



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

Tanare Cambraia Ribeiro Ferreira

MACRÓFITAS AQUÁTICAS NA REMOÇÃO DE MICROCISTINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: “Mestre em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Saneamento Ambiental”

Orientador: Prof. Dr^a Vera Lúcia de Miranda Guarda

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio Jardim

Ouro Preto, MG

2009

Dedicatória

Ao Mestre da vida,

Ao Mestre da sabedoria,

Ao Mestre dos mestres.

A minha capacidade vem do **Senhor**, por isso,
toda honra, toda glória, toda gratidão seja
dada.....somente a **Ele!**

Agradecimentos

Agradeço à Santíssima Trindade e Nossa Senhora, pelo discernimento, proteção em tudo que fiz e pelas decisões tomadas.

À minha família, por sempre apoiar as minhas decisões e ser inspiração em meus momentos de fragilidade.

Ao Dr. Stephan Pflugmacher pelas valiosas opiniões que tanto contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

À minha orientadora Dr^a Vera Lúcia Guarda de Miranda pela confiança em meu trabalho.

À COPASA, em especial ao Dr. Fernando Antônio Jardim, por ter me acolhido e me apoiado na realização deste projeto.

À aluna de iniciação científica Ana Cláudia Chagas de Paula, pela dedicação e responsabilidade empregada neste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À Dr^a Eunice por disponibilizar a CLAE para a realização de nossas análises.

A todos que de maneira indiscriminada estiveram presentes neste projeto, transformando-o em realidade. Abro exceção ao agradecer a amiga Tália Carvalho de Freitas, que através de uma verdadeira parceria esteve ao meu lado em todas as lutas que foram necessárias para a finalização de nossos projetos de mestrado. União, perseverança e muita fé fizeram com que chegássemos ao final.

Vale citar esta frase de Martin Luther king que resume o sentimento final desta trajetória:

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.”

Sumário

1-	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo geral:	3
2.2	Objetivos específicos:	3
3	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Eutrofização.....	4
3.2	Aumento da temperatura global	5
3.3	Cianobactérias:.....	7
3.3.1	Características gerais das Cianobactérias.....	7
3.3.2	Cianotoxinas	10
3.3.3	Intoxicações por cianotoxinas	12
3.3.4	Ocorrência de florações no Brasil	14
3.3.5	Degradação das microcistinas	20
3.3.6	Legislação	20
3.4	Macrófitas aquáticas	21
3.4.1	Família Lemnaceae	22
3.4.2	Características da <i>Spirodela intermedia</i>	23
3.4.3	Tratamento de água utilizando macrófitas aquáticas flutuantes.....	25
3.4.4	Utilização da biomassa produzida.....	27
3.4.5	Metabolização de cianotoxinas pelas macrófitas	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Materiais e Reagentes:	29
4.2	Metodologia.....	31
4.2.1	Cultivo e avaliação do crescimento da <i>Spirodela intermedia</i>	31
4.2.2	Obtenção da toxina	33
4.2.3	Remoção da MC-RR pela macrófita <i>Spirodela intermedia</i>	41
4.2.4	Preparo das amostras para as análises na CLAE.....	42
4.2.5	Análise no Espectrômetro de Massas (LC-MSMS)	42

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Avaliação da toxicidade da espécie de cianobactéria encontrada na lagoa do Gambá em junho de 2007.....	45
5.1.1	Análise por ELISA.....	46
5.1.2	Bioensaio em camundongos.....	46
5.1.3	Análise na CLAE	47
5.2	Avaliação do crescimento da cepa HBRF01 monoespecífica de <i>M. protocystis</i>	48
5.3	Obtenção da toxina através da cultura da cepa HBRF01 monoespecífica de <i>M. protocystis</i>	50
5.4	Avaliação do Crescimento da <i>Spirodela intermedia</i>	51
5.5	Remoção da MC-RR pela Macrófita <i>Spirodela intermedia</i>	52
5.5.1	Bioacumulação da MC-RR pela <i>Spirodela intermedia</i>	56
5.5.2	Metabolização da MC-RR pela <i>Spirodela intermedia</i>	58
6	CONCLUSÃO	63
7	PERSPECTIVAS	64
8	REFERÊNCIAS	65

