



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde

P.A.



ANEXO B FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA



ANEXO B – Formulário de Apresentação do Projeto de Pesquisa

1 – CARTA DE ENCAMINHAMENTO

(Nome / Sigla)

PROPONENTE (Instituição responsável pelo convênio): UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPIRITO SANTO - UFES

(Nome / Sigla)

COORDENADOR DA PESQUISA: SERVIO TULIO ALVES CASSINI

(Título / Sigla)

PROJETO: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA CROMOFLUOROGÊNICO QUALITATIVO (P/A)
DE AVALIAÇÃO DE MICROCISTINA VISANDO O SUPORTE AS AÇÕES DE VIGILÂNCIA
QUALIDADE DE ÁGUAS (MICROCIST)

À Fundação Nacional de Saúde

Encaminhamos proposta para obtenção de apoio financeiro do Programa de Pesquisa em Saúde e Saneamento e declaramos que os participantes qualificados no **Item 1.1 - Dados Cadastrais**, deste formulário, endossam o projeto acima identificado, nos termos apresentados detalhadamente a seguir.

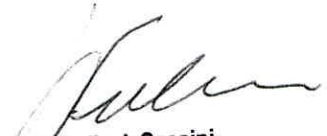
Esta declaração deve ser considerada como manifestação explícita quanto à oportunidade, interesse e prioridade conferida ao desenvolvimento do projeto ora proposto, assim como o comprometimento de que serão fornecidas as garantias necessárias para sua adequada execução, incluindo o envolvimento de equipes e outras condições específicas deste formulário.

Data: 10 de outubro de 2011

Assinaturas: (identificar)


Gilberto Costa Drumond Sousa
Diretor Centro Tecnológico UFES


Edumar Ramos Cabral Coelho
Chefe Departamento Engenharia Ambiental UFES


Servio Tulio A. Cassini
COORDENADOR DA PESQUISA



12
10

1.1 – Dados de Cadastro

1.1.1 - Proponente		
Nome : UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO		
Sigla UFES	CNPJ 32.479.123/0001-43	
Endereço Completo AV FERNANDO FERRARI 541 GOIABEIRAS		Cidade/UF VITORIA ES
CEP 29075-910	Telefone 27 33352111	Fax 27 33352165
Nome do Dirigente Gilberto Costa Drumond Sousa		
E-mail: DIRETOR@CT.UFES.BR		

Contato

Nome SERVIO TULIO ALVES CASSINI
Telefone 27 33352111
E-mail scassini@npd.ufes.br

1.1.2 – Departamento ou setor responsável pelo projeto - Executora		
Nome DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AMBIENTAL		
Sigla DEA	CNPJ 32.479.123/0001-43	
Endereço Completo AV FERNANDO FERRARI 541 GOIABEIRAS		Cidade/UF VITORIA ES
CEP 29075-910	Telefone 27 33352111	Fax 27 33352165
Nome do Dirigente EDUMAR RAMOS CABRAL COELHO		
E-mail: EDUMAR@CT.UFES.BR		

Contato

Nome SERVIO TULIO ALVES CASSINI
Telefone 27 33352111
E-mail scassini@npd.ufes.br

Coordenador da Pesquisa

Nome SERVIO TULIO ALVES CASSINI		
Endereço Completo AV ANT GIL VELOSO 1'230 903		
Cidade/UF VILA VELHA ES		CEP 29101-010
Telefone 27 30626908	Fax	
Email scassini@npd.ufes.br		



13
09

1.1.3 - Outras instituições participantes ou colaboradores		
Nome Companhia Estadual de Saneamento do Espírito Santo		
Sigla CESAN	CNPJ 28151363/0001-47	
Endereço Completo Av. Governador Bley, 186, Edifício BEMGE, 3º Andar, Centro - Vitória - ES CEP: 29.010-150	Cidade/UF Vitória ES	
CEP 29010-150	Telefone Tel: (27) 2127- 5353/5000 (geral)	Fax
Nome do Dirigente Neivaldo Bragato		
E-mail neivaldo.bragato@cesan.com.br		

Contato

Nome Elza de Abreu Costa
Telefone 27 2127 6862
E-mail elza.abreu@cesan.com.br

1.2 - Informações Institucionais da Executora

Histórico

O Departamento de Engenharia Ambiental (DEA) da UFES agr :ga O programa de Pós-graduação em Engenharia ambiental (PPGEA) UFES desde 1989 com os cursos de Mestrado e Doutorado em Engenharia Ambiental com 65 alunos e 13 docentes permanentes. Desde 2009 congrega também o curso de Pós-Graduação em Engenharia de Saúde Pública e Desenvolvimento Sustentável. O programa de pos-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) e Programa de Saude Publica são aprovado pela CAPES e têm atualmente nota 4,0 (quatro) na sua avaliação trienal. O Departamento oferece também cursos de Especialização em Engenharia e Segurança do Trabalho e Meio Ambiente desde 2003.

