



Universidade Federal de Ouro Preto  
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental  
Mestrado em Engenharia Ambiental

**Identificação de cianofíceas e estudo da toxicidade “*in vivo*” de cianotoxinas nos pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG.**

Ludmila von Rondow de Abreu Bastos Pandolpho

Ouro Preto, MG  
2010

Ludmila von Rondow de Abreu Bastos Pandolpho

# **Identificação de cianofíceas e estudo da toxicidade “*in vivo*” de cianotoxinas nos pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Estado de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: “MESTRE em ENGENHARIA AMBIENTAL – área de Concentração: MEIO AMBIENTE”.

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. VERA LÚCIA DE MIRANDA GUARDA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANTÔNIO GALVÃO DO NASCIMENTO

Dedico a minha família, meus pais Eduardo Sérgio e Heloísa Helena, e meu irmão Frederico, pelos fundamentais ensinamentos e exemplos de amor e determinação. Ao meu namorado, Eduardo, pela paciência e apoio em todos os momentos de *stress* e de fragilidade, pelo carinho incondicional.

## Agradecimentos

À Deus pelo fantástico mistério da vida e constante presença e proteção.

Aos meus pais Eduardo Sérgio Bastos Pandolpho e Heloísa Helena de Abreu Pandolpho que em todos momentos são os maiores incentivadores desta trajetória, por todo o amor compartilhado e pelas imensas lições de vida que me orientam a cada dia.

Ao meu irmão Frederico von Rondow de Abreu Bastos Pandolpho, por todo o carinho, alegria e brigas nos momentos em que estivemos juntos. Saibam que mesmo distantes fisicamente, sempre estaremos reunidos pelo amor de família.

Ao Eduardo Costa de Souza (“Meu Lindo”), por compreender e superar o *stress* e me apoiar, valorizando cada momento que estamos juntos. É muito bom saber que você faz parte da minha vida.

À Dra. Vera Lúcia de Miranda Guarda, por sua dedicação e carisma durante a orientação deste trabalho. Desde o momento de seleção do mestrado, me incentivou e aceitou prontamente como orientadora. Pelas imensas contribuições científicas durante a realização deste trabalho, que estimularam ainda mais a curiosidade pelas algas e cianofíceas, por sua constante preocupação e disponibilidade em ajudar em qualquer situação e pelo empenho como “mãe científica” que a revelam como uma pessoa fantástica cuja amizade é muito valiosa.

Ao Prof. Dr. Antônio Galvão do Nascimento, pela dedicação e empenho, mesmo à distância, durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Pró-Água, pela oportunidade de aprendizado e ampliação de conhecimentos.

À UFV, por fornecer a infra-estrutura necessária à realização de etapas deste trabalho.

Ao Bioagro em especial ao laboratório do Prof. Dr. Antonio Galvão do Nascimento, pela infra estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

À Escola de Farmácia, principalmente ao Laboratório de Microbiologia e ao biotério, pela disponibilização do espaço e infra estrutura fornecida.

À pesquisadora e professora Gabriela, pela contribuição durante o exame de qualificação.

Aos funcionários da Escola de Farmácia, em especial, aos técnicos José Maria (Sr. Zé) e Rejane.

Aos funcionários da UFOP, Luiz Antônio, Arnaldo e demais vigilantes, e, aos motoristas pela prontidão em seus serviços, amizade e convívio harmonioso.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andréa, pela atenção e orientação concedida.

Aos donos dos pesque-pagues, por me autorizarem realizar as coletas e se interessarem em ter uma melhor qualidade da água e do pescado.

Ao estudante e bolsista de iniciação científica Henrique Moreira Mendes de Almeida, pelo auxílio durante todo o trabalho.

Aos meus avós Carmem e Tainon, pelo carinho e exemplo de fé e determinação que nos motiva a cada dia.

Aos amigos de graduação e de sempre, Gleici e Janine, pela torcida constante e divertidos momentos de descontração nos raríssimos encontros durante o mestrado.

Registro minhas sinceras desculpas aos nomes que não tenha mencionado e agradeço mesmo aqueles que estão nas entrelinhas de colaboração para a conclusão desta etapa.

Afinal, agradecer é o mínimo que podemos fazer por aqueles que nos ajudam mesmo sem saber, querer ou poder. Muito obrigado.

## Sumário

Resumo .....	ix
Abstract .....	x
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Siglas .....	xiii
Capítulo 1 – Introdução .....	01
Capítulo 2 – Revisão da Literatura .....	04
Capítulo 3 – Objetivos .....	15
3.1 – Objetivos Gerais .....	15
3.2 – Objetivos Específicos .....	15
Capítulo 4 – Parte Experimental .....	16
4.1 – Área de Estudo .....	16
4.2 – Estação de amostragem, coletas e fixação das amostras .....	17
4.3 – Variáveis Físicas e Químicas da água .....	18
4.4 – Estudo Taxonômico .....	19
4.4.1 – Observação do material .....	19
4.4.2 – Identificação e sistema de classificação .....	19
4.4.2.1 – Chave de Identificação .....	20
4.5 – Isolamento dos gêneros .....	22
4.6 – Ensaio Toxicológico .....	22
Capítulo 5 – Resultados e Discussão .....	24
5.1 – Caracterização dos tanques estudados .....	24
5.2 – Pesquisa de Cianofíceas .....	26
5.3 – Identificação dos gêneros de cianofíceas encontrados nos pesque-pagues da Região dos Inconfidentes – MG .....	28
5.4 – Culturas utilizadas no ensaio toxicológico .....	32
5.5 – Administração Oral .....	32
5.6 – Intoxicação Crônica .....	32
5.6.1 – Extrato bruto de <i>Microcystis</i> .....	32

5.6.2 – Extrato bruto de <i>Phormidium</i> .....	33
5.7 – Intoxicação Aguda .....	33
5.8 – Cálculo da DL <sub>50</sub> .....	34
Capítulo 6 – Conclusões .....	36
Capítulo 7 – Considerações Finais .....	37
Capítulo 8 – Referência Bibliográfica .....	38
Anexo .....	43
Anexo 1 – Protocolo Meio de Cultivo BG-11 .....	44
Anexo 2 – Protocolo Meio de Cultivo ASM-1 .....	45



## Resumo

Lagos de pesque-pagues são as novas alternativas para atividades de lazer. O seu sucesso econômico, dependendo da qualidade da água, que associada à avaliação de uma comunidade fitoplanctônica permite estabelecer formas de gestão com vista a prevenir potenciais danos à saúde. A intoxicação humana por cianotoxinas da água é científcico comprovado pelo desastre ocorrido em um centro de diálise em Caruaru, PE, Brasil, mas da consumação do peixe não estão relacionados. No entanto, aniquilação de peixe e a floração de cianofíceas foram descritos, como no rio São Francisco, em 2007. Para estimar a ocorrência de cianofíceas em lagos de pesca recreativa na Região de Inconfidentes, devido à capacidade de produzir toxinas, que está presente em algumas espécies. 88 amostras de águas foram coletadas de março de 2008 até janeiro de 2009 nos tanques de pesque-pague localizados em seis municípios da Região de Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil. Alguns parâmetros físicos foram determinados em locus. As amostras foram coletadas com rede de malha de 20 µm de fitoplâncton e transportadas para o laboratório e examinados em microscópio óptico, em seguida, foram colocados em meio de cultura ASM - 1 e BG 11 com nitrogênio e sem nitrogênio, e mantido em temperatura e luz controlada ( $25 \pm 2$  ° C,  $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), fotoperíodo de 16 horas para a cultura. O pH, temperatura e condutividade pareciam favoráveis à presença de algas, principalmente clorofíceas. Entre as Cyanophyceae, gêneros potencialmente tóxicos foram identificados, como: Phormidium (Sant'anna e Azevedo, 1995), Microcystis (Komárek *et al.*, 2002), e Anabaena (Komárek *et al.*, 2003). Os bioensaios foram realizados para avaliar o grau de toxicidade e estudos adicionais são recomendados para prevenir os efeitos perigosos para a saúde pública e o meio ambiente.

## Abstract

Recreational fishing lakes are the new alternative for leisure activities. Their economic success depending on the water quality, which assessment associated to the phytoplankton community one allows to setting management programs aiming at preventing potential harm to the health. The human intoxication by cyanotoxins from water is scientific evidenced for the disaster occurred at a dialysis center in Caruaru, PE, Brazil, but from the fish's consumption there isn't related. Nevertheless, the fish's annihilations and full bloom of cyanobacteria were described, like as at São Francisco River, in 2007. To estimate the occurrence of cyanobacteria in the recreational fishing lakes at Inconfidentes region, due to the ability to produce toxins, that is present in some species. 88 waters samples were collected from March 08 to January 09, in the recreational fishing lakes located in six municipalities of Inconfidentes region, Minas Gerais, Brazil. Some physical parameter were determined *in locus*. The samples were collected with a 20µm mesh phytoplankton net and transported to the laboratory and examined under optical microscope, then were placed in culture medium of ASM – 1 and BG 11 with nitrogen and without nitrogen, and kept in temperature and light controlled ( $25 \pm 2$  °C,  $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), 16 hours photoperiod for culture. The pH, temperature and conductivity seemed favorable to the presence of algae, mainly chlorophyceae. Among the cyanophyceae, genus potentially toxic were identified: Phormidium (Sant'anna and Azevedo, 1995), Microcystis (Komárek *et al.*, 2002), and Anabaena (Komárek *et al.*, 2003). The bioassays will be take place for evaluate the toxicity degree and further studies are recommended to prevent hazardous effects to public health and the environment.

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Floração em um corpo d'água .....	05
Figura 4.1: Mapa de Minas Gerais, com as principais cidades, rios, lagos e APAs .....	16
Figura 4.2: Mapa de Minas Gerais, com algumas cidades que compõem a área de estudo .....	17
Figura 4.3: Rede de fitoplâncton de malha de 20 µm de espessura .....	18
Figura 5.1: Vista parcial do tanque de pesque-pague pela margem esquerda, em Ponte Nova .....	24
Figura 5.2: Vista parcial do tanque de pesque-pague, em São Braz do Suaçuí .....	24
Figura 5.3: Vista parcial de um dos tanques do pesque-pague de Tiradentes na margem esquerda .....	25
Figura 5.4: Vista parcial dos tanques de pesque-pague, em Tiradentes .....	25
Figura 5.5: Tanque com floração de cianofíceas .....	26
Figura 5.6: <i>Microcystis</i> visualizadas ao microscópio óptico .....	28
Figura 5.7: <i>Phormidium</i> vista ao microscópio óptico .....	30
Figura 5.8: <i>Geithlerinema</i> vista ao microscópio óptico .....	31

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Limites para cianofíceas na legislação brasileira .....	14
Tabela 4.1: Variáveis físicas e químicas mensuradas no momento da coleta e seus respectivos métodos .....	18
Tabela 5.1: Localização dos pesque-pagues da Região dos Inconfidentes e os principais gêneros encontrados .....	26
Tabela 5.2: Valores médios dos resultados dos parâmetros físico-químicos dos tanques de pesque-pagues da Região dos Inconfidentes – MG .....	27

## Lista de Siglas

pH – Potencial Hidrogeniônico

MG – Minas Gerais

DF – Distrito Federal

DL<sub>50</sub> – Dose Letalidade 50%

mg/Kg – Miligrama por kilograma

µg/Kg – Micrograma por kilograma

EUA – Estados Unidos da América

*mcy* – Microcistina

mm – milímetro

células/ml – Células por mililitro

mm<sup>3</sup>/L – Milímetro cúbico por litro

µg/L – Micrograma por litro

MS – Ministério da Saúde

µm – Micrometro

FAA – Formalina, álcool etílico, ácido acético glacial

°C – Grau Celsius

rpm – Rotações por minuto

µE – Microelétrons

cm – Centímetro

BA – Bahia

PE – Pernambuco

## Capítulo 1 – Introdução

O registro fóssil das cianofíceas indica que estes seres fotossintetizantes apareceram no éon geológico Arqueano e devem ter sido responsáveis pelo aparecimento do oxigênio na atmosfera terrestre, o que parece ter acontecido há cerca de 2,5 bilhões de anos, permitindo a origem da vida eucarionte e dando lugar ao que se chama atualmente o éon Proterozóico.