Lista de Figuras

Figura 3-1: Estrutura de uma cianobatéria (Fonte: CALIJURI <i>et al.</i> , 2006).....	8
Figura 3-2: Estrutura química geral e exemplos de microcistinas. (Fonte: MOREIRA, 2007).....	12
Figura 3-3: Floração de cianobactérias no rio das Velhas (MG) durante a estiagem de 2007 (Fonte: JARDIM <i>et al.</i> , 2008).....	15
Figura 3-4: Flor de <i>Spirodela intermedia</i> : (a) estame, (b) estigma (Fonte: POTT & CERVI, 1999).....	23
Figura 3-5: <i>Spirodela intermedia</i> 1. Hábito em relação à superfície da água; 2. Vista dorsal (superior): (a) flor; 3. Vista lateral: (a) coifa, (b) papilas; 4. Flor: (a) perfilo com abertura apical, (b) estigma, (c) ovário, (d) estame de maturação desigual, (e) ráfides; 5. Perfilo da raiz: (a) estípite, (b) raiz primária, (c) raiz secundária (sob perfilo), (d) ráfides; 6. Fronde em vista ventral (inferior): (a) cavidade vegetativa, (b) fruto alado, (c) nervuras; 7. Fruto com 2 sementes; 8. Fruto com 1 semente; 9. Semente: (a) chalaza; 10. Germinação: (a) cotilédone, (b) fronde-mãe; 11. Plântula ainda com a semente: (a) cotilédone, (b) fronde-mãe, (c) fronde-filha. (Fonte: POTT & CERVI, 1999).....	24
Figura 4-1: Cultura de <i>Spirodela intermedia</i> a partir da qual as plantas foram retiradas para a realização do experimento.	31
Figura 4-2: Avaliação do crescimento da <i>Spirodela intermedia</i> realizada em quintuplicata.....	33
Figura 4-3: Localização geográfica da Lagoa do Gambá e da cidade de Ouro Preto (Fonte: BORGES, 2006)	34
Figura 4-4: (A) Vista panorâmica da lagoa; (B) Foto da floração de cianobactérias na Lagoa do Gambá em julho de 2007.	34
Figura 4-5: A: Localização geográfica da represa de Furnas (Fonte: COPASA) B: Vista panorâmica do reservatório de Furnas (Fonte: http://www.minastour.com.br/website/imagens-acesso em: 15/01/2009).....	36

Figura 4-6: Cultivo da cepa HBRF01 monoespecífica de <i>M. protocystis</i> do reservatório de Furnas.....	36
Figura 4-7: Extração, identificação e quantificação da microcistina.	40
Figura 4-8: Esquema da exposição da <i>Spirodela intermedia</i> a duas concentrações de microcistina-RR ($10\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\mu\text{g.L}^{-1}$)	41
Figura 4-9: Exposição da <i>Spirodela intermedia</i> à MC-RR.	41
Figura 4-10: Esquema do preparo das amostras para a leitura na CLAE-DAD e no	43
Figura 5-1: Formas coloniais de <i>Microcystis novacekii</i> encontradas na floração da lagoa do Gambá em julho de 2007. ((A) (aumento 100X, coloração com nanquim); (B) (aumento 200X); (C) (aumento 400X)).	46
Figura 5-2: Curva analítica da microcistina-RR produzida em CLAE-DAD.	47
Figura 5-3: Análise na CLAE da amostra da floração da Lagoa do Gambá. (A) padrão de MC-LR (<i>Microcystis</i> RST 9501); (B) amostra de floração da Lagoa do Gambá.	48
Figura 5-4: Curva de crescimento da cultura da cepa HBRF01 monoespecífica de <i>M. protocystis</i> monitorada pela contagem de células usando a câmara de Sedgwick-Rafter segundo A.P.H.A, (2005).....	49
Figura 5-5: A: <i>M. protocystis</i> isolada da represa de Furnas em Novembro de 2003, 100 x.....	49
Figura 5-6: Identificação de microcistina-RR extraída do cultivo de <i>Microcystis protocystis</i> , por CLAE, absorbância em 240nm. A: Padrão de MC-RR. B: Amostra purificada a partir do cultivo lisado.	50
Figura 5-7: Curva de crescimento da <i>Spirodela intermedia</i> sem a presença da toxina.	51
Figura 5-8: A: Concentração da MC-RR nas amostras do controle ($10\mu\text{g.L}^{-1}$, sem plantas) após 21 dias de experimento. B: Concentração MC-RR remanescente na água \blacksquare e bioacumulada na <i>Spirodela intermedia</i> \blacklozenge após 21 dias de exposição a $10\mu\text{g.L}^{-1}$	52
Figura 5-9: A: Concentração da MC-RR nas amostras do controle ($100\mu\text{g.L}^{-1}$, sem plantas) após 21 dias de experimento. B: Concentração da MC-RR remanescente na água \blacksquare e bioacumulada na <i>Spirodela intermedia</i> \blacklozenge após 21 dias de exposição a $100\mu\text{g.L}^{-1}$	53