Participação PROSAB

O Departamento de Engenharia Ambiental vem participando desde 1996 dos editais FINEP-PROSAB na forma de participante da rede ou coordenação da Rede de Pesquisas. Os produtos dessa intensa e proficua atuação pode ser avaliada pelas publicações disponíveis no site produtos PROSAB, atestando esta ativa participação:

<http://www.finep.gov.br/prosab/produtos.htm>

Recursos Humanos

O Departamento de Engenharia Ambiental da UFES conta com cerca de 15 docentes permanentes, sendo 14 deles com doutorado, 1 professor visitante e 02 pós doutorados, nas áreas de saneamento ambiental, recursos hídricos e poluição atmosférica, Todos em Decidação Exclusiva (DE)



14
04

Infraestrutura Física

Sistema de Cromatografia Líquida HPLC (CLAE) prominence 10 SHIMADZU completo

Sistema De Cromatografia a gás SHIMADZU GC-14

Liofilizador

Leitora de Placas Tipo ElisaSonicador de Amostras Real Time PCR

Sistema de análise de Ecotoxicidade Microtox

Sistema de concentração de amostras tipo Rotaevaporador e SEP

Sistema de Adsorção em Fase Solida SPE

Centrifuga refrigerada

Microscópio invertido Leica com foto documentação

Sistema de Preparação de cartelas para colimetria

Estufas e Banhos Maria termoreguláveis

Experiência da Instituição

Experiência e competência da Instituição exclusivamente no tema que se candidata comprovado, por meio de pesquisas, trabalhos publicados, extensão etc. (Detalhar os projetos, trabalhos e pesquisas já desenvolvidos no tema)

Participação editais FUNASA

- "Detecção simplificada de coliformes totais e Escherichia coli em amostras de águas utilizando substrato cromogênico em microplacas e metodologia NMP" Projeto de Pesquisa realizada no âmbito do Edital de pesquisa 2001 da FUNASA e publicada no 3º. Caderno de pesquisa em Engenharia de Saúde Pública FUNASA. 2010 Pg149-176

Participação PROSAB

O Departamento de Engenharia Ambiental DEA-CT-UFES por meio do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da UFES, vem participando, desde 1996 de editais do PROSAB água, esgoto lodos e reuso de águas, na qualidade de coordenação de redes de pesquisa em Saneamento Básico:

- Remoção de contaminantes de águas de Distribuição
- Filtração primária para remoção de contaminantes em águas de distribuição
- Digestão anaeróbia de Lodos e produção de Biogás
- Sistema UASB + biofiltros para tratamentos d esgotos domésticos
- Tratamento e Reuso de águas cinzas em edificações

Estes projetos estão relacionados nos capítulos de livros de publicações PROSAB que podem ser acessadas livremente em <http://www.finep.gov.br/prosab/produtos.htm>



15
09

[Empty rectangular box]

1.3- Dados do Projeto

1.3.1 - Descrição do Projeto

Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA CROMOFLUOROGENICO QUALITATIVO (P/A) DE AVALIAÇÃO DE MICROCISTINA VISANDO O SUPORTE AS AÇÕES DE VIGILANCIA A QUALIDADE DE AGUAS (MICROCIST)

Área Temática: Abastecimento de Água

Linha de Pesquisa:
Água 2 : Instrumentação, sensores e métodos analíticos para monitoramento de águas de abastecimento.

Local de Execução: Vitoria ES., (UFES)

Prazo de Execução: 24 meses

Objetivo Geral (Objeto da Proposta)

Desenvolvimento de Sistema Analítico - Qualitativo de Presença-Ausência (P/A) para Análise de Microcistinas em Amostras de Águas utilizando metodologia de inibição enzimática e detecção visual cromofluorogênica

(Texto limitado em 10 linhas)

Objetivos Específicos (Metas Específicas)

1. Isolar e caracterizar cepas de cianobactérias tóxicas em amostras de águas da região da grande Vitória ES.
2. Realizar o processo de extração de cianotoxinas de cianobactérias isoladas e cultivadas
3. Implementar a rotina analítica de detecção de cianotoxinas por cromatografia líquida (HPLC ou CLAE) livre de acetonitrila.
4. Realizar ensaios de inibição da fosfatase para detecção de cianotoxinas em águas utilizando padrões analíticos e cianotoxinas extraídas de cepas tóxicas.
5. Desenvolver sistema de detecção qualitativa (P/A) de cianotoxinas em amostras de águas

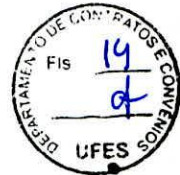
(Número livre de metas – Texto limitado em 03 linhas para cada uma)

Palavras-chave

Cianotoxinas, Microcistinas, HPLC, CLAE, Águas de Abastecimento, Cianobactérias



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde



15
Ry

Justificativa



14
09

JUSTIFICATIVA

O fenômeno da eutrofização de corpos hídricos, especialmente relacionados com captação de águas de abastecimento de regiões urbanas, promove as condições de florações de algas cianobactérias. A presença de algas e cianobactérias alteram significativamente a qualidade de águas por meio das alterações de cor, odor e sabor e, também, a geração potencial de toxinas denominadas genericamente de cianotoxinas (Dorr et al. 2010). A presença de cianotoxinas em corpos d'água inviabiliza os seus múltiplos usos tais como água de distribuição, recreacional além de causar possíveis danos a cadeia alimentar nos corpos hídricos pela potencial de bioacumulação nos diversos níveis tróficos associados (Ibelings and Chorus, 2007; Smith et al., 2008; Galvao et al., 2009; Martins and Vasconcelos, 2009).. No Brasil, apesar da quase universalização do suprimento de água potável e de uma legislação de qualidade de águas bem direcionada para o monitoramento de cianotoxinas, pequenas comunidades (<10.000 habitantes) ainda são particularmente susceptíveis de surtos de doenças e possíveis intoxicações devido a incapacidade de monitoramento contínuo da qualidade de águas de distribuição. Assim, torna-se imperativo o investimento em ações de vigilância da qualidade de águas direcionado para estas comunidades bem como a sua adoção para todo o sistema de monitoramento (De Leon and Yunes, 2001; Azevedo et al., 2002; Frias et al., 2006; Echenique et al., 2008).