Na base das cadeias tróficas pelágicas, as algas e cianofíceas são responsáveis por uma parte essencial da produção primária no meio aquático, tendo, geralmente, influência determinante nos ciclos biogeoquímicos dos elementos.

As cianofíceas são organismos unicelulares, procariontes e fotossintetizantes, que apresentam coloração azulada em condições ótimas, mas frequentemente são encontradas apresentando coloração verde-oliva a verde-azulada.

Na maioria dos casos, são responsáveis pela evidenciação da eutrofização do ambiente aquático, no qual estão inseridas, pela rápida reprodução durante a disponibilização de nutrientes. São de maioria dulcícola, mas apresentam algumas ocorrências em solo úmido, e, ainda em ambientes lacustres hipersalinos, ambientes congelados, sob o dossel de florestas entre outros.

Os microrganismos fotossintetizantes que flutuam livremente nas águas doces ou oceânicas, incluindo representantes de vários grupos de algas e cianofíceas, é denominado fitoplâncton. As algas e cianofíceas da zona eufótica que não são diretamente aderidas a um substrato nem são totalmente livres na coluna d'água compõem o metafíton (Stevenson, 1996). Ainda segundo o autor, o metafíton apresenta muitas formas e pode ter composições diversas. É comum a ocorrência de algas verdes filamentosas como *Spirogyra*, *Mougeotia* ou *Zygnema*, que não são comumente aderidas a um substrato, mas podem estar aproximadamente agregadas ou associadas com substratos em áreas protegidas da corrente ou entre plantas aquáticas.

O conhecimento sobre a biodiversidade de algas e cianofíceas de águas continentais do Brasil é desigual em relação às cinco regiões do país. É notório que nas regiões Sudeste e Sul o conhecimento desses organismos está relativamente avançado, enquanto que muito pouco foi estudado nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (Barbosa *et al.*, 1995).

Sant'Anna (1996), embora enfatizando a falta de conhecimento sobre as cianofíceas no Brasil, estimou em 800 o número de espécies citadas na literatura brasileira. A referida autora afirmou que 166 espécies foram citadas para a região da Floresta Amazônica, 32 para a região do Pantanal e 33 para a Mata Atlântica do estado de São Paulo. Bicudo *et al.* (1998) afirmaram que são conhecidos 1.551 táxons de algas e cianofíceas de águas continentais para o estado de São Paulo.

O conhecimento das algas e cianofíceas, como potenciais bioindicadores da qualidade da água, é extremamente interessante devido à rápida resposta das mesmas às mudanças ambientais (Margalef, 1983). Wetzel (1993) destacou que a composição qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica e suas variações espaciais e temporais refletem as interações entre os componentes e também o efeito das variáveis ambientais sobre a mesma, sendo influenciada, principalmente, pela concentração de nutrientes inorgânicos, penetração de luz, temperatura, pH e condutividade elétrica da água.

A biodiversidade de algas e cianofíceas de ambientes lênticos, somados às condições físicas e químicas da água são de fundamental importância para subsidiar medidas de preservação e manejo desses sistemas. Além disso, Senna & Magrin (2003) destacaram a importância da identificação dos organismos fitoplanctônicos para os estudos ecológicos.

Wilson (1992), citado por Bicudo *et al.* (1996), estimou em 26.900 o número de espécies de algas descritas no mundo até aquela ocasião. Bicudo *et al.* (1996) comentaram que novas espécies têm sido continuamente descritas e que o número exato de espécies existentes é desconhecido e que, especial atenção deve ser dada para o conhecimento das algas de água doce do Brasil, com consequente publicação de chaves de identificação tanto de perifíton como fitoplâncton.

As cianotoxinas são toxinas produzidas por algumas espécies de cianofíceas, em água doce ou salgada, e são classificadas como hepatotoxinas (microcistina e nodularina), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-as, homoanatoxina-a e saxitoxina), citotoxinas (cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lingbiatoxina). As altas concentrações de cianotoxinas afetam primeiramente as comunidades aquáticas e, posteriormente, as demais comunidades que se alimentam de indivíduos aquáticos contaminados. As florações de cianofíceas tóxicas podem provocar a mortandade de peixes e outros animais, incluindo o homem, que consome a água ou organismos contaminados.

Diversas cianotoxinas têm importância para a saúde pública. Estas toxinas, quando presentes na água utilizada para abastecimento doméstico, pesca ou lazer (pesque-pagues), podem atingir as populações humanas e provocar efeitos adversos, como gastroenterite, hepatenterite e outras doenças do fígado e rim, câncer, irritações na pele, alergias, conjuntivite, problemas com a visão, fraqueza muscular, problemas respiratórios, asfixia, convulsões e morte, dependendo do tipo da toxina, da concentração e da via de contato.

O pesque-pague é um local onde se pratica pesca esportiva ou por *hobby*. São lagos artificiais ou naturais onde os alevinos são criados com ração para que seu desenvolvimento seja rápido e o ganho de peso dos animais seja em curto tempo. Devido ao acúmulo da ração que é utilizada para alimentação dos peixes nos tanques, há um aumento na concentração de nutrientes disponibilizados na água, fazendo com que as cianofíceas presentes no corpo d' água se proliferem, causando danos ao restante da cadeia alimentar.

O foco de estudo foi a Região dos Inconfidentes - MG, devido ao alto número de pesque-pagues que surgiram em pouco tempo e à enorme concentração de corpos d' água eutrofizados na região. Dessa forma, buscou-se avaliar a qualidade das águas de tanques de pesque-pagues com relação à presença de cianofíceas, devido a potencialidade das mesmas produzirem toxinas.



## Capítulo 2 – Revisão da Literatura

As atividades humanas levam a usos múltiplos dos recursos hídricos tais como: abastecimento público, irrigação, uso industrial, navegação, recreação e aqüicultura. Embora essas atividades variem de acordo com a população na bacia de drenagem e com a organização econômica e social da região, essas atividades geram impactos ambientais e deterioração da qualidade da água, assim como interferem na quantidade de água disponível (Tsukamoto & Takahashi, 2007).

A contaminação dos recursos hídricos por rejeitos oriundos das atividades humanas tem sido um dos maiores fatores de risco para a saúde humana, especialmente em regiões com condições inadequadas de saneamento e suprimento de água, o que é observado tanto em regiões de alta concentração urbana como em áreas rurais do Brasil (Tsukamoto & Takahashi, 2007).

Outra consequência dos impactos antrópicos nos ecossistemas aquáticos é a ocorrência de acelerados processos de eutrofização pelo aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados, que resulta num aumento dos processos naturais da produção biológica. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como sendo as descargas de esgotos domésticos e industriais dos centros urbanos e das regiões agricultáveis. A eutrofização artificial produz mudanças na qualidade da água, incluindo a diminuição de oxigênio dissolvido, da biodiversidade aquática, a perda das qualidades cênicas, a morte extensiva de peixes e o aumento da incidência de florações de microalgas e cianofíceas. Essas florações (figura 2.1) podem provocar o aumento no custo do tratamento da água de abastecimento e consequências relacionadas à saúde pública (Tsukamoto & Takahashi, 2007).

Entre os fatores que levam as cianofíceas predominarem sobre os outros grupos fitoplanctônicos (microalgas), destacam-se as características fisiológicas pelas quais as cianofíceas assimilam os nutrientes (N e P) do meio aquático (Tsukamoto & Takahashi, 2007).

De maneira geral, as cianofíceas são menos eficientes na assimilação desses nutrientes do que as microalgas (algas verdes ou diatomáceas, por exemplo), que, em condições normais, possuem um crescimento favorecido. No entanto, ao produzir uma descarga excessiva dos nutrientes nos reservatórios, o homem propicia uma maior oferta dos mesmos, facilitando a sua assimilação e o crescimento das cianofíceas (CETESB, 1993).



Fonte: [www.sharonapbio-taxonomy.wikispaces.com](http://www.sharonapbio-taxonomy.wikispaces.com)

Figura 2.1: Floração de cianofíceas em um corpo d'água.

O crescimento intenso desses microrganismos na superfície da água geralmente se dá com predomínio de poucas ou mesmo de apenas uma espécie de cianofíceas produtora de toxinas ou de outros metabólitos que inibem a sua predação por microcrustáceos, larvas de peixes, moluscos. Esses consumidores primários vão preferir consumir as microalgas não tóxicas e com maior valor nutricional, contribuindo, com isso, para a redução das populações dessas microalgas, o que, por sua vez, resultará numa diminuição drástica da comunidade dos consumidores primários, com consequências em toda a cadeia alimentar do ambiente aquático. Portanto, como resultado desses processos, muitas vezes restará no meio aquático apenas as cianofíceas tóxicas como organismos fitoplancônicos dominantes. Esse meio aquático, com uma diversidade de espécies bastante reduzida e dominância de cianofíceas tóxicas, é, por

vezes, o manancial de abastecimento que está disponível em muitas regiões brasileiras (CETESB,1993; FUNASA, 2003).

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianofíceas em mananciais de abastecimento de água é a capacidade de esses microrganismos produzirem e liberarem toxinas para o meio líquido (cianotoxinas). Essas podem afetar a saúde humana, tanto pela ingestão de água como por contato em atividades de recreação no ambiente, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. Entretanto, a principal via de intoxicação é pelo consumo oral da água sem um tratamento adequado para remoção dessas toxinas (FUNASA, 2003).

As cianotoxinas formam um grupo de substâncias químicas bastante diversas, com mecanismos tóxicos específicos em vertebrados. Algumas cianotoxinas são neurotoxinas bastante potentes (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas), outras são principalmente tóxicas ao fígado (microcistinas, nodularina e cilindrospermopsina) e outras ainda podem ser irritantes ao contato, consideradas como endotoxinas pirogênicas, como aquelas das bactérias Gram negativas (FUNASA, 2003).