Figura 5-10: Determinação da massa dos picos de uma amostra controle de *Spirodela intermedia* (A- não exposta a MC-RR) e dos picos de uma amostra de *Spirodela intermedia* que foi exposta 21 dias a MC-RR (B). (a) m/z 1038,2 corresponde a MC-RR; (b) m/z 1158,6 corresponde a MC-RR-CYS e (c) m/z 1345,3 corresponde a MC-RR-GSH. 60

Figura 5-11: Hipótese dos possíveis caminhos após a absorção da MC-LR pela planta (Adaptado de PFLUGMACHER, 2002). 61

Lista de Tabelas

Tabela 3-1: Principais ordens de cianobactérias, segundo RIPPKA (1979) (Fonte: CALIJURI <i>et al</i> , 2006)	9
Tabela 3-2: Ocorrências de florações registradas na literatura no território brasileiro nos últimos 31 anos.....	17
Continuação... Tabela 3-2: Ocorrências de florações registradas na literatura no território brasileiro nos últimos 31 anos.	18
Continuação... Tabela 3-2: Ocorrências de florações registradas na literatura no território brasileiro nos últimos 31 anos.	19
Tabela 4-1: Soluções necessárias para o preparo da Solução nutritiva para o crescimento da <i>Spirodela intermedia</i> segundo HOAGLAND <i>et al.</i> , 1950.	32
Tabela 4-2: Soluções necessárias para o preparo do meio ASM-1 segundo GORHAM <i>et al.</i> , 1964.....	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg	microgramas
µm	micrômetros
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
ADDA	ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
Cys	cisteína
DAD	detector de arranjo de diodos
D-Ala	alanina
D-Glu	ácido glutâmico
DL50	dose letal 50%
D-MeAsp	ácido D-eritro-β-metil-aspártico
GSH	glutathiona
GST	glutathiona S-transferase
HPLC	<i>high performace liquid chromatography</i>
<i>m/z</i>	relação massa carga
MC(s)	Microcistina (s)
MC-RR-Cys	conjugado de microcistina-RR com cisteína
MC-RR-GSH	conjugado de microcistina-RR com glutathiona
Mdha	N-metil-deidroalanina

MRPs	<i>multi-drug-resistant-associated proteins</i>
MS	espectrometria de massas
N	nitrogênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	fósforo
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
SPE	extração de fase sólida
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto

