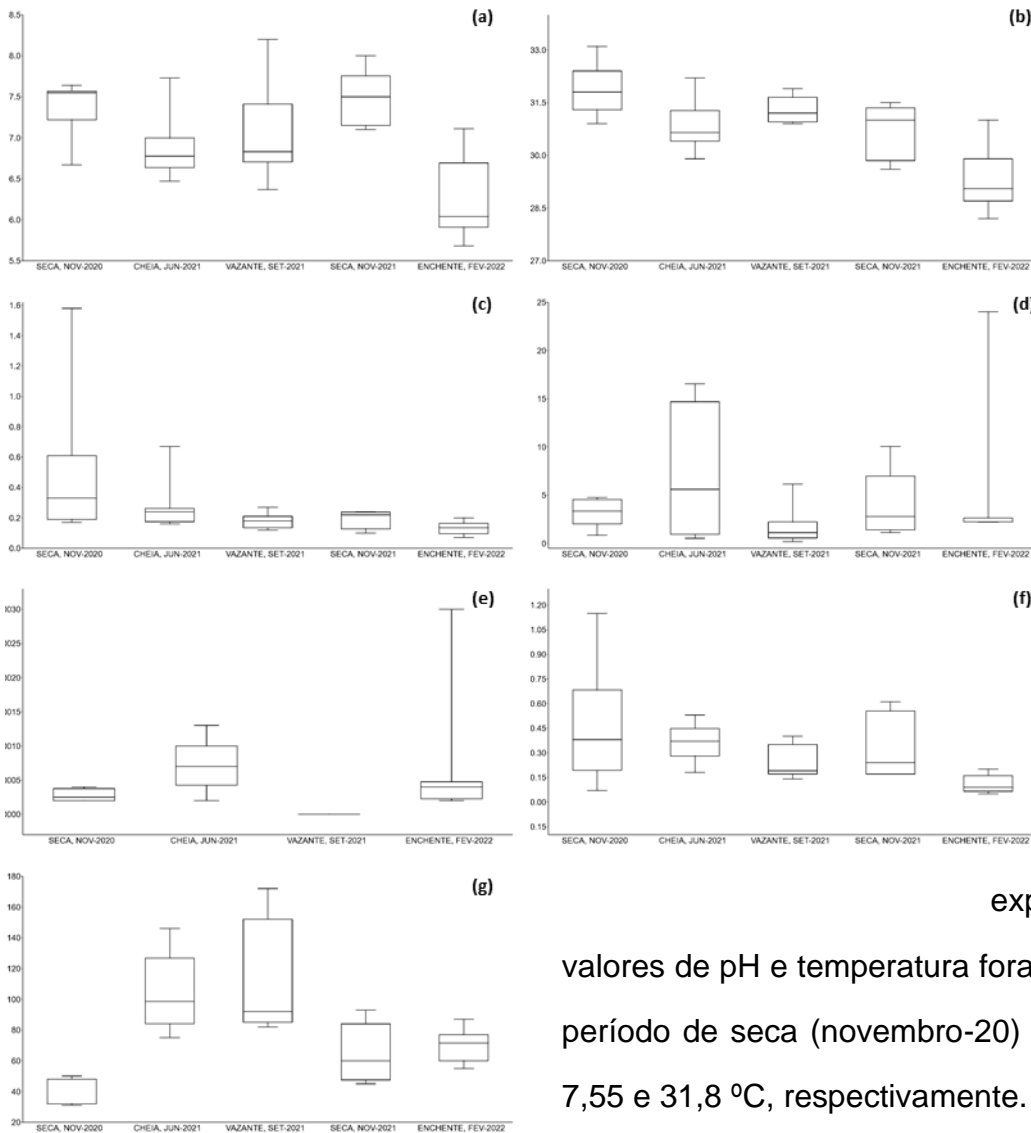
A comunidade de Parauá (P3) apresentou uma maior frequência de MCs com três amostras positivas das quatro coletadas (figura 7b). Dos dois pontos amostrados na margem direita do rio Tapajós somente na comunidade de Cauaçu-Epá (P7) foi detectada MC. Dos sete pontos amostrados na margem esquerda do rio em quatro comunidades foram detectadas de MCs, em Parauá (P3), Apacê (P6), Itaituba (P10) e Itaituba montante (P11). Nas duas comunidades com os dois pontos amostrados na região central do rio, Barreiras (P8) e Santarenzinho (P9) foram detectadas MCs.