O número de estudos sobre a eficiente remoção dessas cianotoxinas pelos processos de tratamento da água ainda é reduzido. As técnicas de detecção de cianotoxinas ainda não são muito difundidas na prática do monitoramento de águas de abastecimento e para recreação. Assim, a avaliação da exposição humana às cianotoxinas pelo consumo da água ainda é bastante deficiente. Além disso, em regiões abastecidas por mananciais de superfície que apresentam florações de cianofíceas tóxicas, a real exposição a essas toxinas irá depender do método de captação, da sequência do tratamento da água e do controle operacional do sistema de abastecimento (FUNASA, 2003).

Assumindo-se que a qualidade de água é um fator limitante para o desenvolvimento social e econômico do país, verifica-se que várias lacunas precisam ser preenchidas para que possamos garantir, de forma segura e confiável, a qualidade de água em nossos mananciais e nos sistemas de abastecimento público. Uma das principais lacunas é a síntese e disseminação da

informação disponível sobre os diferentes aspectos envolvidos com as causas e conseqüências da ocorrência de cianofíceas em nossos mananciais de abastecimento (Lorenzi, 2004).

Casos como os de Porto Alegre, com 1,5 milhões de habitantes, que capta água do Rio Guaíba, onde a floração da cianofícea *Planktothrix* sp é conhecida desde a década de 70, mas sérios problemas de odor na água tratada surgiram apenas nos últimos sete anos. Este gênero pode produzir toxinas, de modo que há risco potencial de toxicidade, além do cheiro repugnante (Lorenzi, 2004).

Em Brasília, DF, o Lago Paranoá, um dos principais mananciais a abastecer dois milhões de habitantes, foi dominado pela cianofícea tóxica *Cylindrospermopsis* (Lorenzi, 2004).

Em São Paulo, três milhões de habitantes são abastecidos com água das Represas Billings e Guarapiranga, cercadas por mais de 500 loteamentos e ocupações irregulares, cujo esgoto induz a floração de cianofíceas tóxicas, produtoras da toxina microcistina (Lorenzi, 2004).

No Rio de Janeiro, a água que abastece 12 milhões de habitantes provém do Rio Paraíba do Sul. Após receber o esgoto das cidades ao longo do Vale do Paraíba, a floração de cianofíceas tóxicas na área de captação pode ser evidenciada (Barbosa, 2007).

Em Minas Gerais, o esgoto de Belo Horizonte e outras cidades, é descartado sem qualquer tratamento que elimine o alto teor de fósforo está provocando intensas florações de cianofíceas. O estado de alerta foi decretado em 57 cidades, devido à contaminação simultânea dos alguns principais rios de MG - Rio das Velhas, Rio São Francisco e Rio Doce. A população abastecida com a água destes rios já relata os sintomas típicos de intoxicação por cianofíceas (fonte: [www.manuelzao.ufmg.br](http://www.manuelzao.ufmg.br)). O fato de estas florações atingirem até rios com grande volume de água em movimento indica que a eutrofização atingiu um patamar de extrema gravidade (Teixeira *et al.*, 1993).

A Região Nordeste do Brasil apresenta condições mais propensas para a contaminação da população por toxinas de cianofíceas. O clima sempre quente, os mananciais constituídos por

açudes e pequenos corpos d' água sem renovação de água, o manancial com baixo nível de água na seca (que facilita a aspiração da espuma de cianofíceas), a água com pH básico, a falta de saneamento básico (coleta e tratamento de esgoto), níveis de pobreza e educação problemáticos, e a falta de controle da saúde pelo poder público, são fatores que, associados, já produziram tragédias. Assim, em 1988, na Bahia, 2.000 pessoas tiveram gastroenterite após consumir a água proveniente do reservatório de Itaparica, afetado por floração dos gêneros das cianofíceas *Microcystis* e *Anabaena*, o que ocasionou a morte de 88 pessoas, a maioria crianças (Teixeira *et al.*, 1993).

Em Caruaru, Pernambuco, 123 pacientes em tratamento de hemodiálise foram intoxicados em 1996, pelo uso da água do Açude Tabocas, retirada do estágio intermediário da estação de tratamento da cidade e clorada num caminhão-pipa, o que provocou a liberação da toxina contida nas cianofíceas; 76 pacientes morreram no prazo de 20 meses (Carmichael *et al.*, 2001). Este caso em Caruaru tornou-se um marco na literatura médica mundial, após ser estudado em detalhes aqui e no exterior, sendo considerado como o primeiro caso comprovado no mundo de morte de pessoas por toxina de cianofíceas, com a toxina identificada tanto no ambiente como no fígado dos pacientes.

No Rio Grande do Norte, o extenso Açude Açu, utilizado como manancial de água para a cidade de Natal, contém três tipos distintos de toxinas de cianofíceas, com a ocorrência de elevadas concentrações na água do reservatório. Esta situação foi também observada pelos pesquisadores em outros açudes que abastecem cidades daquele Estado (Costa *et al.*, 2006).

O fitoplâncton é composto por uma imensa variedade de microalgas (diatomáceas, algas verdes, flagelados e outros grupos) e cianofíceas. Uma das estratégias mais importantes nesta luta pela sobrevivência é a guerra química de cada espécie contra as outras à sua volta. Para isso, algumas espécies produzem substâncias químicas (metabólitos secundários) que inibem ou interferem na vida normal de seus competidores ou predadores. Esta guerra química é denominada *alelopatia*, cujos detalhes são discutidos numa revisão recente por Leflaive & Ten-Hage (2007). Algumas das substâncias alelopáticas do fitoplâncton têm um efeito bioquímico inibidor tão amplo, que chegam a ser altamente tóxicas para animais, sendo, por

isso, denominadas *toxinas* (Chorus & Bartram, 1999; Briand *et al.*, 2003; Haider *et al.*, 2003; van Apeldoorn *et al.*, 2007).

As cianofíceas, durante a sua longa história evolutiva, desenvolveram a alelopatia por numerosos inibidores bioquímicos, alguns dos quais são toxinas potentes para animais e o homem. As toxinas de cianofíceas, conhecidas como *cianotoxinas*, pertencem a três classes principais (pelo seu efeito biológico e não pela composição química) (Chorus & Bartram, 1999; Briand *et al.*, 2003; Haider *et al.*, 2003; van Apeldoorn *et al.*, 2007):

a) **Hepatotoxinas**: substâncias que inibem o funcionamento das células do fígado, causando a morte das células deste órgão essencial à vida de todos os animais vertebrados. As consequências são distintas se a dose de hepatotoxina ingerida através da água ou alimento for pequena ou grande. Se for pequena e contínua, o efeito é crônico, sem que o indivíduo perceba, com a morte gradual das células do fígado ao longo de meses ou anos. As células mortas não são repostas, sendo substituídas por células de cicatriz (tecido conjuntivo), que transformam o órgão num quelóide, sem função de fígado, originando a cirrose hepática - cuja evolução final é a morte. Experimentos em animais de laboratório indicam que a exposição crônica das células à hepatotoxina pode levar ao desenvolvimento de câncer de fígado (*hepatocarcinogênese*). Ao contrário, se a dose de toxina ingerida for alta, provoca o colapso rápido do fígado, afetando também o coração e os rins e levando à morte no prazo de aproximadamente sete dias. Não existe antídoto para tal ação.

As toxinas pertencentes a esta classe são a microcistina (produzida pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e *Oscillatoria*), a nodularina (produzida por *Nodularia*) e a cilindropermopsina (produzida principalmente por *Cylindropermopsis*).

A cilindropermopsina tem outros efeitos tóxicos sobre células de vários órgãos do corpo, sendo, por isso, classificada adicionalmente como *citotoxina*. Pode acumular-se no pescado, como verificado no lagostim de água doce (Saker & Eaglesham, 1999). Cilindropermopsina é uma toxina de ação lenta, requerendo de cinco a sete dias para produzir seu efeito tóxico máximo. Em camundongos a DL<sub>50</sub> após 24 horas é de 2mg/Kg de peso corpóreo, enquanto que após cinco dias a DL<sub>50</sub> passa a ser de 0,2mg/Kg. (Terão, 1994). Por administração por via oral, a DL<sub>50</sub> após cinco dias é de aproximadamente 6mg/Kg (Seawright *et al.*, 1999).

Entretanto, a cianotoxina mais importante no mundo, por ser a mais frequente nas florações e com maior número de casos de contaminação é a *microcistina* (revisão dos vários aspectos da microcistina em Roset *et al.*, 2001; Leal & Soares, 2004; Zurawell *et al.*, 2005). Pela sua importância mundial, a espécie *Microcystis aeruginosa* e a microcistina são extensamente utilizadas como modelos das pesquisas de toxicidade genética e ocorrência nos ambientes. Por isso, tanto no exterior como no Brasil, a microcistina é a toxina cujos detalhes são mais conhecidos, além de outras, tendo limites máximos na água especificados pelas legislações federais de saúde e de meio ambiente, e sabe-se que esteve implicada em óbito e graves intoxicações, bem como foi detectada em pescado no país.

A toxicidade da microcistina em animais de laboratório apresenta DL<sub>50</sub> entre 25 e 150mg/Kg de peso corpóreo para extrato bruto e entre 5.000 e 10.900µg/Kg de peso corpóreo para toxina purificada por administração oral (Chorus e Bartram,1999). A DL<sub>50</sub> para as nodularinas em camundongos varia entre 50 a 200µg/Kg de peso corpóreo de toxina purificada (Rinehart *et al.*, 1994).

b) **Neurotoxinas** (toxinas paralisantes): substâncias que inibem o funcionamento das células nervosas, perturbando a movimentação e o equilíbrio dos peixes na água. O seu efeito é rápido, poucos minutos a algumas horas após a ingestão, provocando nos vertebrados, paralisia motora e respiratória, falência do coração e danos específicos em órgãos, seguida de morte. Em invertebrados provoca redução do crescimento e resistência à toxina (Leflaive & Ten-Hage, 2007).