Resumo

As cianobactérias são microrganismos que fazem parte do fitoplâncton natural principalmente de água doce. A proliferação excessiva destes organismos (floração) tem sido relacionada à fatores como a eutrofização dos corpos d'água e o aumento da temperatura global. Várias espécies podem produzir toxinas, como as microcistinas, que representam risco potencial à saúde humana e um desafio ao tratamento de água potável. Atualmente, a aplicação de macrófitas aquáticas na estação de tratamento de água tem se mostrado uma alternativa na tentativa de reduzir as concentrações de microcistinas na água bruta. O potencial do uso destas plantas está relacionado à sua capacidade de bioacumular estes contaminantes, uma aplicação do “Green Liver concept”. Este trabalho apresenta uma avaliação do potencial da macrófita aquática *Spirodela intermedia* para a remoção de microcistina-RR de águas contaminadas, em experimentos em escala de bancada. A planta foi exposta a diferentes concentrações ($10\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\mu\text{g.L}^{-1}$) de microcistina-RR durante aproximadamente duas semanas. Os resultados das taxas de microcistina-RR residuais na água e na planta foram determinados por CLAE-DAD. Produtos derivados do metabolismo vegetal, como os conjugados de glutatona e cisteína, puderam ser observados por LC-MSMS. A biomassa de macrófita utilizada foi eficiente para reduzir as concentrações de microcistinas para valores inferiores ao recomendado pela Organização Mundial de Saúde para água potável ($1\mu\text{g.L}^{-1}$). Os resultados obtidos evidenciam o potencial da espécie *Spirodela intermedia* para a remoção de microcistinas de águas contaminadas.

Palavras chave: microcistina-RR; macrófita *Spirodela intermedia*; bioacumulação; água potável; biofiltração.

Abstrat

Cyanobacteria belong to a group of organisms which are common inhabitants of freshwaters. Conditions of ecological imbalance, such as eutrophication of water bodies, and global warming process, have led to a rapid and excessive growth called cyanobacteria blooms. Many species of cyanobacteria produce toxins which can impact on the operation of water supplies and human health. Recently, the use of aquatic macrophytes in water supply facilities has been investigated with respect to the potential on uptake the toxins in order to reduce microcystin concentration in raw water. Their role in cyanotoxin removal has been related to bioaccumulation potential, an application of the ‘Green Liver concept’. This study aims to investigate the use of the aquatic macrophyte *Spirodela intermedia* in order to reduce microcystin-RR from water in small scale laboratory assays. The macrophyte biomass was exposed to different concentrations ($10\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\mu\text{g.L}^{-1}$) of microcystin-RR over a period of two weeks. Levels of residual microcystin-RR concentrations in both water and plant material were determined using HPLC with diode array detector. Plant breakdown products as glutathione conjugate and cysteine conjugate were determined using LC-MSMS. The applied macrophyte biomass was able to reduce microcystin concentrations below to the guidance values adopted by World Health Organization for drinking-water quality ($1\mu\text{g.L}^{-1}$). These results indicate the uptake potential of *Spirodela intermedia* to remove microcystins from contaminated waters.

Keywords: microcystis-RR; macrophytes *Spirodela intermedia*; bioaccumulation; drinking water; biofiltration.

1- Introdução

O uso inadequado dos recursos hídricos, em decorrência do desenvolvimento de atividades agrícolas e industriais, aliado a fatores relativos à urbanização desordenada e ao crescimento populacional, tem provocado de forma abrangente, a poluição de mananciais superficiais. O enriquecimento artificial dos corpos d'água com nitrogênio, fósforo e outros nutrientes em excesso, sob certas condições ambientais de temperatura, incidência de luz e velocidade de ventos, podem conduzir à quebra do equilíbrio biológico do meio aquático e favorecer o aparecimento de florações ou “blooms” de determinadas espécies fitoplanctônicas. As florações são caracterizadas pelo intenso crescimento e concentrações desses microorganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células que pode chegar a vários centímetros de profundidade (CARMICHAEL, 1992).

A presença de florações de organismos fitoplanctônicos e seus subprodutos em rios, lagos e reservatórios destinados ao abastecimento, interfere diretamente na qualidade da água, podendo introduzir efeitos negativos tanto de ordem estética e organoléptica pela produção de odor e sabor, como de saúde pública devido à produção de compostos potencialmente tóxicos e carcinogênicos. As alterações na qualidade da água para abastecimento, devido à presença desses organismos, introduzem dificuldades diversas, podendo comprometer seriamente o funcionamento das estações de tratamento de água ou sistemas de abastecimento, se estes não estiverem preparados para inativá-las ou removê-las.