As cianotoxinas constituem uma classe de compostos produzidos por cianobactérias que, geralmente, apresentam estrutura química de três tipos principais: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos com efeitos hepatóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos, respectivamente (van Apeldoorn et al., 2007). No Brasil e América do Sul, surtos de cianobactéria em corpos hídricos tem sido reportados em 45% dos estados Brasileiros com ampla distribuição (Norte, Nordeste e Sul), tanto em ambientes naturais quanto em reservatórios artificiais, com predominância dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena* embora mais recentemente com relatos da ocorrência de *Cylindrospermopsis* sp. (Sant'Anna and Azevedo, 2000. (Huszar et al., 1998; Bouvy et al., 2000).

Conforme Dorr et al. (2010) os dados de ocorrência de surtos de cianotoxinas no continente sul-americano são sub-estimados e geralmente não relatados na literatura pertinente. Este fato se deve ser atribuído, entre outras causas, a deficiências dos programas de monitoramento da qualidade de águas dos diversos países e falhas no seu sistema de relatoria desses surtos, os quais devem ser motivo de preocupação constante do setor de saúde pública e ambiental. As principais metodologias de detecção e quantificação de cianotoxinas, principalmente microcistinas em amostras de águas incluem a) Bioensaios; b) HPLC ou CLAE; c) Imuno-ensaios (ELISA); d) Inibição da Fosfatase; e) biologia molecular. A escolha do método mais adequado irá depender do nível e da qualidade de informação que se quer obter, dos equipamentos disponíveis, do custo da análise, de pessoas treinadas e do tempo necessário para a obtenção de resultados, a fim de que em um caso de risco em potencial, as decisões cabíveis sejam tomadas rapidamente. Entretanto, tais metodologias de detecção e quantificação ainda são muito trabalhosas e onerosas, não atendendo aos critérios da legislação de qualidade de águas visando a ampliação das técnicas de monitoramento para pequenas e médias comunidades. Assim, é muito importante que se desenvolva metodologias simplificadas de detecção de cianotoxinas como uma importante ferramenta para aumentar significativamente os aspectos de segurança e a qualidade de águas.

REFERENCIAS

- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181, 441-446.*
- Bouvy, M., Falcao, D., Marinho, M., Pagano, M., Moura, A., 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 23 (1), 13-27.*
- Dorr F.A. et al. / *Toxicon* 56 (2010) 1247-1256.*
- Frias, H.V., Mendes, M.A., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Tomazela, P., Pinto, E., 2006. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 344 (3), 741-746.*
- Galvao, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, M.D., Gouvea-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P., 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia. *Toxicon* 54 (6), 891e894.*
- Heresztyn, T., Nicholson, B.C., 2001. A colorimetric protein phosphatase inhibition assay for the determination of cyanobacterial peptide hepatotoxins by recombinant protein phosphatase 1. *Environmental Toxicology* 16 (3), 242-252.*
- Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S., Marinho, M., Domingos, P., Sant'Anna, C.L., 1998. In: 11th Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP), Shrewsbury, England, pp. 67-77.*
- Ibelings, B.W., Bruning, K., de Jonge, J., Wolfstein, K., Pires, L.M.D., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake. *Microbial Ecology* 49 (4), 487-500.*
- McElhiney, J. L.A. Lawton / *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (2005) 219-230.*
- Martins, J.C., Vasconcelos, V.M., 2009. Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B Critical Reviews* 12 (1), 65-82.*
- Rapala, J., Erkkonen, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., Lahti, K. 2002. 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* 466, 213-231.*
- Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.D., 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71 (3e4), 359-385.*
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V., 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280 (1e4), 5-20.*
- Triantis T. et al. / *Toxicon* 55 (2010) 979-989.*
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (1), 7-60.*



18
19

Metodologia

Amostragens, isolamento e Cultivo de cepas tóxicas

A amostragem de águas para isolamento e cultivo de cepas tóxicas de cianobactérias, será realizada na região da Grande Vitória (RGV), ES., principalmente nas áreas com histórico de presença de cianobactérias tais como Lagoa Jacuném, Duas Bocas e Novo Horizonte. Amostras serão coletadas em Jarros plásticos de 1 L, acondicionadas em caixa de isopor com gelo e transportadas para o Laboratório. As análises serão realizadas no Laboratório de Saneamento (LABSAN) UFES para contagem de cianobactérias utilizando câmara reticulada (Utermohol). Amostras positivas serão processadas para isolamento de cianobactérias utilizando enriquecimento em meio ASM1 e transferências para placas em meio sólido.

Os meios líquidos e placas inoculadas serão incubados em estufa iluminada e mantida a 25°C até turvação completa. Placas de Petri inoculadas serão avaliadas diariamente para presença de colônias que serão transferidas para placas e tubos com Agar inclinado após a constatação de pureza dos isolados de cianobactérias. Gêneros de cianobactérias serão identificados por observação microscópica dos caracteres morfológicos utilizando chaves taxonômicas e sistemas de classificação propostos.

As amostras de águas serão também caracterizadas com parâmetros físico-químico e microbiológico (Série sólidos, DBO, DQO, NTK, Ptotal, Óleos e Graxas, coliformes totais e E. coli) para indicação do estado trófico e presença de material de origem fecal.

Extração de cianotoxinas MC (extratos metanólicos) e Análise em Cromatografia Líquida (HPLC)

As colônias de cianotoxinas isoladas serão avaliadas para a produção de cianotoxinas por meio da produção de biomassa em cultivo axênico. Após centrifugação e sonicação, a biomassa concentrada e processada em metanol, sob agitação contínua por 48-74 h. Os extratos metanólicos serão avaliados para a presença de Microcistinas (MC) de acordo com procedimento padrão ISO 20179 (ISO, 2005) obtidos de cepas de *Microcystis* sp. previamente isoladas e caracterizadas no LABSAN UFES.