As toxinas pertencentes a esta classe são as anatoxinas (produzidas por *Anabaena*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon*) e o grupo PSP (paralytic shellfish poison), que inclui a saxitoxina, neo-saxitoxina e as C-toxinas (produzidas pelos gêneros *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* e *Planktothrix*). Curiosamente, toxinas do grupo PSP são também produzidas por dinoflagelados marinhos nas marés vermelhas. *Aphanizomenon* é um caso especial de cianófitas, pois libera a neurotoxina durante o seu desenvolvimento e não somente após a morte da célula, como é típico do grupo. As toxinas desta classe não chegam a se acumular no meio ambiente (em contraste à hepatotóxica

microcistina), pois são rapidamente degradadas pela luz e microrganismos. No Brasil, a saxitoxina é produzida em mananciais e açudes principalmente por *Cylindrospermopsis raciborskii* - espécie cuja floração se tornou frequente pelo país (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003). A DL<sub>50</sub> em camundongos para saxitoxina purificada é de 10µg/Kg de peso corpóreo, enquanto que por consumo oral a DL<sub>50</sub> é de aproximadamente de 263,0µg/Kg de peso corpóreo (Chorus e Bartram, 1999). A DL<sub>50</sub> para anatoxina em camundongos é de 20µg/Kg de peso corpóreo e, portanto, dez vezes mais potente que a anatoxina-a, porém não há registro de intoxicação humana por esta toxina. Em consequência da pouca ocorrência deste tipo de neurotoxina, ainda não foi estabelecido um limite máximo aceitável para consumo oral humano (Carmichael, 1994; Falconer, 1998). Entretanto, no Brasil já foi confirmada a inibição de acetilcolinesterase pela anatoxina proveniente por florações de *Anabaena spiroides*, no Rio Grande do Sul (Monserrat *et al.*, 2001).

c) ***Dermatotoxinas*** (toxinas irritantes): substâncias produzidas por cianofíceas filamentosas de água doce, salobra e marinha, pertencentes aos gêneros *Lyngbya* e *Schizothrix*. Podem provocar dermatite severa, irritação dos olhos e formação de bolhas e descamação da pele em pessoas expostas a elas no ambiente. A aspiração da toxina volatilizada provoca irritação do trato respiratório. O consumo de peixes e moluscos expostos à toxina pode causar diarreia e vômitos. As dermatotoxinas ainda são pouco conhecidas, mas sabe-se que a inflamação da pele é causada pelas lingbiatoxinas e aplisiatoxinas, que se mostraram potentes agentes promotores de tumor em experimentos com animais. Estas evidências indicam que existem efeitos tóxicos mais amplos, mas ainda desconhecidos. O gênero *Lyngbya* pode crescer no fundo de canais, lagos e viveiros na região estuarina, de onde se desprende e flutua em extensas massas, as florações denominadas “balsas de *Lyngbya*” (Leflaive & Ten-Hage, 2007).

Estas florações de *Lyngbya* vêm se expandido ano a ano em regiões quentes do litoral dos Estados Unidos da América (EUA) e Austrália, recobrando praias e ambientes antes ocupados por pela restinga. Devido à gravidade, o governo da Austrália edita um boletim na internet sobre os progressos no manejo desta cianofícea (*Lyngbya* Update Newsletter, [www.healthywaterways.org](http://www.healthywaterways.org)). No Brasil, constatamos a formação de “balsa de *Lyngbya*” em tanque estuarino no Nordeste (Leflaive & Ten-Hage, 2007).



As cianotoxinas apresentam efeitos deletérios tanto para animais vertebrados como para invertebrados, mas a intensidade varia conforme a espécie. A truta arco-íris, peixe sensível, não ingere cianofíceas por ser carnívoro, porém, apenas pelo contato com o organismo ou a toxina, sofre distúrbio pela endotoxina (lipopolissacarídeo) da cianofíceas e uma rápida necrose do fígado pela cianotoxina (Best *et al.*, 2003). Mesmo as espécies de peixe consideradas as mais resistentes, como a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) e a carpa prateada (*Hipophthalmichthys molitrix*), por se alimentarem em sua maioria das vezes de cianofíceas tóxicas (*Microcystis* e outras), são afetadas pelas toxinas. Por exemplo, a cianotoxina microcistina intoxica o metabolismo da carpa prateada (Blaha *et al.*, 2004), bem como bloqueia o funcionamento das brânquias da tilápia (Bury *et al.*, 1996; 1998), fazendo com que os peixes percam a resistência e a capacidade respiratória após exposição àquela toxina, o que facilita a morte através de parada respiratória. Num viveiro de aquicultura com intensa floração das cianofíceas *Microcystis* e *Aphanizomenon*, a tilápia nilótica, a carpa prateada e outras sofreram mortandade em massa, com as brânquias pálidas, possivelmente pela combinação do efeito das cianotoxinas com a redução do teor de oxigênio na água pela floração (Jewel *et al.*, 2003).

Assim, apesar daquelas espécies resistentes serem conhecida por sobreviver sob baixa concentração de oxigênio dissolvido durante várias horas no ambiente, isto deixa de ser verdade se há floração de cianofíceas em seu ambiente natural, no viveiro, ou na represa em que estiver localizado o tanque-rede.

Certas espécies de cianofíceas são conhecidas por produzirem toxinas, enquanto outras não as produzem. Dentre os cerca de 150 gêneros reconhecidos de cianofíceas, aproximadamente 46 espécies foram identificadas como potencialmente tóxicas aos vertebrados (Cunha *et al.*, 2003). Porém, a produção de toxina varia em cada espécie de cianofíceas pela interação de numerosos fatores, como a genética, o estado fisiológico do organismo e as variáveis ambientais (luz, temperatura, pH, nutrientes, idade da população, a presença de competidores e predadores, dentre outros fatores).

Uma população de *Microcystis* ou *Planktothrix*, por exemplo, pode ser composta por indivíduos que têm o gene de síntese de microcistina (*mcy*) ativado, e, portanto, produzindo

toxina, enquanto outros indivíduos têm aquele gene desativado ou mesmo não têm o gene, o que os torna não-tóxicos (Kurmayer *et al.*, 2002; Christiansen *et al.*, 2003). O predomínio de um ou do outro tipo na população faz com que existam populações tóxicas e outras não-tóxicas da mesma cianofíceia. Por isso, a toxicidade de uma espécie de cianofíceia encontrada num lago ou viveiro deve ser sempre referida no condicional (cianofíceia *potencialmente* tóxica), até que se tenha uma confirmação analítica da toxicidade. No Brasil, a toxicidade foi confirmada em 82% das linhagens de cianofíceas isoladas de ambientes de água doce (Soares *et al.*, 2003).

As cianofíceas são formadas por indivíduos microscópicos e com pouco detalhe externo. Para profissionais treinados, a identificação dos gêneros que ocorrem no Brasil pode ser realizada com base no manual de Sant'Anna *et al.* (2006).

Há espécies cujos indivíduos vivem isolados na água, mas o comum é formarem colônias de milhares a milhões de células, com aparência gelatinosa ou formando longos filamentos. O grande número de células reunidas nas colônias as torna normalmente visíveis a olho nu. Ao microscópio, cada célula tem a forma mais comum, esferoidal ou cilíndrica, com diâmetro de 1 a 5 micrômetros. Mas ao proliferarem justapostos geram filamentos com até 1mm de comprimento, e o conjunto pode formar extensos tapetes vivos.

As legislações ambiental e sanitária no Brasil e no exterior estabelecem os limites máximos de cianofíceas em função do número de indivíduos ou células presentes em um volume da amostra. Assim, para cada filamento ou colônia gelatinosa devem ser contadas todas as suas células sob o microscópio, para obter o número ou volume total de suas células (biovolume).

A legislação federal brasileira regula a densidade máxima admissível de cianofíceas no ambiente aquático e para a utilização de água, como pode ser visto na tabela 2.1. Para a aquicultura, isto significa que (a) um produto da aquicultura ou pesca extrativista *não* poderia ser colhido sob densidades de cianofíceas no ambiente que ultrapassem o limite legal da Classe 2. (b) Um efluente da aquicultura contendo cianofíceas não poderia ser lançado num corpo receptor (rio, estuário, açude, etc.) se o fizer ultrapassar o limite legal da Classe 2. E (c)

caso o efluente da aquicultura seja lançado num corpo d'água (rio, açude, etc.) usado à jusante para captação de água para uma comunidade ou cidade, o monitoramento será intensificado.

**Tabela 2.1:** Limites para cianofíceas na legislação brasileira.

<b>Ambiente</b>	<b>Limite máximo de cianofíceas</b>
Meio Ambiente	Aquicultura de água doce só pode ser realizada em corpos d'água de Classe 2, para os quais o limite máximo admissível de cianofíceas é de 50 mil células/mL ou 5 mm <sup>3</sup> /L (CONAMA 357/2005).
Saúde Pública	Produção de água potável, o monitoramento de cianofíceas na água bruta (antes do tratamento) deve ser efetuado em frequência determinada a partir de 10 mil células/mL ou 1 mm <sup>3</sup> /L. O uso de algicidas no manancial é proibido sob densidades maiores que 20 mil células/mL, para evitar a liberação de grande quantidade de toxina na água. O limite máximo admissível para cianotoxinas na água tratada é de: microcistinas: 1µg cilindrospermopsinas: 15µg/L e saxitoxinas: 3µg/L (Portaria MS nº. 518/2004).
Recreação Aquática	Esportes aquáticos de contato direto com a água no ambiente, como natação, mergulho ou esqui-aquático: a água será considerada imprópria para a atividade quando “ocorrer floração de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana”. Além disso, as praias e balneários devem ser interditados na “ocorrência de toxicidade ou formação de espuma decorrente de floração de algas ou outros organismos”. Estas determinações abrangem águas doce, salobra e marinha (CONAMA 274/2000).

## **Capítulo 3 – Objetivos**

### **3.1. – Objetivos Gerais**

Avaliar a ocorrência de cianofíceas nos pesque-pagues da região dos Inconfidentes, e analisar sua potencial toxicidade.

### **3.2. – Objetivos Específicos**

Verificar a qualidade da água dos pesque-pagues;

Avaliar a presença qualitativa e quantitativa de cianofíceas;

Realizar amostragem e identificar os gêneros das cianofíceas presentes;

Realizar cultivo para a produção de biomassa;

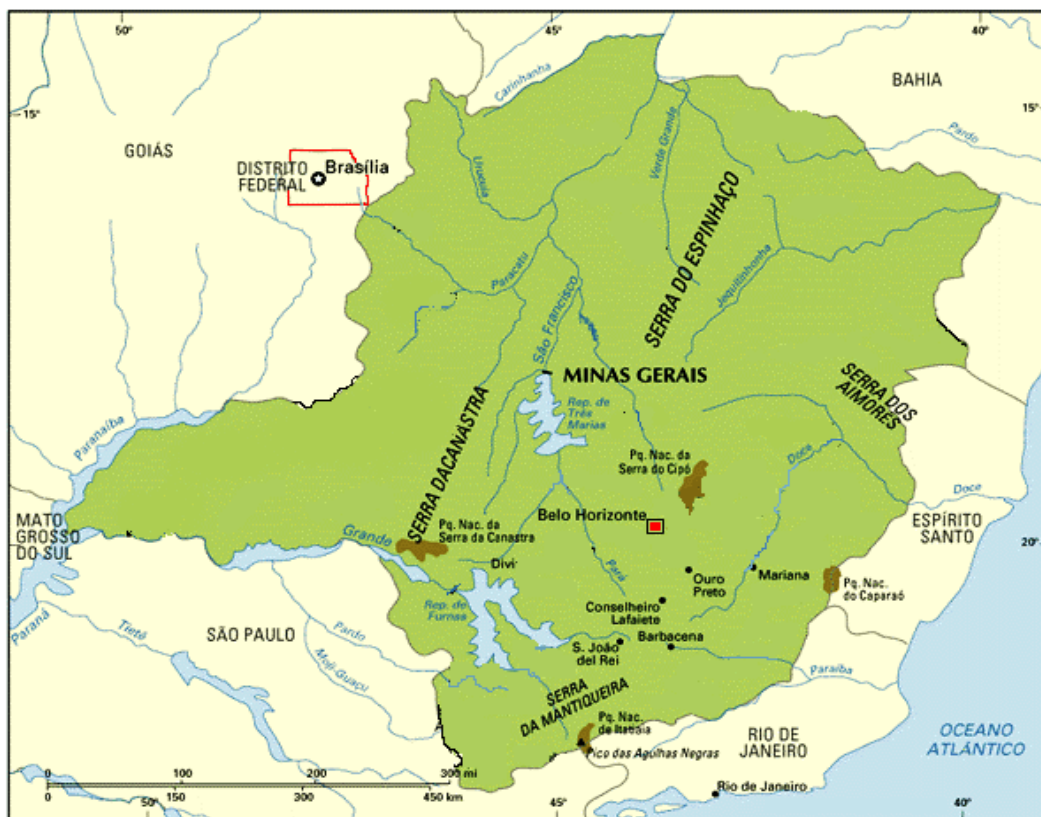
Avaliar *in vivo*, o potencial tóxico dessa cianofíceas ou cianotoxinas;

Calcular a DL<sub>50</sub>.