A situação torna-se mais crítica para os sistemas de tratamento que utilizam águas provenientes de lagos ou reservatórios, pois, apesar de proporcionarem, aparentemente, maior controle das características dos afluentes, apresentam, especificamente, no caso do Brasil, condições ambientais favoráveis para o crescimento intenso de determinadas espécies de cianobactérias durante grande parte do ano.

A ocorrência de florações de cianobactérias tem se tornado mais intensa no Brasil exigindo uma preocupação com a saúde pública, uma vez que as cianobactérias podem liberar toxinas, que são um risco em potencial aos animais e homens que possam ingerir ou entrar em contato com as mesmas, promovendo doenças neurológicas, hepáticas e dermatológicas.

A saúde humana pode ser afetada pelas cianotoxinas através da ingestão de água, por contato em atividades de recreação ou pelo consumo de pescado contaminado. As causas da produção dessas toxinas não estão bem esclarecidas, mas acredita-se que estas têm função protetora contra herbivoria (CARMICHAEL, 1992). Esta inibição à predação também contribui para a dominância das cianobactérias.

As cianotoxinas formam um grupo de substâncias químicas bastante diverso, com mecanismos tóxicos específicos em vertebrados. Algumas são neurotoxinas bastante potentes, outras são principalmente tóxicas ao fígado (hepatotoxinas) e existem as que podem ser irritantes ao contato (endotoxinas pirogênicas).

No Brasil, a grande maioria das estações de tratamento possui as etapas de coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção conhecidas como ciclo completo ou convencional. Segundo SVRCEK & SMITH (2004), esse tratamento não é eficiente para remover cianotoxinas, podendo resultar em um agravamento do risco à saúde em função da ação do coagulante químico sobre a célula, que pode provocar lise celular, e, portanto, a liberação de toxinas. Aliado a isso, fatores relacionados a problemas operacionais, como escolha inadequada de tecnologia, falta de mão-de-obra especializada e de recursos financeiros, entre outros, acarretam sérios prejuízos à qualidade da água produzida, tornando indispensável o desenvolvimento e domínio de tecnologias alternativas de tratamento, ou de suas combinações, adequadas às condições técnicas, sociais, políticas e econômicas locais.

Seguindo esse princípio, o grande desafio é encontrar sistemas de tratamento de água que sejam operacionalmente exequíveis a custos viáveis para remoção de células e toxinas. Com este propósito, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade de remoção de microcistina-RR solúvel pela macrófita flutuante *Spirodela intermedia* para utilização dessa em fitodepuração de cianotoxinas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

O trabalho em questão objetivou avaliar a utilização da macrófita aquática *Spirodela intermedia* na eliminação de cianotoxinas, via bioacumulação em uma fase preliminar ao tratamento convencional de águas contaminadas.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a toxicidade da floração encontrada na lagoa do Gambá, em junho de 2007;
- Cultivar a cianobactéria *Microcystis protocystis* para a produção de toxina;
- Extrair e purificar a toxina produzida pela *Microcystis protocystis*;
- Cultivar a macrófita *Spirodela intermedia*, para a obtenção de biomassa;
- Avaliar o crescimento da *Spirodela intermedia* durante o experimento;
- Expor a biomassa de *Spirodela intermedia* às concentrações conhecidas da microcistia-RR, em condições de temperatura e luminosidade controladas;
- Avaliar as concentrações de toxina remanescentes na água;
- Identificar, após a absorção da MC-RR, os metabólitos formados pela sua metabolização na *Spirodela intermedia*.

3 Revisão da Literatura

3.1 Eutrofização

A eutrofização é um problema amplamente conhecido pela comunidade científica desde 1940. Porém, atualmente é considerado um problema mundial e crescente que afeta rios, lagos, reservatórios e estuários tanto em regiões temperadas, onde os estudos se iniciaram, como em regiões tropicais, onde as pesquisas estão sendo desenvolvidas mais recentemente (ANDREOLI & CARNEIRO, 2005).