Para as análises de quantificação de cianotoxinas por HPLC, amostras de águas de diferentes procedências (Duas Bocas, Jacunem e Novo Horizonte) serão processadas e concentradas por processos de liofilização. As toxinas intracelulares (microcistinas) serão extraídas, após lise celular, com solventes orgânicos tais como metanol, butanol e ácidos diluídos, sendo que a escolha dependerá da eficiência do solvente para extração de toxinas com polaridade diferentes (variantes). A lise celular será feita por processos de "freeze-dried" combinado com sonicação por ultra-som. (Lawton & Edwards, 2001; Almeida et al., 2006)

A análise das microcistinas será realizada por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna escala analítica C18. As microcistinas poderão ser separadas utilizando gradiente isocrático, com vários sistemas solventes (metanol/butanol/acetona). A detecção das microcistinas nos eluatos das cromatografias será realizada por análise em fotodiodo (PDA). Para identificar as classes variantes de microcistinas serão realizadas análises em sistema HPLC acoplado ao sistema de PDA (photo diode array). A informação estrutural das microcistinas obtida por essa metodologia será avaliada como uma assinatura para as toxinas individuais, e poderá ser usada para confirmar a presença de microcistinas depois da separação por HPLC e detecção por PDA.

Ensaio de inibição de fosfatase (PPIA)

Recombinant Protein phosphatase 1 and 2 (PP) from *E. coli* (Sigma). Substratos P-nitrophenyl phosphate (PNP) Verde Malachita e Metil Umbeliferil fosfato (MUP) (Sigma) preparados de acordo com procedimento citado por Heresztyn and Nicholson, (2001) e Triantis et al. 2010.



Amostras de 20 ml serão combinadas com soluções preparadas de PP em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 1,5 h. Após este período a Absorbância (Abs) dos poços será avaliada a 405 nm usando leitora de microplacas. As concentrações de toxinas serão calculadas por meio de curvas de calibração da % de inibição frente aos padrões com controles negativos (brancos) com água ultra pura.

Preparo do sistema de avaliação Presença/Ausência (PA)

A idéia central da nossa proposta é desenvolver uma metodologia colorimétrica na forma de um kit com fitas ou tiras contendo a enzima fosfatase imobilizada, a qual incorporada em pequenos volumes de amostras de água sob análise seguida da adição do substrato paranitrofenilfosfato e incubada sob condições adequadas, pode-se acompanhar o desenvolvimento ou não da coloração do meio aquoso caso não haja presença da cianotoxina. Caso contrário, com a presença da cianotoxina, o meio tende a ficar imutável, sem o desenvolvimento de cor, devido a inibição da enzima fosfatase pela cianotoxina no meio. Esta reação, comparada a uma reação controle sem cianotoxina, pode demonstrar a presença ou ausência da cianotoxina gerando assim, um primeiro nível de alerta para uma posterior quantificação da cianotoxina no meio.

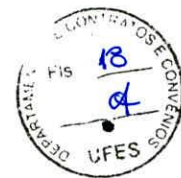
Para o desenvolvimento do kit de avaliação simplificada de cianotoxinas (microcistinas) será utilizado a metodologia enzimática de inibição da fosfatase. Neste sentido serão avaliados: o tipo de enzima, PP1 e PP2, correspondentes a tipos de fosfatases derivadas de recombinação genética (Ecoli PP1) e fosfatase derivada de purificação de tecidos animais (PP2). Esta enzima está disponível no mercado nas suas formas purificadas para aquisição e avaliação no presente estudo. Neste método, a presença de microcistinas é avaliada pela inibição da atividade fosfatásica tanto sobre substratos sintéticos cromogênicos (p-nitrofenil-fosfato) quanto substratos sintéticos fluorogênicos (4-metilumberiferil-fosfato e 6,8-metilumberiferil-fosfato). A extensão da inibição da reação é usada para estimar a concentração da toxina na amostra.

Inicialmente serão realizadas análises cinéticas das atividades das fosfatases tipo 1 (PP1) e tipo 2 (P2A) utilizando os substratos descritos acima na ausência e presença de diferentes tipos de microcistinas. Estes estudos de cinética de inibição são importantes para a avaliação da sensibilidade (limite de detecção) e oferecerão informações para adequação de métodos de análise, tais como: preparo de curvas padrões relacionando concentração de variantes de microcistinas com porcentagem de inibição de atividade fosfatásica, adequação de concentração (enzimas / substratos) e adequação do tempo de reação.

Serão feitos ensaios em escala piloto para o desenvolvimento de um sistema qualitativo (enzimático colorimétrico) rápido de avaliação analítica de microcistinas, usando o substrato sintético o p-nitrofenil-fosfato ou similar, o qual libera o cromógeno amarelo na presença da enzima ativa. Os experimentos visam, basicamente, incorporar a fosfatase em materiais geleificados (gel de poliacrilamida, gel de agarose e acompanhar a reação em meio aquoso com e sem a adição de microcistinas utilizando amostras de águas de diferentes origens.

Resumo dos Passos para o desenvolvimento do sistema proposto:

1. Estudo da cinética de reação da fosfatase, verificando as condições padrões de pH, temperatura, e efeito de possíveis inibidores
2. Avaliação dos diversos sistemas para imobilização da fosfatase em diversos materiais tais como: agarose, xantanas, poliacrilamida, zeolitas. Estes estudos permitirão verificar e comparar a atividade de fosfatase imobilizada com os estudos avaliados em (1) para definição do melhor meio ou combinação de materiais com máximo de atividade enzimática.
3. Aplicação dos materiais e enzima fosfatase imobilizada em suporte sólido observando-se os valores de atividade enzimática em função da concentração de substratos e enzimas utilizados visando a otimização do sistema
4. Definição do volume mínimo de amostra de água e limite de detecção do sistema imobilizado por meio de ensaios controlados utilizando-se amostras padrão de cianotoxinas em diversas concentrações. A avaliação colorimétrica é realizada por



20
04

meio da adição de p-nitrofenilfosfato a amostra de águas com e sem adição de cianotoxinas e avaliando o percentual de inibição da reação de fosfatase (desenvolvimento ou não da cor amarela visível nos poços). A presença de cor amarela indica que a amostra está ISENTA de cianotoxina (microcistinas) enquanto que ausência de coloração indica a presença da cianotoxina.