Em rios da Argentina foi encontrada a MC-LR em amostras de água superficial, no valor de 8,6 µg/L no rio De La Plata e a 1,9 µg/L no rio Paraná (AGUILERA et al., 2018). Em nosso estudo a maior concentração encontrada (1,353 µg/L), sugere que em sistemas lóticos a concentração de MCs é menor que em sistemas lênticos. Entretanto, em rios, isso não deve ser observado quando escórias ou espumas de cianobactérias se acumulam nas margens (em enseadas), podendo produzir MCs a níveis perigosos. O direcionamento do vento é um fator relevante a ser considerado, pois ajuda neste acúmulo de cianobactérias. As amostras 8 (Alter do Chão), 17 (Parauá), 18 (Suruacá) e 31 (Suruacá) foram amostradas em florações, mas não encontramos acúmulos densos de cianobactérias nas margens do rio Tapajós. Em espumas de cianobactérias no rio Swartspruit na África do Sul foram encontradas concentrações elevadas de MC-LR (270 µg/g peso seco (ps)), de MC-RR (141,5 µg/g ps) e de MC-YR (72,28 µg/g ps), mostrando que concentrações elevadas de MCs nas espumas e escórias podem ser uma fonte de contaminação importante.

A MC-LR quantificada na amostra 24 (0,732 µg/L), em frente a cidade de Itaituba (P10), e próximo ao ponto de captação da ETA da cidade, traz preocupação, pois apesar da concentração estar abaixo do VMP a amostragem desse estudo foi

pontual, e recomenda-se fortemente o monitoramento periódico deste local. Além disso, indica-se mais estudos na água potável da estação, para identificar não somente cianobactérias, mas sobre a eficiência da remoção das microcistinas presentes na água do rio Tapajós. Em uma ETA no rio Nilo, Egito, por exemplo, o tratamento aplicado na água captada não foi eficiente e foram detectadas MCs em níveis 0,37 a 3,8 µg/L na água potável (MOHAMED, 2016).

3.3 PARÂMETROS AMBIENTAIS



Ao analisarmos os parâmetros ambientais observamos diferenças significativas entre os períodos fluviométricos do rio Tapajós, no conjunto de resultados por

expedição. Maiores valores de pH e temperatura foram encontrados no período de seca (novembro-20) com medianas de 7,55 e 31,8 °C, respectivamente.

Figura 8 – Gráficos de Box Plox com a mediana e sem os valores de outliers (a) de pH, (b) de temperatura, (c) de amônia, (d) de clorofila a, (e) de fósforo total, (f) de nitrato e (g) de extinção de disco de Secchi. Fonte: arquivo do autor.

No período de seca (novembro-20) foram registrados maiores valores de amônia e nitrato, com medianas de 0,33 mg/L e 0,38 mg/L. Os parâmetros de clorofila *a* e de fósforo total tiveram um pico na enchente (fevereiro-22), mas a maior mediana foi no período de cheia (junho-21), com valores de 5,61 mg/L e 0,0007 mg/L, respectivamente. Menores valores de clorofila *a* foram registrados em período de vazante (setembro-21). Já para fósforo total nos períodos de vazante (setembro-21) e seca (novembro-21) os valores estavam abaixo do limite quantificação. A maior cota registrada (11,02 metros), período de cheia (junho-21), correspondeu com a maior mediana do parâmetro de extinção de disco de Secchi (98,50 cm). E a menor cota registrada (5,28 cm) teve a menor mediana (32 cm) no período de seca (novembro-20) (figura 8).

A transparência do rio Tapajós, de acordo com a comparação dos nossos dados com dados pretéritos, sofreu uma mudança radical durante as últimas três décadas de intensa colonização (ROULET et al., 2000). Em nosso estudo a transparência máxima foi de 172 cm (Suruacá, setembro-21), diferente do estudo realizado em 2011 (SILVA; PELEJA; MELO, 2019), no rio Tapajós, numa região mais próxima a Santarém (praia Maracanã), onde a transparência máxima foi de 260 cm.