## Capítulo 4: Parte Experimental

### 4.1 – Área de Estudo

A Região dos Inconfidentes, no estado de Minas Gerais (Figura 4.1) foi a área desse trabalho, pois abrange grande concentração de rios e represas, além de possuir uma grande quantidade de pesque-pagues. Esta região compreende cerca de 20 cidades, desde o município de Ponte Nova até Barbacena, incluindo: Acaiaca, Diogo Vasconcelos, Mariana, Ouro Preto, Santa Bárbara, Catas Altas, Barão de Cocais, Ouro Branco, Itabirito, Congonhas, São Brás do Suaçuí, Entre Rios de Minas, Lagoa Dourada, Coronel Xavier Chaves, Santa Cruz de Minas, São João Del Rei, Barroso, Alfredo Vasconcelos, Ressaquinha, Carandaí, Tiradentes e Conselheiro Lafaiete (Figura 4.2).



Fonte: [www.mapsgoogle.com.br](http://www.mapsgoogle.com.br)

Figura 4.1: Mapa de Minas Gerais, com cidades, rios e APAs.



Fonte: [www.mapsgoogle.com.br](http://www.mapsgoogle.com.br)

Figura 4.2: Mapa de Minas Gerais, com algumas cidades que compõem a área de estudo.

Os pesque-pagues foram escolhidos aleatoriamente, através de sorteio. As coletas foram realizadas com a autorização dos proprietários. Entre março de 2008 e Janeiro de 2009, 88 amostras foram coletadas mensalmente, abrangendo os períodos de chuva (outubro a março) e de seca (abril a setembro).

#### **4.2 – Estação de amostragem, coletas e fixação das amostras.**

As amostras foram coletadas nas margens dos tanques e em regiões mais centrais de cada um deles, com ênfase na comunidade fitoplânctonica.

As coletas foram feitas utilizando-se rede de plâncton (20  $\mu\text{m}$  de abertura de malha) (figura 4.3) ou simplesmente pela passagem do frasco aberto na lâmina d'água. O método foi empregado para que se tivesse uma melhor amostragem, pois a profundidade dos tanques não é elevada, sendo próxima à 1,5m em todos os tanques. A rede foi passada várias vezes sobre a superfície, com o arraste horizontal de aproximadamente 3 metros da região mais central para a marginal dos tanques.



Fonte: Limnotec

Figura 4.3: Rede de fitoplâncton de malha de 20 µm.

As amostras coletadas foram fixadas *in situ* com soluções de *Transeau*, de FAA e de Lugol em frascos distintos, na proporção 1:1 com a água, e armazenadas em frascos de vidro padronizados tipo penicilina com capacidade de 2mL, envolvidos com papel alumínio para que a solução não ficasse exposta à luminosidade.

Diferentes amostras foram coletadas em frascos de vidro de 500mL. Estas amostras não foram fixadas, para observação de material vivo ao chegar no laboratório e de seu isolamento.

#### 4.3 – Variáveis Físicas e Químicas da água

As variáveis físicas e químicas mensuradas no momento da coleta e os respectivos métodos utilizados estão relacionados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Variáveis físicas e químicas mensuradas no momento da coleta e seus respectivos equipamentos.

Variáveis	Equipamentos
Temperatura da água (°C)	pHgâmetro portátil digital – WTW modelo pH 330i/Set
pH	pHgâmetro portátil digital – WTW modelo pH 330i/Set
Condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Condutímetro portátil digital - WTW modelo Cond 340i

## **4.4 – Estudo Taxonômico**

### **4.4.1 – Observação do material**

Para observação do material, foi utilizado microscópio óptico binocular Olympus modelo CX-21. As fotografias foram realizadas com câmera digital Samsung modelo Digimax A 503. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

### **4.4.2 – Identificação e sistema de classificação**

A identificação dos táxons foi possível com o auxílio de chaves de identificação e microscópio óptico. Indivíduos isolados somente foram identificados quando suas características diacríticas estiveram presentes.

Para cada amostra foram preparadas, no mínimo, cinco lâminas, a fim de observar o maior número possível de táxons que ocorrem nessas amostras, sendo examinadas todas as amostras vivas com o propósito de identificar os indivíduos do grupo de cianofíceas e isolá-las.

Para destacar a presença de bainha mucilaginosa foram preparadas lâminas com corante Nanquim.

A identificação taxonômica em níveis infragenéricos foi baseada em bibliografia específica. Sempre que possível, foi consultada a obra original dos táxons identificados para que cada um deles pudesse ser preservado e eventualmente comparado com outros mais atuais.

A chave de identificação utilizada foi “Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições”, segundo Bicudo e Menezes (2006).



#### 4.4.2.1 – Chave de Identificação

Classe Cyanophyceae

Chave de Identificação dos gêneros de Cyanobacteria encontrados nos tanques de pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG

1. Células Isoladas, agregadas ou formando colônias .....	2
1. Filamentos isolados, agregados ou formando colônias .....	42
2. Divisão celular por fissão binária com produção de células-filha ou por fissão binária e múltipla com produção de células-filha baeófitas; geralmente células isopolares .....	3
2. Divisão celular por fissão binária na extremidade de células sésseis com produção de exócitos ou exclusivamente por fissão múltipla com produção de baeófitas; sempre células heteropolares .....	38
3. Divisão celular em 1 a 3 planos por fissão binária .....	4
3. Divisão em mais de três planos por fissão binária e múltipla .....	30
4. Divisão celular em um plano .....	( <b>Synechococcaceae</b> ) 5
4. Divisão celular em 2 ou 3 planos .....	18
18. Divisão celular em 2 planos .....	( <b>Merismopediaceae</b> ) 19
18. Divisão celular em 3 planos .....	( <b>Microcystaceae</b> ) 28
28. Colônias cúbicas .....	<i>Eucapsis</i>
28. Colônias irregulares .....	29
29. Células geralmente sem envelope individual, aerótopos sempre presentes ..	<b><i>Microcystis</i></b>
29. Células ou grupo de células obrigatoriamente com envelope individual; aerótopos ausentes .....	<b><i>Gloeocapsa</i></b>
42. Tricomas homocitados .....	43
42. Tricomas heterocitados .....	57
43. Células mais longas que largas; tricomas finos (em geral 3 µm de diâmetro no máximo) .....	44
43. Células quadráticas mais largas que longas; tricomas mais largos (em geral 4 µm de diâmetro no mínimo) .....	53
44. Tricomas com bainha mucilaginosa firme .....	45

44. Tricomas sem bainha ou apenas com mucilagem difluente .....	50
50. Tricomas curtos (em geral até 8 células), curvos, sigmóides ou ainda espiralados	
<b>Romeria</b>	
50. Tricomas mais longos ou, quando curtos, sempre retos .....	51
51. Tricomas geralmente atenuados; células sem aerótopos .....	<b>Geitlerinema</b>
51. Tricomas cilíndricos; células com ou sem aerótopos .....	52
52. Células geralmente sem aerótopos ou, se presentes, localizados apenas nos pólos	
<b>Pseudoanabaena</b>	
53. Células muito curtas; no mínimo 4 vezes mais largas que longa .....	<b>(Oscillatoriaceae)</b>
54. Tricomas sem bainha mucilaginosa .....	<b>Oscillatoria</b>
69. Tricomas sempre curtos (geralmente até 8 células) .....	<b>(Borziaceae) Borzia</b>
69. Tricomas mais longos .....	70
70. Tricomas regularmente espiralados .....	<b>(Phormidiaceae) 71</b>
70. Tricomas retos, flexuosos, ondulados ou, em poucos casos, apenas com espirais irregulares .....	72
72. Células com aerótopos .....	<b>Planktothrix</b>
72. Células sem aerótopos .....	73
73. Tricomas com ramificações .....	74
73. Tricomas sem ramificações .....	75
75. Bainha ausente .....	<b>Tychonema</b>
75. Bainha presente .....	76
76. Apenas 1 tricoma/bainha .....	77
76. Mais de 1 tricoma/bainha .....	78
77. Bainha espessa, lamelada, geralmente colorida .....	<b>Porphyrosiphon</b>
77. Bainha fina, homogênea, geralmente hialina .....	<b>Phormidium</b>

#### 4.5 – Isolamento dos gêneros

Os gêneros identificados em cada uma das amostras foram isolados utilizando meio de cultivo ASM-1, BG-11 com nitrogênio e BG-11 sem nitrogênio, em meio líquido ou agregado ao ágar nutriente Difco™.

Outra técnica de isolamento utilizada, além de repicagem sucessiva, foi à micro-pipetagem sucessiva, onde ocorre a captura de filamentos ou de colônias de cianofíceas isoladamente, evitando que outras microalgas cresçam no meio de cultivo, e, prevaleçam sobre a cianofícea.

O indivíduo isolado era colocado em placas de Petri ou em Erlemeyer de 250 mL, para que se obtivesse biomassa suficiente para se lisar as células e inocular em cobaias.

#### **4.6 – Ensaio Toxicológico**

A fim de obter as cianotoxinas em quantidade para análise toxicológica, as culturas de cianofíceas isoladas foram incubadas em estufa com temperatura e luminosidade controladas (19° C e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro), para que se obtivessem altas quantidades de biomassa.

As culturas foram inicialmente centrifugadas, a uma temperatura de 19°C e rotação de 20000rpm, para a extração de todo o meio de cultivo presente nos filamentos e colônias de cianofíceas. Após a primeira centrifugação, foram ressuspensas e lavadas com água destilada para retirar qualquer resíduo de meio de cultivo que pudesse interferir nos sintomas de intoxicação, sendo realizado esse processo por mais duas vezes, obtendo-se um *pélet* composto exclusivamente por cianofíceas.

O *pélet* obtido pela centrifugação foi levado para um sonicador, afim de lisar as células de cianofíceas, com períodos de 15 a 20 pulsos a cada 5 segundos. As culturas foram mantidas sob resfriamento, durante todo o processo de lise celular.