Após a definição dos estudos de (1) a (4) a formulação será avaliada com amostras ambientais de águas de diversas procedências, comparando-se os dados do sistema qualitativo proposto com os dados quantitativos obtidos por meio das análises de HPLC ou ELISA com os procedimentos descritos anteriormente.

Para o desenvolvimento do sistema de avaliação simplificado, serão avaliadas diversas tipologias de águas incluindo-se amostras de lagoas de captação, efluentes de lagoas de tratamento, amostras de águas adicionadas de microcistinas (spiked), extratos de células de cianobactérias. Estes ensaios serão acompanhados de determinações quantitativas de cianobactérias e comparado com os resultados observados no sistema simplificado de inibição de fosfatase e também com os resultados do teste de ELISA para as mesmas amostras de águas. As análises estatísticas serão realizadas com modelo totalmente aleatório, empregando-se os testes de análise de variância para as análises quantitativas e testes não paramétricos de avaliação de resultados qualitativos.

Proposta de modelo de vigilância sanitária para detecção primária de cianotoxinas e qualidade de águas.

Atualmente o sistema de vigilância de qualidade de águas nos diversos estados depende do envio de amostras para laboratórios qualificados para realização dos ensaios de detecção e quantificação dos níveis de cianotoxinas. Neste sistema perde-se muito tempo para a análise e tomada de decisões, principalmente com relação a pequenas comunidades geralmente localizadas em locais afastados ou de difícil acesso.

Nossa proposta inclui a utilização de kit simplificado para avaliação **qualitativa** de cianotoxinas, semelhante ao processo de presença/ausência em outros testes de bioindicadores ambientais de qualidade de águas. Neste sistema de detecção, esta avaliação funcionaria como um primeiro alarme para tomada de decisão local e tomada de decisão com envio de amostras para laboratórios referenciais de avaliação quantitativa. Adotando-se este critério de dois níveis de tomada de decisão, incluindo primeiro nível presuntivo ou qualitativo e segundo nível confirmativo, os agentes ou entidades ambientais teriam uma ferramenta mais ágil para tomada de decisões para o gerenciamento de qualidade de águas referente a níveis de cianotoxinas. *Texto limitado em 05 páginas*

Resultados Esperados

Implementação de rotina de avaliação de cianotoxinas por HPLC livre de acetonitrila: (já em andamento no LABSAN e apresentado no 26 congresso ABES Porto Alegre RS 2011). Esta rotina de avaliação permitirá análises de amostras de águas com menor tempo e resíduo menos impactante ao meio ambiente.

Desenvolvimento de kit de avaliação qualitativa (presença/ausência) de cianotoxinas em amostras de águas por detecção visual em microplacas de 96 poços: sistema de avaliação de amostras de águas de baixo custo para pequenas comunidades.

Treinamento de recursos humanos alocados no projeto, compreendendo 1 tese doutorado, 1 disseertação mestrado, 3 iniciação científica além de estagiários pesquisadores envolvidos.

(Número livre de resultados – Texto limitado em 05 linhas para cada um)



21
09

Recomendações para utilização dos resultados pela FUNASA e indicativos de custos

O sistema analítico proposto é simplificado e de baixo custo e facilidade operacional. Assim, pretende-se que este sistema esteja disponível para estações de tratamento de águas de pequenas comunidades (< 10.000 habitantes) operadas pela FUNASA, SAAE bem como das grandes estações de tratamento. Devido ao baixo custo, estima-se uma frequência diária de avaliação de microcistinas.

Mecanismos Gerenciais de Execução

A proposta de pesquisa compreende 03 metas físicas bem definidas que serão executadas no âmbito do Laboratório de Saneamento da UFES (LABSAN UFES). Já esta em andamento por meio de um projeto de Doutorado junto ao PPGEA UFES, visando o monitoramento de águas de captação da CESAN (Duas bocas e Jacuném). Este projeto prevê o desenvolvimento de kit de análise qualitativo descrito no scopo desta proposta. O isolamento e Caracterização de cepas toxicas por HPLC será realizado em 6 meses. Os ensaios de inibição enzimática em microplaca e o desenvolvimento do kit será realizado em 18 meses.

Mecanismos gerenciais de participantes e colaboradores

Esta proposta apresenta a participação da Companhia Estadual de Saneamento CESAN (ES) por meio de coleta de amostras de águas nos reservatórios sob sua responsabilidade (Duas Bocas e Jacunem). O protocolo já foi firmado com a CESAN que é objeto do desenvolvimento de tese de doutorado do Programa de Pos Graduação em Engenharia Ambiental da UFES.

Alem disto, esta proposta é parte principal do projeto de doutorado em andamento do aluno PPGEA UFES Paulo Wagner P. Antunes, que já está no seu segundo ano de curso e realiza as campanhas de monitoramento de cianotoxinas dos reservatórios da CESAN. O Objetivo principal de seu projeto de tese é o desenvolvimento do kit de avaliação qualitativa de cianotoxinas (microcistinas)

Cronograma de Execução

Atividades: 1- Isolamento e Caracterização de cepas toxicas e aquisição de padrões Analíticos; 2- Obtenção de Extratos metanólicos de cianotoxinas; 3 – Caracterização cianotoxinas por HPLC; 5 – Ensaios de Inibição da Fosfatase em microplacas; 6 – Ensaios de imobilização enzimática em meio especial; 7 – Elaboração do kit de avaliação quantitativa de cianotoxinas em amostras de águas.