3.4 ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (ACP)

Foi feito o teste de correlação linear de Pearson entre as variáveis ambientais (pH, temperatura, amônia, clorofila *a*, fósforo total, nitrato e extinção de disco de Secchi) e essas foram mantidas no estudo por terem uma relação com o crescimento de cianobactérias. Os parâmetros foram padronizados e em seguida, efetuamos uma análise de componente principal com a adição das microcistinas (soma dos valores da porção extracelular) (tabelas 4 e 5, e figura 7).

	PC 1	PC 2
pH	0,53738	-0,14452
Temp. (°C)	0,55832	-0,039279

Amônia (mg/L)	0,39107	0,38315
Clof a (mg/L)	-0,056402	0,31473
FT (mg/L)	-0,24565	0,43015
Nitrato (mg/L)	0,41509	0,1446
Extinção Secchi (cm)	-0,092582	-0,43448
ΣMC's	0,046636	-0,58052

Tabela 4 - Loadings da análise de componente principal entre as variáveis ambientais e as microcistinas (soma da fração extracelular) com os componentes principais 1 e 2. Fonte: arquivo do autor.

PC	Eigenvalue	% variance
1	2,01614	25,20
2	1,40994	17,62
3	1,11083	13,89
4	0,91725	11,47
5	0,82794	10,35
6	0,75625	9,45
7	0,60487	7,56
8	0,35678	4,46

Tabela 5 - Autovalores da análise de componente principal entre as variáveis ambientais e as microcistinas (soma da fração extracelular). Fonte: arquivo do autor.

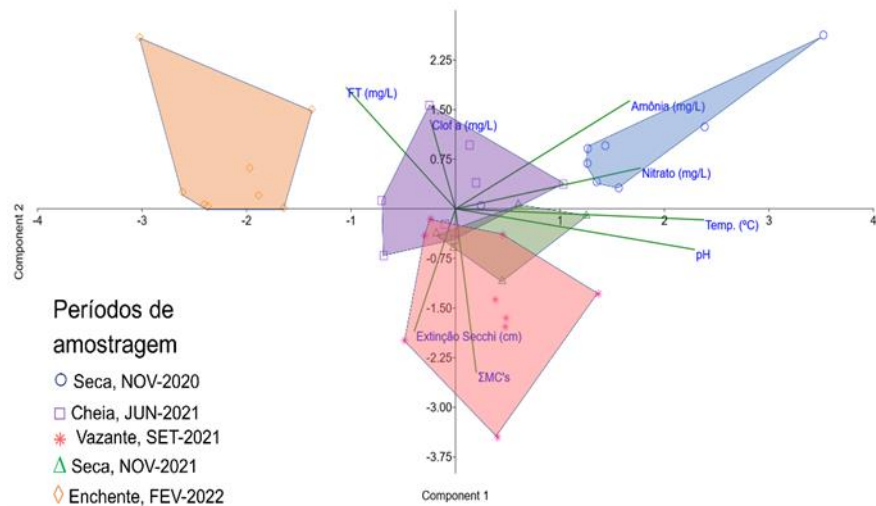


Figura 9 – Análise de componente principal (ACP) das variáveis ambientais (pH, temperatura, amônia, clorofila a, fósforo total, nitrato e extinção de disco de Secchi) e as microcistinas (soma da fração extracelular) nos períodos de seca (NOV-2020), cheia (JUN-2021), vazante (SET-2021), seca (NOV-2021) e enchente (FEV-2022). Fonte: arquivo do autor.

Os testes estatísticos de ACP mostram uma ordenação entre os períodos de amostragem. Os autovetores de pH e temperatura tiveram um peso grande na análise