O aumento na assimilação de nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo, inicialmente resulta em um aumento da produtividade do fitoplâncton, com conseqüente mudança em seu padrão sazonal (RODHE, 1969). Nesta condição, a comunidade fitoplanctônica passa a ser dominada por poucas espécies de alguns grupos melhor adaptados. No início do processo, também ocorre um aumento na biomassa de macrófitas submersas, contudo esta biomassa entra em declínio, à medida que a competição por luz com o fitoplâncton se torna o fator controlador desta população, que passa a ser dominada por espécies tolerantes a pouca intensidade luminosa ou espécies flutuantes (XAVIER *et al.*, 2005).

As algas e bactérias são consumidas por herbívoros e detritívoros do plâncton (zooplâncton e peixes) e do sedimento. Devido à maior oferta de alimentos, inicialmente ocorre um aumento na densidade de zooplâncton. Contudo, mudanças na composição de espécies podem ocorrer como conseqüência de diferenças na eficiência das espécies do zooplâncton em utilizar partículas alimentares de diferentes tamanhos, ou resultantes do impacto da seleção pela pressão de predação por parte de peixes, ou ainda pela presença de substâncias que inibam a predação, como por exemplo, cianotoxinas (CHORUS & BARTMAN, 1999).

As alterações nas condições ambientais e um maior aporte de nutrientes podem acelerar o crescimento do fitoplâncton, que, por sua vez, também pode se estabelecer em populações maciças em períodos de tempo relativamente curtos. A esse crescimento, dá-se o nome de “bloom” ou floração. Neste caso, uma ou poucas espécies melhor adaptadas, dominam as demais em quantidade que extrapolam uma ordem de grandeza (CHORUS &

BARTMAN, 1999). Essas florações provocam os seguintes efeitos diretos sobre a qualidade da água: aumenta a matéria orgânica particulada e as substâncias orgânicas dissolvidas que podem conferir gosto e odor à água e que podem ser precursoras da formação de compostos organo-clorados; confere cor à água; serve de substrato para o crescimento de bactérias; aumenta o pH e suas flutuações diárias; reduz o teor de oxigênio nas camadas do fundo (DI BERNARDO, 1995). Além disso, uma acumulação de fitoplâncton morto no fundo de águas eutrofizadas pode levar a altas taxas de decomposição por bactérias. O consumo de oxigênio dissolvido por decompositores, combinado com uma barreira para a troca gasosa, denominada termoclina, pode reduzir (hipoxia) ou eliminar (anoxia) oxigênio dissolvido no fundo das águas. A termoclina é a junção entre uma camada superior quente, menos densa de água (o epilimnio) e uma camada de água fria (o hipolimnio). Quando esta estratificação está em vigor, o oxigênio, geralmente rico em águas do epilimnio, não se difunde nas águas do hipolimnio. A depressão de oxigênio é um dos mais nocivos efeitos colaterais da eutrofização, pois pode causar catastrófica mortalidade de peixes, devastadora da pesca local.

3.2 Aumento da temperatura global

Evidências consideráveis indicam que a Terra e os oceanos tiveram um significativo aquecimento ao longo das últimas quatro décadas, sugerindo um longo período de mudanças climáticas. Aumento de temperaturas e mudanças no padrão de precipitações atmosféricas têm sido documentados. Cianobactérias têm uma longa história de evolução, com a sua primeira ocorrência datada em pelo menos 3,5 milhões de anos atrás. Elas se desenvolveram sob condições extremas e são adaptadas a estresses ambientais incluindo exposição à UV, alta radiação solar, altas temperaturas e flutuações na disponibilidade nutricional. Essas condições ambientais favorecem a dominância de cianobactérias em muitos ambientes aquáticos, de água doce a ecossistemas marinhos (PAUL, 2008).

A resposta das cianobactérias às mudanças ambientais, associadas às mudanças climáticas mundiais é reportada por alguns autores. Essas, geralmente, preferem águas com temperaturas quentes e ambientes com alta luminosidade (PAERL & HUISMAN, 2008; ROBERTS & ZOHARY, 1987; PAERL *et al.*, 1985). Em um estudo designado em

entender o comportamento invasivo de uma floração tóxica formada por *Cylindrospermopsis raciborskii*, BRIAND *et al.*, (2004) examinaram o crescimento dessa cianobactéria sob 10 diferentes intensidades de luz e temperaturas. Em todas as 10 variações, houve crescimento em uma larga escala de temperatura e intensidade luminosa, sugerindo que a invasão do *C. raciborskii* em ecossistemas de água doce, resulta da habilidade de tolerar variações nas condições ambientais (BRIAND *et al.*, 2004).