Atividades	1º ano						2º ano					
	1º bimestre	2º bimestre	3º bimestre	4º bimestre	5º bimestre	6º bimestre	1º bimestre	2º bimestre	3º bimestre	4º bimestre	5º bimestre	
1 Isola	X	X										
2 Extração		X	X	X								
3 HPLC												
4 - Elaboração do relatório parcial					X							
5 Ensaios Raso												
6 Imobilização Enz.						X	X					
7 Elaboração Kit							X	X	X	X		
8 - Elaboração do relatório final												X



1.3.2 – Impactos previstos pelo Projeto

Nossa proposta inclui a utilização de kit simplificado para avaliação **qualitativa** de cianotoxinas, semelhante ao processo de presença/ausência em outros testes de bioindicadores ambientais de qualidade de águas. Neste sistema de detecção, esta avaliação funcionaria como um primeiro alarme para tomada de decisão local e tomada de decisão com envio de amostras para laboratórios referenciais de avaliação quantitativa. Adotando-se este critério de dois níveis de tomada de decisão, incluindo primeiro nível presuntivo ou qualitativo e segundo nível confirmativo, os agentes ou entidades ambientais teriam uma ferramenta mais ágil para tomada de decisões para o gerenciamento de qualidade de águas referente a níveis de cianotoxinas.

Implementação de rotina de avaliação de cianotoxinas por HPLC (LABSAN-UFES). A implementação de rotinas de avaliação de microcistinas no LABSAN por HPLC, atualmente proposta por uma metodologia livre de acetonitrila, permitirá um acompanhamento seguro das variantes de microcistinas e as eficiências de inibição dos ensaios enzimáticos. (6 meses). Ensaio de inibição enzimática: o sistema pressupõe a inibição da fosfatase por microcistinas e nodularinas. Assim, devemos testar vários substratos cromofluorogênicos para verificar a eficácia de detecção visual da reação de inibição em microplacas de 96 poços. (6 meses). A formulação final do Kit deve contar com a enzima fosfatase imobilizada em suporte especialmente testado e os limites de detecção visual calibrados para utilização dentro dos padrões da legislação atual para detecção de cianotoxinas (1 $\mu\text{g.L}^{-1}$). (12 MESES)

Impacto Científico

(Apresentar indicadores voltados à área científica, tais como, formação de recursos humanos, teses, publicações, congressos, comunicações, citações, entre outros)

- Formação de recursos humanos: 01 Doutorado, 01 Mestrando, 03 IC
- Teses: 01 Dissertações: 01
- Trabalhos completos em Congressos Nacionais e Internacionais: 02
- Trabalhos em periódicos QUALIS: 02
- Patentes que devem ser requeridas: 01 (Kit de avaliação qualitativa cianotoxinas em águas)

Impacto Tecnológico

A proposta tem dois produtos tecnológicos bem caracterizados:

1. Desenvolvimento de metodologia de avaliação de microcistinas (MC) por HPLC livre de acetonitrila
2. Desenvolvimento de Kit de avaliação de cianotoxinas (MC) em amostras de águas

Impacto Econômico

Análise de cianotoxinas por metodologia livre de acetonitrila: a metodologia proposta tem a vantagem de se permitir a avaliação por HPLC com menor tempo de retenção e livre de acetonitrila, abaixando assim o custo de análise.

Desenvolvimento de kit de avaliação quantitativa de cianotoxinas: o kit proposto apresenta baixo custo e facilidade operacional, permitindo assim a sua utilização em sistemas de tratamento de águas de pequenas comunidades (< 10.000 habitantes)

Estima-se que o custo analítico qualitativo de cianotoxinas em amostras de águas de abastecimento fique em torno de R\$30,00 reais por amostra, com baixo investimento em capital e treinamento de operadores locais para a realização das análises. O custo atual de analítico quantitativo de amostras gira em torno de R\$150 a R\$300 por amostra considerando-se análises por Elisa e HPLC. Além do baixo custo, podemos citar também o baixo tempo de resposta do sistema proposto em comparação com análises tradicionais.



23
09

Impacto Social

(Apresentar indicadores voltados à área social, em termos de sua influência nos níveis de qualidade de vida das populações afetadas, em âmbito regional ou local, tais como emprego, renda, saúde, educação, habitação, saneamento, entre outros)

Desenvolvimento de kit de avaliação quantitativa de cianotoxinas: o kit proposto apresenta baixo custo e facilidade operacional, permitindo assim a sua utilização em sistemas de tratamento de águas de pequenas comunidades (< 10.000 habitantes), melhorando assim a qualidade de vida dos habitantes das comunidades com avaliação sistemática e de elevada frequência de cianotoxinas.

(Número livre de impactos – Texto limitado em 03 linhas para cada um)

Impacto Ambiental

(Apresentar indicadores voltados à área ambiental, em termos de sua influência nos níveis de qualidade da água, ar, e solos, da preservação da diversidade biológica ou recuperação de degradação, entre outros)

A melhoria da qualidade de águas de distribuição é um objetivo que deve ser permanentemente buscado por projetos e ações de tratamento de águas. Assim, a adoção de kits de avaliação qualitativa deve prevenir acidentes ambientais e indicar as ações de prevenção da poluição antrópica por parte das autoridades ambientais.