com mais de 50%, coincidindo com o valor máximo de pH (8,20) na comunidade de Suruacá (vazante, Set-2021) e com a temperatura máxima (33,1 °C) na comunidade de Surucúá (seca, Nov-2020). Os autovetores de Σ MCs e extinção de disco de Secchi se correlacionam principalmente nos períodos de vazante (Set-2021) e seca (Nov-2021) do rio Tapajós. O autovetor de clorofila *a*, que poderia indicar uma maior concentração de MCs, estava mais correlacionado com períodos de enchente (Fev-2022) e cheia (Jun-2021), com o máximo de 24,01 mg/L na comunidade de Suruacá, Fev-2022. O autovetor de FT (Fósforo Total) teve uma correlação inversa com as Σ MCs, apresentando uma maior ordenação com o período de enchente (Fev-2022) e cheia (Jun-2021) do rio. Os autovetores de amônia e nitrato tiveram um peso baixo, menor que 40%, e uma correlação inversa com as Σ MCs, apresentando um maior ordenamento com os períodos de seca (Nov-2020) e cheia (Jun-2021) do rio. Maiores concentrações de nutrientes (FT e nitrato) e transparência na cheia (Jun-2021) do rio Tapajós, podem ter ajudado na produção de cianotoxinas. O fósforo e o nitrogênio são os nutrientes mais utilizados nas demandas de divisão e crescimento celular de cianobactérias. E a transparência, que permite que a luz a penetre, também é um pré-requisito para o crescimento. Com isso, após se desenvolverem e aumentarem a quantidade de células durante a cheia, as cianobactérias podem ter produzido as cianotoxinas detectadas em diversos pontos em períodos posteriores, no caso vazante (Set-2021) e seca (Nov-2021) do rio Tapajós. Com mais frequência na área mais estreita do rio (P7-P11) e na comunidade de Parauá (P3) (figura 6b). A região da comunidade Parauá, apresenta locais de enseada, o que pode ter facilitado o acúmulo de células vivas e mortas de cianobactérias e conseqüentemente o registro de cianotoxinas.

A crescente ação humana na região em torno do rio Tapajós, com despejos de esgotos não tratados, desmatamento, garimpos ilegais e plantações agrícolas de grande porte leva ao carreamento de nutrientes para o rio (TNC, 2021). E com as

condições de temperatura, iluminação abundante, enseadas e as águas, no geral 527
claras do rio Tapajós proporcionam um ambiente favorável para florações de 528
cianobactérias e produção de cianotoxinas. A população ribeirinha do rio Tapajós 529
deste trecho, as que dependem mais do rio, pode estar mais suscetível a 530
contaminações por microcistinas, pois o tratamento das águas superficiais para 531
consumo é praticamente inexistente ou ainda pelo consumo de peixes contaminados. 532

4. CONCLUSÃO 533

A análise dos dados revelou que nenhuma amostra de águas do rio Tapajós 534
ultrapassou o limite máximo recomendado pela OMS de 24 µg/L para água de 535
recreação, contudo é preocupante a quantidade de amostras contendo cianotoxinas 536
no rio Tapajós, tendo em vista que as comunidades ribeirinhas consomem diariamente 537
estas águas. 538

Os resultados mostrados na ACP mostraram que teve um maior ordenamento 539
da presença de MCs com períodos de vazante (Set-2021) e seca (Nov-2021), com 540
maior peso em autovetores de temperatura, pH e extinção de disco de Secchi. Os 541
registros de maiores valores de fósforo total na enchente e cheia indicam que as 542
cianobactérias começam a se desenvolver e se reproduzem rapidamente utilizando 543
este nutriente e posteriormente, por muitas serem fixadoras de nitrogênio, conseguem 544
se manter nos períodos fluviométricos seguintes (vazante e seca). Estes dados são 545
inéditos para a região e para ambientes lóticos no Brasil. 546

REFERÊNCIAS 547

AGUILERA, A. et al. Bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins in Argentina: A 549
growing health and environmental concern. *Limnologia*, v. 69, p. 103–114, 1 mar. 550
2018. 551