Durante a lise de um do gênero *Phormidium*, foi necessário a utilização de pérolas de vidro para auxiliar no processo, pois o mesmo possui um alto poder de agregação, o que inviabilizou a lise dos filamentos e das células apenas com o sonicador.

Não se utilizou acréscimo de água destilada no processo de sonicação e, após a lise das culturas, observou-se um extrato bruto líquido, vindo da água presente nas células lisadas.

Os extratos brutos obtidos foram guardados em tubos esterilizados e armazenados em freezer até sua utilização.

Para a realização da análise toxicológica aguda, foram administrados, por via oral em 100 camundongos de 30 dias de vida, quatro diferentes doses de extrato bruto bruto: 5, 10, 50 e 100mg/kg de peso corpóreo, além do controle, que recebeu apenas água destilada.

Na análise de toxicologia crônica foram utilizadas doses sucessivas de extrato bruto bruto em concentrações de 100mg/Kg de peso corpóreo. Doses sucessivas foram administradas por um período de 72 horas, sendo que as doses foram aplicadas, por via oral, de 1 em 1 hora por quatro horas em todos os dias .

Os camundongos foram observados por 72 horas após a administração do extrato bruto de cianofíceas. A fim de analisar os sintomas apresentados, as observações foram realizadas de hora em hora nas primeiras doze horas e, após esse período, de 12 em 12 horas.

## Capítulo 5 – Resultados e Discussão

### 5.1 - Caracterização dos tanques estudados

Nos pesque-pagues (figuras 5.1 a 5.5) a água dos tanques vem dos rios e lagos do entorno da propriedade. O excesso desta água é lançado em corpos d'água sem nenhum tratamento para eliminar os poluentes. Observam-se florações de cianofíceas em algumas épocas do ano, levando à morte de peixes em alguns tanques ou por intoxicação ou por baixa de oxigenação na água.



Figura 5.1: Vista parcial do tanque de pesque-pague pela margem esquerda, em Ponte Nova.



Figura 5.2: Vista parcial do tanque de pesque-pague, em São Brás do Suaçuí.



Figura 5.3: Vista parcial de um dos tanques do pesque-pague de Tiradentes na margem esquerda.



Figura 5.4: Vista parcial dos tanques de pesque-pague, em Tiradentes.

Os tanques não apresentavam presença de macrófitas (figuras 5.1 a 5.4), que tenha sido possível sua visualização. Em alguns deles foi possível observar a presença de “bloom” de cianofíceas em algumas coletas (figura 5.5), pois a lâmina d’água possuía aspecto idêntico a outras florações ocorridas em lagoas. O material coletado é representante apenas do fitoplâncton, já que não foram coletados animais nos tanques.

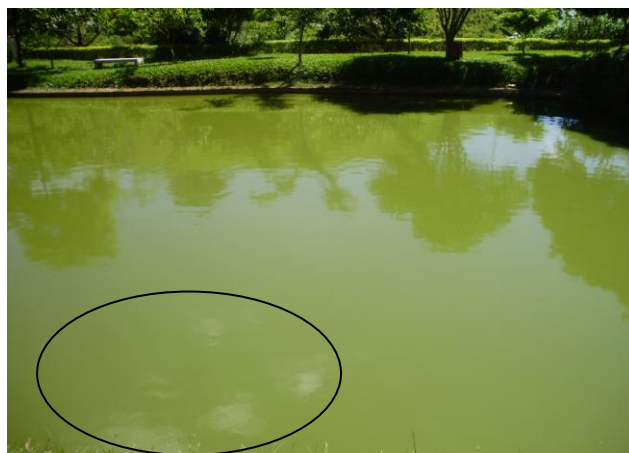


Figura 5.5: Tanque com floração de cianofíceas destacada.

## 5.2 – Pesquisa de Cianofíceas

A tabela 5.1 apresenta os pesque-pagues sorteados, suas respectivas localizações e os principais gêneros de cianofíceas encontrados, além de chlorophyta.

**Tabela 5.1:** Localização dos pesque-pagues da Região dos Inconfidentes e os principais indivíduos encontrados.

Pesque-pague	Cidade	Fitoplânctons identificados
1	Ponte Nova	<i>Phormidium</i> sp.
2	Mariana	<i>Geitlerinema</i> sp.
3	Ouro Preto	<i>Microcystis</i> sp.
4	Ouro Preto	<i>Chlorophyta</i>
5	Tiradentes	<i>Anabaena</i> sp.
6	Tiradentes	<i>Nostoc</i> sp.
7	São Brás do Suaçuí	<i>Chlorophyta</i>
8	Itabirito	<i>Microcystis aeruginosa</i>

Cinco gêneros de cianofíceas foram encontrados nos tanques em questão, dentre os quais quatro são produtores de toxinas, e, apenas um é potencialmente tóxico (*Phormidium*). A

justificativa da ocorrência é devido à presença de grande quantidade de nutrientes que são disponibilizados na ração para alimentação dos peixes.

No tanque do pesque-pague, em Mariana, ocorreu morte súbita dos peixes, fazendo com que o proprietário esvaziasse e lavasse o tanque. Em Itabirito, o proprietário se desfez do pesque-pague, esvaziando o tanque, e com isso não pôde haver conclusão das coletas nesses locais.

Observando a tabela 5.2 pode-se constatar que em todos os tanques analisados há condições de sobrevivência e reprodução das cianofíceas, uma vez que ocorrem em condições semelhantes às observadas no cultivo em laboratório. Também foi possível visualizar que as temperaturas não variaram muito, demonstrando que, onde não foram observadas cianófitas nos tanques não necessariamente depende da temperatura, mas também do pH e da condutividade elétrica, pois tanto o pH quanto a condutividade elétrica irão favorecer o desenvolvimento desses indivíduos.

O pH mais favorável é próximo à 7. Já a condutividade elétrica nos determina a quantidade de íons presentes no ambiente.

**Tabela 5.2:** Valores médios dos resultados dos parâmetros físico-químicos dos tanques de pesque-pagues da Região dos Inconfidentes – MG.

Tanques	Condutividade Elétrica ( $\mu\text{E}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH
Ponte Nova	21,4	21,9	6,9
Mariana	58,5	23,5	6,9
Ouro Preto	5,0	18,0	7,0
Ouro Preto	4,5	20,0	7,5
Tiradentes	10,0	24,4	7,0
Tiradentes	12,4	22,3	6,9
São Brás do Suaçuí	60,2	19,0	7,3
Itabirito	1,3	19,3	6,8

Apesar dos tanques não apresentarem macrófitas, foi possível observar em algumas coletas a presença de floração de cianofíceas, pois a lâmina d'água apresentava aspecto idêntico às



florações ocorridas em lagoas contaminadas por essas microalgas. O aumento da concentração de algumas espécies de microalgas determina os graus de eutrofização, pois sua proliferação é determinada pela grande concentração de poluentes na água.

### **5.3 – Identificação dos gêneros de cianofíceas encontrados nos pesque-pagues da Região dos Inconfidentes – MG**

As famílias encontradas nos pesque-pagues da Região dos Inconfidentes são, em sua maioria, tóxicas ou possíveis produtoras de toxinas, sendo elas identificadas e caracterizadas segundo a chave de identificação de Bicudo e Menezes (2005).

#### **FAMILIA MICROCYSTACEAE**

##### ***Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907**

*Microcystis* (figura 5.6) é um gênero colonial, tipicamente planctônico e que comumente forma florações em corpos d'água eutrofizados. As colônias podem ser microscópicas ou macroscópicas, esféricas, irregulares ou alongadas e às vezes formadas por subcolônias. O envelope mucilaginoso é sempre incolor e pode ser amplo ou estreito, difluente ou firme, homogêneo ou com protuberâncias. As células são esféricas, obrigatoriamente com aerótopos e estão arranjadas irregularmente no interior da colônia ou subcolônia. A divisão celular ocorre por fissão binária em três planos. As células-filhas crescem atingindo a forma e o tamanho originais antes da próxima divisão.

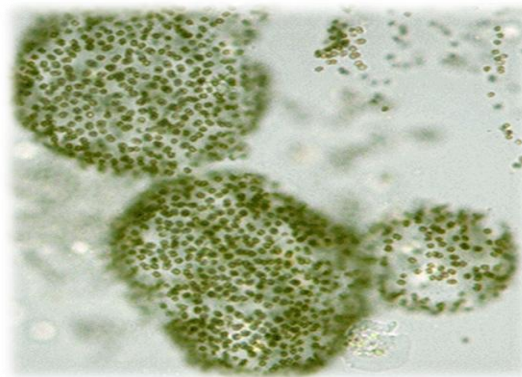


Figura 5.6: *Microcystis* visualizadas ao microscópio óptico.

São conhecidas mundialmente cerca de 25 espécies de *Microcystis*, todas de ambientes aquáticos. Entretanto, a identificação em nível específico é bastante difícil e, por vezes, problemática. Muitas espécies de *Microcystis* são produtoras da hepatotoxina microcistina. Conforme Sant'Anna & Azevedo (2000), este é o gênero com mais ampla distribuição em território brasileiro e que apresenta a maior incidência de florações em reservatórios de abastecimento público. As diversas espécies de *Microcystis* já referidas para o território brasileiro podem ser identificadas por meio dos trabalhos de Komárek *et al.* (2002) e Sant'Anna *et al.* (2004). Recomendo também os trabalhos de Komárek (1991) e Komárek & Anagnostidis (1999) para identificação das espécies.

## **FAMILIA NOSTOCACEAE**

### ***Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault 1888**

Os talos são macro ou microscópicos, coloniais, arredondados, lobados ou irregulares. Os tricomas estão frouxos ou densamente emaranhados e sempre envoltos por mucilagem colonial conspícua hialina amarelada ou castanha. Os tricomas são isopolares, geralmente constrictos e não atenuados em direção ao ápice. As células são arredondadas, elípticas ou em forma de barril. O conteúdo celular é verde-azulado ou verde-acastanhado, sem aerótopos. Os heterócitos são terminais ou intercalares. Acinetos podem ser arredondados, elípticos ou cilíndricos e formam cadeias entre dois heterócitos. A reprodução se dá pela fragmentação dos tricomas ou pela germinação dos acinetos.

*Nostoc* é um gênero bem distribuído em todo o mundo e apresenta mais de 200 espécies descritas. A maioria das espécies vive no perifíton onde ocorre, principalmente, sobre plantas, pedras e rochas. Algumas espécies são subaéreas ou edáficas e podem formar talos macroscópicos que atingem mais de 20cm de tamanho. Em geral, as espécies de *Nostoc* não resistem a ambientes poluídos (Komárek *et al.*, 2003). No Brasil, poucas espécies foram mencionadas e podem ser identificadas usando trabalhos como os de Azevedo (1991), Sant'Anna (1991) e Werner (2002).