(Número livre de impactos – Texto limitado em 03 linhas para cada um)

1.3.3 – Resumo da Equipe Projeto

Pessoal Existente no Instituto de Física de UFMG – Departamento de Física para a execução do Projeto: em função do nível de qualificação

Equipe	Doutor	Mestre	Espec.	Graduado	2º Grau	1º Grau	Total
Pesquisadores	04	01	01	03			08
Consultores/Visitantes	01						
Estudantes							
Apoio Técnico				01			
Apoio Administrativo				01			
Outros							
TOTAL	05	01	01	05			

Pessoal Complementar

(Especificar e justificar a necessidade de eventual contratação por serviços prestados de pessoal científico, técnico ou administrativo para a execução do projeto)



1.3.4 - Equipe Executora (Pessoal Existente e Pessoal Complementar, caso exista)

Pesquisadores

N.º	NOME	TITULAÇÃO, Univ., País, Ano	ÁREA DE ESPECIALIZAÇÃO	VINCULAÇÃO INSTITUCIONAL	FUNÇÃO NO PROJETO (*)	PARTICIPAÇÃO NO PROJETO		ESPECIFICAÇÃO (**)
						Horas/semana	Nº de meses	
01	SERVIO TULIO A. CASSINI	PHD NCSU EUA 1988	Microbiologia Ambiental	Prof. Assopciado UFES	Coordenador	20	24	Isolamento e Caracterização de Cianobacterias
02	RICARDO FRANCI GONÇALVES	D.Ing. França 1993	Tratamento águas e Reuso	Prof. Associado UFES	Pesquisador	2	24	Tratamento de águas
02	SANDRA PAULE BEGHI	Dr.Environmenta l Science - École de Mines d'Alès (2007).	Cromatografia	Prof. Visitante UFES	Pesquisador	2	24	Ensaio HPLC
03	REGINA DE PINHO KELLER	PHD Inst. Pasteur 1992	Biologia Molecular	Prof. Adjunto UFES	Pesquisador	2	24	Ensaio de Atividade Enzimática
04	LAURA MARINA PINOTTI	Dr. Eng. Química UFSCar 2003	Engenharia Química	Prof. Adjunto UFES	Pesquisador	2	24	Ensaio de Imobilização Enzimática
05	PAULO WAGNER P ANTUNES	MS. Bioquímica UFV 2008	Bioquímica	Doutorando PPGEA UFES	Estudante Doutorado	40	24	Desenvolvimento do Kit de avaliação qualitativa
06	ELAINE PAGUNG	Grad Tec. Química	Química	Bolsista UFES	Apoio Tecnico	40	24	Análises de Qualidade de águas e Coleta de amostras

(*) Função no Projeto: Pesquisador – Pesquisador Visitante - Consultor – Estudante (informar também o nível) - Apoio Técnico / Administrativo (informar apenas a quantidade, especialização, vinculação institucional e atividade no Projeto (**) Especificar as atividades desenvolvidas pelo pesquisador no projeto.



22



25
09

1.3.5. Propriedade Intelectual

Direitos Autorais Patrimoniais

(Informar os principais produtos a serem desenvolvidos no âmbito desta pesquisa que possam gerar algum tipo de direito autoral, além do relatório final. Por exemplo, manual, livro, vídeo, cartilha etc.)

Metodologia de avaliação de cianotoxinas livre de acetonitrila (Processo)
Kit de avaliação qualitativa de microcistinas em amostras de águas (Patente)

Patentes

(Informar se a pesquisa terá como resultado algum produto/processo passível de ser patenteado).

O kit de avaliação qualitativa de cianotoxinas (Microcistinas) deverá ser requerida a patente junto orgão competentes da UFES e

Inovação tecnológica

(No caso de Universidade, informar se possui um Núcleo de Inovação Tecnológica, inserindo os dados para contato.)

Instituto de Inovação Tecnológica da Ufes INIT
O Instituto de Inovação Tecnológica da Ufes (Init) é um órgão suplementar, subordinado à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), responsável pelas atividades de gestão da inovação e da propriedade intelectual na Ufes. O responsável por sua administração é o Diretor de Inovação da Ufes, professor Antonio Alberto Ribeiro Fernandes.
E-mail: nites@prppg.ufes.br
Telefone: +55 (27) 4009-7885
Pagina Internet: <http://www.prppg.ufes.br/nites.asp>



3 - ACERVO BIBLIOGRÁFICO

(Listar as principais assinaturas de periódicos, livros e informações referentes ao tema que a Instituição se candidata.)

- PERIODICOS CAPES (PORTAL PERIODICOS DA CAPES)
- BIBLIOTECA SETORIAL CT UFES – 1200 TITULOS EM ENGENHARIA AMBIENTAL
- PRODUTOS PROSAB (PORTAL FINEP – PRODUTOS PROSAB) LIVROS ELETRONICOS DISPONIVEIS NAS AREAS DE TRATAMENTO DE AGUAS, ESGOTOS, LODOS E REUSO DE ÁGUAS. 28 TITULOS disponíveis

(Texto Limitado em 01 página)

4 - CURRÍCULOS

Adotar o modelo simplificado da Base Lattes (www.cnpq.br/lattes). Os currículos dos integrantes da equipe executora, com exceção apenas do pessoal de apoio técnico ou administrativo, deverão estar atualizados e disponibilizados na Plataforma Lattes.

Servio Tulio Alves Cassini <http://lattes.cnpq.br/2519874649699294>
Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais UFMG (1975), Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade de São Paulo (1980) e Doutorado em Microbiologia Ambiental - North Carolina State University NCSU (1988). Professor Visitante da University of Tennessee Knoxville (UTK) 1996-1997. Professor Adjunto Universidade Federal de Vicosa (UFV) 1975-1999. Professor Associado do Departamento de Engenharia Ambiental CT-UFES desde 1999. Coordenador do Programa de Pos Graduação em Engenharia Ambiental PPGEA-UFES 2000-2006. Coordenador da Rede nacional de Pesquisa em Lodos FINEP-PROSAB 2001-2003. Atua na área de Microbiologia Aplicada a Engenharia Sanitária especialmente na área de desenvolvimento de Kits para avaliação de águas e Biocombustíveis. Projetos na área de Lodos e Tratamento de águas.