- ANA. **HIDROSAT - Monitoramento hidrológico e de qualidade de água por satélite.** Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrjoiMmEyNGVmYzMtOTRiYi00YWVjLWE2ODEtZGEyZTk4Zjk0MmZiliwidCI6ImUwYml0MDEyLTgxMGItdmY5YS04YjRkLTY2N2ZjZDFiYWY4OCJ9&pageName=ReportSectioned2c5e25da7506ae9c47>>. Acesso em: 26 ago. 2022. 552-553-554-555-556-557
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 - Validação de Métodos Analíticos.** , 2017. 558-559
- BIORENDER. **BioRender.** Disponível em: <<https://app.biorender.com/illustrations>>. Acesso em: 20 jun. 2022. 560-561
- BRASIL. **PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021 - PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021 - DOU - Imprensa Nacional.** , 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>>. Acesso em: 11 out. 2022 562-563-564-565
- BURATTI, F. M. et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1049–1130, 1 mar. 2017. 566-567-568
- CHORUS, I.; WELKER, M. **Toxic Cyanobacteria in Water; A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.** Second Edition ed. [s.l: s.n.]. 569-570
- COCHRAN, W. G. The Comparison of Percentages in Matched Samples. **Biometrika**, v. 37, n. 3/4, p. 256, dez. 1950. 571-572
- DURBIN, J.; WATSON, G. S. TESTING FOR SERIAL CORRELATION IN LEAST SQUARES REGRESSION. I. **Biometrika**, v. 37, n. 3–4, p. 409–428, 1 dez. 1950. 573-574
- FOURNIER, C. et al. Is Toxin-Producing Planktothrix sp. an Emerging Species in Lake Constance? **Toxins**, v. 13, n. 9, p. 666, 17 set. 2021. 575-576
- GARCIA-PICHEL, F. et al. Timing the evolutionary advent of cyanobacteria and the later great oxidation event using gene phylogenies of a sunscreen. **mBio**, v. 10, n. 3, 1 maio 2019. 577-578-579
- GRUBBS, F. E. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. **The Annals of Mathematical Statistics**, v. 21, n. 1, p. 27–58, mar. 1950. 580-581
- HAMMER, Ø. PAST PAleontological STatistics Reference manual. 1999. 582
- ISO 20179. **Water Quality – Determination of microcystins – Method using solid phase extration (SPE) and hight performance liquid chromatography (HPLC) with ultravioleta (UV) detection.** , 2005. 583-584-585

-
- KAMOGAE, M.; HIROOKA, E. Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 5, p. 1189–1200, 2000. 586
587
- LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. **Analyst**, v. 11, p. 1525–1530, jul. 1994. 588
589
590
- MICROSOFT. **Excel 365**. , 2022. 591
- MOHAMED, Z. A. Breakthrough of *Oscillatoria limnetica* and microcystin toxins into drinking water treatment plants-examples from the Nile River, Egypt. **Water SA** , v. 42, n. 1, p. 161–165, 2016. 592
593
594
- MORRIS, R. J. et al. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 303–308, fev. 2000. 595
596
- PAERL, H. W. et al. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. **Harmful Algae**, v. 54, p. 213–222, 2016. 597
598
599
- POURIA, S. et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **THE LANCET** , v. 352, n. 9121, p. 21–26, 4 jul. 1998. 600
601
- ROULET, M. et al. Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon¹The present investigation is part of an ongoing study, the CARUSO project (CRDI-UFPa-UQAM), initiated to determine the sources, fate and health effects of the presence of MeHg in the area of the Lower Tapajós. **Chemical Geology**, v. 165, n. 3–4, p. 243–266, abr. 2000. 602
603
604
605
606
- SÁ, L. L. C. DE et al. Occurrence of toxic cyanobacterial bloom in the left margin of the Tapajós river, in the Municipality of Santarém (Pará State, Brazil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 159–166, mar. 2010. 607
608
609
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3–4, p. 591–611, 1 dez. 1965. 610
611
- SILVA, S. C. F. DA; PELEJA, J. R. P.; MELO, S. Flutuação temporal de cianotoxinas (Microcistina) no rio Tapajós (Santarém, Amazônia-Brasil). **Scientia Plena**, v. 15, n. 8, 26 set. 2019. 612
613
614
- SUKENIK, A.; QUESADA, • A; SALMASO, • N. Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. **Biodivers Conserv**, v. 24, p. 889–908, 2015. 615
616
617

-
- SVIRČEV, Z. et al. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health - Part C**, v. 28, n. 1, p. 39–59, jan. 2010. 618
619
620
- SVIRČEV, Z. et al. **Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. Archives of Toxicology** Springer Verlag, , 1 set. 2019. 621
622
623
- TNC. **Análise das normativas e conhecimento dos ribeirinhos sobre o acesso à água doce, pesca e recursos associados na bacia do rio Tapajós.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.tnc.org.br>. 624
625
626
- TSUJI, K. et al. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 687–692, 1 maio 2001. 627
628
- UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. **SIL Communications, 1953-1996**, v. 9, n. 1, p. 1–38, jan. 1958. 629
630
- WHO. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 2020. 631
632
- WILLAME, R. et al. Distribution of hepatotoxic cyanobacterial blooms in Belgium and Luxembourg. **Hydrobiologia**, v. 551, p. 99–117, 2005. 633
634