## FAMILIA PHORMIDIACEAE

### *Phormidium* Kützing ex Gomont 1982

Espécimes de *Phormidium* (figura 5.7) podem ser encontrados isoladamente entre outras microalgas, formando massas de filamentos emaranhados. Tais massas podem ser mucilaginosas, membranáceas ou semelhantes a feltro ou a couro (duras e rígidas). A coloração também varia entre verde-escuro, verde-azulado, avermelhada, castanha ou marrom, entre outras. As espécies variam muito quanto à forma do filamento, que pode ser reta, curvada ou irregularmente espiralada ou ondulada, não ocorrendo qualquer tipo de ramificação. Embora comumente apresentem bainha mucilaginosa, não há obrigatoriedade de sua ocorrência, visto que, muitas vezes, sua presença está associada a condições ambientais específicas. Quando presentes, tendem a ser delgada, hialina e homogênea. Os tricomas são relativamente longos e o diâmetro pode chegar a 15µm. Suas células são tipicamente isodiamétricas ou pouco mais longas ou mais curtas do que largas e não apresentam aerótopos. A reprodução ocorre pela formação de hormogônios, às vezes com fragmentação total do tricoma, com a ocorrência de necrídios.

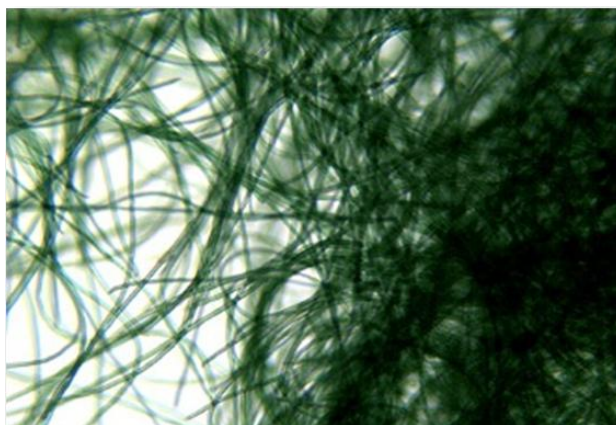


Figura 5.7: *Phormidium* vista ao microscópio óptico.

*Phormidium* pode ser encontrado em diferentes tipos de habitats, sendo um gênero muito comum e que também pode ocorrer em ambientes extremos, como, por exemplo, os polares, os desérticos e em águas termais. Inclui por volta de 200 espécies distribuídas em todo o globo terrestre. Na literatura nacional são encontrados muitos artigos com referência a espécies do

gênero, sendo que os trabalhos de Sant'Anna & Azevedo (1995) e Branco *et al.* (1999) são recomendados para consulta por vários autores.

## **FAMILIA PSEUDANABAENACEAE**

### ***Geitlerinema* (Anagnostidis & Komárek) Anagnostidis 1989**

O talo forma massas e apresenta tricomas comumente dispostos em feixes. Às vezes, tricomas isolados também podem ocorrer. Os tricomas são retos ou flexuosos, sem bainha, raramente constrictos e geralmente atenuados em direção ao ápice, que pode ser curvo ou até torcido. Os tricomas apresentam intenso movimento deslizante ou oscilante. As células são mais longas do que largas antes da divisão. Geralmente, o conteúdo celular apresenta grandes grânulos dispersos ou localizados apicalmente e não apresenta aerótopos. A célula apical pode ser cônica ou cilíndrica e os pólos arredondados ou acuminados. A reprodução se dá pela formação de hormogônios móveis, sem ocorrência de necrídios.



Figura 5.8: *Geitlerinema* vista ao microscópio óptico.

O gênero *Geitlerinema* (figura 5.8) ocorre, normalmente, formando massas em ambientes subaéreos ou no perifíton entre macrófitas e outras algas ou, ainda, sobre sedimento e pedras. *Geitlerinema splendida* é uma das espécies mais comuns e apresenta, tipicamente, a célula apical alongada, atenuada, capitada, curva ou torcida. De acordo com Komárek *et al.* (2003). O

gênero conta com mais de 30 espécies. No Brasil, o trabalho de Komárek & Azevedo (2000) apresenta importantes informações sobre as espécies de *Geitlerinema*.

#### **5.4 – Culturas utilizadas no ensaio toxicológico**

As culturas avaliadas nos ensaios toxicológicos foram as de *Microcystis* e *Phormidium*. Embora tivesse sido identificados os gêneros *Nostoc*, *Geitlerinema* e *Anabaena*, não foi possível utilizá-los, já que não foram isolados, e não houve desenvolvimento desses gêneros em meio de cultivo no laboratório. Esta perda é justificada devido ao difícil manuseio para isolamento e à competição com as microalgas eucarióticas. As culturas perdidas apresentavam uma alta densidade de clorofíceas.

#### **5.5 – Administração Oral**

A administração oral foi realizada nos camundongos em diferentes concentrações (0, 5, 10, 50 e 100mg/Kg de peso corpóreo). O monitoramento dos indivíduos foi feito por um período de doze horas, com observação a cada hora, a fim de observar os primeiros sintomas de intoxicação. Decorridas às doze horas iniciais, o monitoramento passou a ser realizado a cada doze horas.

#### **5.6 – Intoxicação Aguda**

##### **5.6.1 – Extrato bruto de *Microcystis***

Nas concentrações de 5 e 10mg/kg de peso corpóreo do extrato bruto de *Microcystis* analisados observou-se que nenhum dos indivíduos apresentou sintomas de intoxicação, nem mesmo uma baixa de atividade física.

Na concentração de 50mg/kg de peso corpóreo observou-se que alguns indivíduos apresentaram vômitos no período de 0 a 12 horas, porém, mantiveram uma alta atividade física. Após as 12 horas não apresentaram quaisquer tipos de sintoma de intoxicação.

Na concentração de 100mg/kg de peso corpóreo observou-se em metade dos indivíduos baixa de atividade física e vômitos no período de 0 a 12 horas, com maior intensidade dos sintomas no período de 12 a 36 horas, prevalecendo o vômito no período de 24 a 36 horas após a administração do extrato bruto algáceo.

Os sintomas apresentados pelos indivíduos foram poucos e típicos de intoxicação alimentar (aguda). Vômito e baixa de atividade física são devidos às alterações que provocadas no sistema gastrointestinal, onde o próprio organismo do indivíduo tende a reverter às condições da intoxicação e dessa forma metabolizar a toxina. Sugere-se então que a toxina presente no extrato bruto seja hepatotóxica.

A pequena sintomatologia de intoxicação pode ser devida a baixa concentração utilizada ou que efeitos mais fortes e/ou letalidade nos indivíduos apresentem-se em acúmulo de doses.

#### **5.6.2 – Extrato bruto de *Phormidium***

Nas concentrações de 5, 10 e 50mg/kg de peso corpóreo do extrato bruto de *Phormidium* analisados observou-se que nenhum dos indivíduos apresentou sintomas de intoxicação ou baixa de atividade física.

Na concentração de 100mg/kg de peso corpóreo, a baixa de atividade física e vômito no período de 0 a 5 horas foram observados para alguns indivíduos, prevalecendo o vômito no período de 3 a 5 horas após a administração do extrato bruto algáceo. Após esse período de 5 horas observou-se que os indivíduos que apresentaram sintomas, principalmente o vômito, apresentaram baixa atividade física, mas ao ingerirem água ao longo de algum tempo se restabeleceram e voltaram a ter atividade física normal.

## 5.7 – Intoxicação Crônica

Foram utilizados camundongos de 30 dias de vida, para a realização dessa etapa do ensaio de intoxicação. Esperava-se a observação de sinais de forte intoxicação nas primeiras doses, pois as doses sucessivas favoreceriam tal resultado. Porém, nas primeiras 24 horas, os sintomas visualizados foram à diminuição da atividade física e o vômito, tanto para indivíduos que receberam o extrato bruto algáceo de *Phormidium* quanto para os que receberam o extrato bruto algáceo de *Microcystis*.

No segundo dia (24 a 48 horas) foram administradas mais quatro doses (5ª a 8ª dose sucessiva), e, após a 8ª dose, os sintomas de intoxicação apresentados foram mais fortes, pois ambos os extrato brutos geram atividade física diminuída e vômito. Também se observou o óbito de dois indivíduos que receberam extrato bruto de *Microcystis* após a 8ª dose em 10 a serem administradas.

No período de 48 a 72 horas, foram administradas mais quatro doses (9ª a 12ª doses sucessivas), sendo observado à morte de mais quatro indivíduos após a segunda dose diária (10ª dose sucessiva), em camundongos que receberam extrato bruto de *Microcystis*.

Os camundongos que receberam extrato bruto de *Phormidium* intensificaram os sintomas já observados, porém não ocorreu nenhum óbito.

Analisando os resultados obtidos pode-se inferir que a *Microcystis* obtida nos tanques de pesque-pague produziu toxina mesmo após ser isolada e mantida em laboratório, sob condições controladas, pois houve mortes de dois indivíduos após a 8ª dose do extrato bruto, e de 04 indivíduos, após a 10ª dose do extrato bruto de *Microcystis*.

Os resultados sugerem que *Phormidium* não produziu toxina ou a dose foi pequena para tal resposta toxicológica, pois os sintomas de intoxicação não foram intensos e tampouco ocorreu a morte de camundongos.

Devido ao baixo conhecimento sobre as cianotoxinas e a identificação do tipo de toxina produzida pela cianofíceia não foi possível purificá-la. Além disso, no ambiente natural – tanque de pesque-pague, lagos, córregos entre outros corpos d’água – essas toxinas não se encontram puras, tornando-se alguns animais e plantas bioacumuladores, ou seja, acumulam-se ao longo da cadeia alimentar até o consumidor final, geralmente o ser humano. Isto pode ser observado no caso do reservatório de Itaparica – BA em 1988, quando pescadores que se alimentaram de peixes contaminados sofreram intoxicação, que levou a morte de alguns moradores da região que consumiam peixes do reservatório.

### **5.8 – Cálculo da DL<sub>50</sub>**

Para o extrato bruto de *Phormidium*, não foi possível calcularmos a dose de letalidade, pois não houve morte de indivíduos, mesmo sendo submetidos a doses diárias de extrato bruto apenas se observou sintomas de intoxicação alimentar: vômito, baixa atividade física e inchaço abdominal.

No extrato bruto de *Microcystis*, pode-se observar a morte de dois camundongos após a 8ª dose de extrato bruto e quatro mortes após a 10ª dose de extrato bruto, podendo, assim, sugerir que uma dose de letalidade (DL<sub>50</sub>) foi atingida com a média de 9 doses de concentração de 100mg/Kg de peso corpóreo cada.

Também se pode afirmar que os indivíduos que receberam o extrato bruto de *Microcystis* tiveram uma dose de letalidade de 60% dos indivíduos em aproximadamente 900mg/Kg de peso corpóreo (9 doses de 100 mg/Kg de peso corpóreo) para cada camundongo.



## Capítulo 6 – Conclusões

A qualidade da água verificada através de variações dos parâmetros físicos e químicos temperatura, pH e condutividade elétrica apresentou-se de forma satisfatória para os corpos d' água analisados.

Na maioria dos tanques de pesque-pague observou-se a ocorrência de cianofíceas, o que pode ser justificado pela maior disponibilidade de nutrientes utilizados pelas microalgas para seu desenvolvimento, como nitrogênio e fósforo, provenientes da ração alimentar dos peixes.