Totais de produção: Servio Tulio Cassini

Produção bibliográfica	
Artigos completos publicados em Periódico.....	30
Artigos aceitos para publicação.....	1
Capítulos de livros publicados.....	7
Livros organizados ou edições.....	1
Trabalhos COMPLETOS publicados em anais de eventos.....	119
Apresentações de Trabalhos (Conferência ou palestra).....	3
Produção Técnica	
Produtos tecnológicos (outro).....	1
Trabalhos técnicos (assessoria).....	2
Trabalhos técnicos (relatório técnico).....	5
Curso de curta duração ministrado (extensão).....	3



31

Orientações	
Orientação concluída (dissertação de mestrado - orientador principal).....	32
Orientação concluída (tese de doutorado - co-orientador).....	3
Orientação concluída (tese de doutorado - orientador principal).....	2
Orientação concluída (iniciação científica).....	12
Orientação em andamento (dissertação de mestrado - orientador principal).....	2
Orientação em andamento (tese de doutorado - orientador principal).....	5

Eventos	
Participações em eventos (congresso).....	8
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	3
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	1
Organização de evento (congresso).....	3
Participação em banca de trabalhos de conclusão (mestrado).....	46
Participação em banca de trabalhos de conclusão (doutorado).....	5
Participação em banca de comissões julgadoras (concurso público).....	3
Participação em banca de comissões julgadoras (outra).....	1

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações : 22; Número de trabalhos : 6 Data : 30/01/2010; Fator H: 3;
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações: Cassini, S.T.

Ricardo Franci Goncalves <http://lattes.cnpq.br/9604327349698525>
Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Engenheiro Civil - Ênfase Sanitária e Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (1984), com Especialização em Engenharia de Saúde Pública na ENSP - FIOCRUZ (RJ) (1985), DEA Sciences Et Techniques de L'environnement - Ecole Nationale Des Ponts Et Chaussées (1990) e doutorado em Engenharia do Tratamento de Águas - Institut National Des Sciences Appliquées Toulouse (1993). Atualmente é Professor Associado III do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, e foi coordenador da rede temática 5 / Edital 5, do Programa de Pesquisa em Saneamento Básico - FINEP / CAIXA / CNPq. Tem experiência na área de Engenharia Sanitária, com ênfase em Controle da Poluição, atuando principalmente nos seguintes temas: sistemas de coleta e transporte de esgoto sanitário, tratamento de águas residuárias, reúso de águas, aproveitamento de fontes alternativas de água, racionalização do uso da água em edificações, gerenciamento de lodos do saneamento, controle de odores em estações de tratamento de águas residuárias.

Sandra Paule Beghi <http://lattes.cnpq.br/5521744528981818>

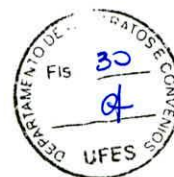
Possui graduação em Química ambiental - Ecole Nationale Superieure de Chimie de Montpellier (2003), mestrado em Génie des Procédés - Université de Montpellier II (Scien. et Tech Du Languedoc) (2003) e doutorado em Environmental Science - École de Mines d'Alès (2007). Tem 02 trabalhos em revistas QUALIS A de circulação internacional e atua na área de Cromatografia Gasosa e Líquida com determinação de compostos odorantes e Tóxicos no meio ambiente. Professor Visitante da UFES desde 2009 (Bolsa CAPES 2011-2013).

Regina de Pinho Keller <http://lattes.cnpq.br/1765455668560897>

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (1983), mestrado em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1988), doutorado em Microbiologia - Université Paris VII - Institut Pasteur (1993) e pós-doutorado em Microbiologia Ambiental pela University of Ottawa (2008). É professora adjunta do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo e coordenadora do Programa de Pós-graduação em engenharia ambiental. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Virologia, atuando principalmente nos seguintes temas: métodos moleculares de detecção de patógenos em amostras ambientais, cultivo celular de vírus em amostras ambientais.



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde



32

Laura Marina Pinotti <http://lattes.cnpq.br/5616576281329159>

Possui graduação em Engenharia Química pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (1996), mestrado em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (1999), doutorado em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (2003) e pós-doutorado em Biologia Molecular no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. Atualmente é professora da Universidade Federal do Espírito Santo. Possui experiência em Engenharia química na área de Bioquímica - Biotecnologia com ênfase na produção, purificação, imobilização e clonagem de enzimas. Atualmente está desenvolvendo projetos de pesquisas com ênfase em compostos bioativos de microalgas e biodiesel de óleo residual.

Paulo Wagner Pereira Antunes <http://lattes.cnpq.br/5.59147170249880>

Graduado em Bioquímica (2006), Mestre em Bioquímica Agrícola (2008) pela Universidade Federal de Viçosa e Doutorando em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Espírito Santo. Tem experiência nas áreas de Bioquímica Geral, Biologia Molecular, Microbiologia e Cinética Enzimática. Ênfase em Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, com treinamento com as seguintes técnicas de separação e identificação de biomoléculas: eletroforese bidimensional, cromatografia líquida multidimensional online e offline (HPLC) e análises em espectrometria de massa. Atualmente, desenvolve atividades na área de Ciências Ambientais, principalmente com Microbiologia aplicada à Engenharia Ambiental. Projeto de Doutorado: Desenvolvimento de Sistema de Avaliação de microcistinas em amostras de águas.