Cinco gêneros de cianófitas (*Phormidium*, *Geitlerinema*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*) foram identificados, e os dois gêneros *Phormidium* e *Microcystis* foram isolados.

O isolamento de todos os gêneros identificados não foi possível, devido à competição com as clorofíceas.

Não ocorreram óbitos em nenhuma dose dos extrato brutos durante o ensaio de toxicidade aguda.

No ensaio de intoxicação crônica, apenas o extrato bruto de *Microcystis* apresentou seis óbitos no total de 10 indivíduos, com média de nove doses do extrato bruto.

## **Capítulo 7 – Considerações Finais**

É necessário que a água utilizada nos pesque-pagues seja tratada antes de abastecer os tanques, evitando o crescimento de cianofíceas nesses ambientes.

No efluente dos pesque-pagues, o tratamento deveria ser ainda maior, pois há uma adição de nutrientes solubilizados, devido à ração para alimentar o pescado.

## Capítulo 8 – Referências Bibliográficas

1. **Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1988. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 3 – Oscillatoriales. *Algological Studies* 50-53: 327-472.
2. **APHA American Public Health Association.** 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19 ed. Washington.
3. **APHA American Public Health Association.** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. Washington Anagnostidis,K., Komárek, J (1988). Modern Approach to the classification system of cyanophytes, 3 — *oscillatoriales*. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 53:327-472.
4. **Azevedo, S.M.F.O.; Evans, W.A.; Carmichael, W.W.& Namikoshi, M** (1994).First report f micricystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 6: 261-265.
5. **Azevedo, S.M.F.O.** (1996). Toxic cyan bactéria and the Caruaru tragedy. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia.
6. **Barbosa, F.A.R., Bicudo, C.E.M. & Huszar, V.L.M.** 1995. Phytoplankton studies in Brazil: community structure variation and diversity. *In: Tundisi, J.G., Bicudo, C.E.M. & Tundisi, T. M.* (eds.) *Limnology in Brazil*, p. 19-36.
7. **Barbosa, J.M.** 2007. Avaliação da presença de microcistinas no reservatório do Funil e nas diferentes etapas de tratamento de água na Estação de Tratamento de Água do Guandu. *Novo Enfoque* (Revista Eletrônica Universidade Castelo Branco), 5(5): 12 p.
8. **Best, J.H. et al.** 2003. Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquatic Toxicology*,64: 419-426.
9. **Bittencourt-Oliveira, M.C. & Molica, R.** 2003. Cianofíceia Invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 30: 82-90.
10. **Blaha, L.** 2004. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Vet. Brno*, 73: 477–482.

11. **Briand, J.-F. et al.** 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems (Review article). *Veterinary Research*, 34: 361-377.
12. **Bury, N.R. et al.** 1996. The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca<sup>2+</sup> transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in tilapia gills. *The Journal of Experimental Biology*, 199: 1319–1326.
13. **Bury, N.R. et al.** 1998. Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *The Journal of Experimental Biology* 201: 81–89.
14. **Bicudo, C.E.M., Bicudo, D.C. & Giani, A.** 1996. Towards assaying biodiversity in freshwater algae. In: C.E.M. Bicudo & N.A. Menezes (eds) *Biodiversity in Brazil: a first approach*, CNPq, 326p.
15. **Bicudo, C.E.M. & Menezes, M.** 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. 2 ed. Rima, São Carlos. 502 p.
16. **Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 518/2004** – Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Março de 2004.
17. **Carmichael, W.W.** (1994). The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270 (1): 78-86.
18. **Carmichael, W.W. et al.** 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.*, 109:663-668.
19. **Christiansen, G. et al.** 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology*, 185: 564–572.
20. **Chorus, I. & Bartram, J.,** 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. E&FN Spon-WHO, London. 486 pp.
21. **Costa, I. A. S. et al.** 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology*, 66(1B): 211-219.
22. **Cunha, N. T. et al.** 2003. Registro de toxinas paralisantes produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* na região sul do Brasil. In: *Anais do 2º Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental*. Itajaí, SC.

23. **Cetesb - Nt: L5. 017** (1992). Avaliação Estatística de Resultados de Testes de Toxicidade Aguda – Método de ensaio, São Paulo.
24. **Cetesb - Nt: L5. 025** (1993). Teste para avaliação da toxicidade aguda de Cianofícias (algas azuis) – Método de ensaio, São Paulo.
25. **Falconer, I.R.** (1991). Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177- 184.
26. **Falconer, I.R.** (1994). Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In: Toxic Cyanobacteria current status of research and management. Eds. Steffensen, D.A. & Nicholson, B.C. Proceedings of an International Workshop. Adelaide. Australia.
27. **FUNASA.** 2003. *Cianofíceas tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Brasília. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde. 56 p.
28. **Haider, S. et al.** 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern – Review. *Chemosphere*, 52:1-21.
29. **Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M.** 1995. Algae. An introduction to phycology. Cambridge University Press, Cambridge. 627p.
30. **Jewel, M.A.S. et al.** 2003. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan J. Biological Sciences*, 6(12): 1046-1050.
31. **Leflaive, J. & Ten-Hage, L.** 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins: special review. *Freshwater Biology*, 52: 199–214.
32. **Lorenzi, A.S.** 2004. Abordagens moleculares para detectar cianofíceas e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas Represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Dissertação Mestrado*, Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba. 92 p.,
33. **Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, pp. 1-759.

34. **Komárek, J. & Kling, H.** 1991. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Archives of Hydrobiology / Algological Studies* 61: 21-45.
35. **Kubtiza, F.** Qualidade da água na produção de peixes. 3 ed. Rev. Jundiaí: CIP – USP, 1999.
36. **Leal, A.C. & Soares, M.C.P.** 2004. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37 (Suplemento 1I): 84-89.
37. **Magrin, A. G. E., Senna, P. A. C., Komárek, J.** *Arthrospira skujae*, a new planktic tropical Cyanoprokaryote. *Archiv für Protistenkunde*, Jena, v. 148, p. 479-489, 1997.
38. **Margalef, R.** 1983. *Limnologia*. Omega, Barcelona, pp. 1-1010.
39. **Mota, S.** (1995); *Preservação e Conservação de Recursos Hídricos*; 2º ed; editora ABES.
40. **Roset, J. et al.** 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas: una revisión. *Rev. Toxicol.*, 18: 65-
41. **Saker, M.L. & Eaglesham, G.K.** 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, 37(7):1065-1077.
42. **Sant'Anna, C. L. et. al.** 2006. *Manual ilustrado para identificação e contagem de cianofíceas planctônicas de águas continentais brasileiras*. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. 58 p.
43. **Sant'Anna, C.L. et al.** 2006. *Manual ilustrado de identificação e contagem de cianofíceas planctônicas de águas continentais brasileiras*. Rio de Janeiro. Interciência. 58 p.
44. **Sant'Anna, C.L.** 1996. Cyanophyceae / Cyanobacteria diversity in Brazil. *In*: C.E.M. Bicudo & N.A. Menezes (ed.). *Biodiversity in Brazil: a first approach*. Brasil, CNPq.
45. **Sant'Anna, C.L. & Azevedo, M.T.P.** 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71: 359-385.

46. **Sant'anna, C.L.; Azevedo M.T.P.; Agujaro L.F.; Carvalho, M.C.; Carvalho, L.R.; Souza R.C.R.** (2006); Identificação e Contagem de Cianofíceas Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras; editora Interciência.
47. **Sant'Anna, C.L., Branco, L.H.Z. & Azevedo, M.T.P.** 2006. Cyanophyceae / Cyanobacteria. *In:* C.E.M. Bicudo & M. Menezes (orgs.) Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil 2 ed. Rima, pp. 19-84.
48. **Soares, R.M. et al.** 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 70: 1-10.
49. **Teixeira, M.G.L.C.; Costa, M.C.N.; Carvalho, V.L.P.; Pereira, M.S. & Hage, E.** (1993). Gastroenteritis epidemic in the área of Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of Paho*, 27(3):244-253.
50. **Tsukamoto, R. Y., Takahashi, N. S.** Panorama da Aquicultura. *Cianofíceas + civilização = problemas para a saúde, a aquicultura e a natureza.*, 2007.
51. **van Apeldoorn, M.E. et al.** 2007. Toxins of cyanobacteria (Review). *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 7 – 60.
52. **Wetzel, R. G.** 1983. Limnology: lake and river ecosystems. 3 ed. Academic Press, 1006.
53. **Zagatto, P.A.; Bertoletti. E.** (2006); Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações; editora Rima.
54. **Zurawell, R.W. et al.** 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health*, 8: 1–37.

## ANEXO

### Anexo 1

#### Meio de Cultura para Cianofíceas (BG-11)

#### **COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUES DO MEIO BG-11 LÍQUIDO ALLEN STANIER, 1968, MODIFICADO POR PONTES, 1988)**

COMPONENTES	gL <sup>-1</sup> na solução estoque	SOLUÇÃO ESTOQUE PARA 1 L
<b>1</b> – Na <sub>2</sub> Mg EDTA	0,1	
Citrato férrico de amônia	0,6	10 mL
Ácido cítrico . H <sub>2</sub> O	0,6	
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	3,6	
<b>2</b> - MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	7,5	10 mL
<b>3</b> – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3 H <sub>2</sub> O	4,0	10 mL
<b>4</b> – Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	0,02 g
<b>5 – Solução de micronutrientes</b>		1 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1,81	
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,222	
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,079	
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,050	
NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O ou MoO <sub>3</sub> (85%)	0,018	
<b>6</b> – NaNO <sub>3</sub> (somente para BG-11 suplementado com N)	-	1,5 g

Os componentes devem ser adicionados na ordem listada, e o volume completado com água destilada. pH ajustado para 7,5 com HCl 1N. O meio de cultura deve ser autoclavado a temperatura de 121° C.



## Anexo 2

### MEIO DE CULTURA PARA CIANOFÍCEAS (ASM-1)

#### SOLUÇÃO-ESTOQUE A

- $\text{NaNO}_3$  .....1,7 g
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,49 g
  - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....0,41 g
  - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0,29 g
- 200mL de água deionizada

#### SOLUÇÃO-ESTOQUE B

- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  .....0,87 g
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  .....0,7060 g
- 100mL de água deionizada

#### SOLUÇÃO-ESTOQUE C

- $\text{H}_3\text{BO}_3$  .....2,48 g
  - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  .....1,39 g
  - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ..... 1,08 g
  - $\text{ZnCl}_2$  ..... 0,335 g
  - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,019 g
  - $\text{CuCl}_2$  ..... 0,0011 g
- 100mL de água deionizada

#### SOLUÇÃO-ESTOQUE D

- $\text{EDTA Na}_2$  .....1,86 g
- 100mL de água deionizada

#### PARA PREPARAR 1 L DE MEIO:

- 20 mL da solução A
- 2,0 mL da solução B
- 0,1 mL da solução C
- 0,4 mL da solução D

Os componentes devem ser adicionados na ordem listada, e o volume completado com água destilada. O pH ajustado entre 7 e 8. O meio de cultura deve ser autoclavado à temperatura de 121° C.