Uma floração de *Trichodesmium erythraeum* ocorreu no Arquipélago das Ilhas Canárias durante agosto de 2004, o mais quente período registrado nesta área desde 1912 (27,5°C) (RAMOS *et al.*, 2005). Florescimentos de *T. erythraeum* ainda não tinham sido registradas naquela área.

Luz e temperatura influenciam nas taxas de crescimento, assim como na produção de toxinas em muitas espécies de cianobactérias (RAPALA *et al.*, 1997; SIVONEM, 1990). Vários estudos têm mostrado que a produção de toxina pela *Microcystis aeruginosa* aumenta sob condições de alta irradiação de luz (WEIDNER *et al.*, 2003; UTKILEN & GJOLME, 1992; WATANABE & OISHI, 1985). A composição de microcistinas produzidas pela *Planktothrix agardhii* mudou para uma maior proporção de variantes mais tóxicas com o aumento da intensidade luminosa (TONK *et al.*, 2005). A temperatura é também um importante fator que atua no crescimento e na acumulação de metabólitos secundários nas cianobactérias (RAPALA *et al.*, 1997; LEHTIMAKI *et al.*, 1994; SIVONEM, 1990; WATANABE & OISHI, 1985). Estudos que buscam desvendar a genética da biossíntese de cianotoxinas têm aumentado consideravelmente. Esses procuram entender como a luz, a temperatura e outros fatores ambientais podem influenciar na manifestação de genes que atuam na produção de cianotoxinas (KAEBERNICK & NEILAN, 2001; KAEBERNICK *et al.*, 2000).

Inquéritos sobre a história evolutiva das cianobactérias, estudos sobre a sua ecofisiologia, e recentes investigações na dinâmica do fitoplâncton em resposta a mudanças climáticas mundiais, sugerem que o crescimento das cianobactérias é provável em condições ambientais associadas ao aquecimento global (PAUL, 2008).

3.3 Cianobactérias:

A existência das cianobactérias é estimada a 3,5 bilhões de anos atrás, quando essas começaram a adicionar oxigênio na existente atmosfera anaerobiótica, promovendo mudanças químicas no planeta, que proporcionou o desenvolvimento de novas formas de vida. Esses onipresentes micróbios foram capazes de tolerar hipersalinidade, condições hipertérmicas e alta radiação ultravioleta, durante longos períodos (YOO *et al.*, 1995). Recentemente, cianobactérias têm respondido a alterações humanas no ambiente aquático, mais particularmente um aumento na produção de nutrientes primários, ou eutrofização.

3.3.1 Características gerais das Cianobactérias

As cianobactérias são organismos fotoautótrofos procariontes de organização celular simples, geralmente unicelulares isolados ou formando colônias envolvidas por mucilagem, e filamentos. Elas possuem clorofila-a e vários pigmentos acessórios, cujos principais são as ficobiliproteínas. O produto de reserva é a cianoficina, também ocorrendo lipídeos. A parede celular das cianobactérias é composta por várias substâncias, entre elas a mureína (peptidoglicana), lipopolissacarídeos e alguns aminoácidos e glucosaminas de estrutura idêntica às de bactérias gram-negativas. Isso evidencia bem a afinidade evolutiva entre as cianobactérias e as bactérias. Não há celulose. (CALIJURI *et al.*, 2006).

As células das cianobactérias (Figura 3-1) não apresentam núcleo delimitado por carioteca; o material nuclear, o ácido desoxirribonucléico (DNA), localiza-se no centro do protoplasma, em região denominada nucleoplasma. Não possuem organelas celulares, como complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias e vacúolos, características essas comuns às bactérias. O tamanho das células varia desde típico tamanho de bactérias, entre 0,5 e 1µm (*Synechocistis* sp.), até células grandes, com cerca de 40µm (*Oscillatoria princeps*) (CALIJURI *et al.*, 2006).

Esses organismos reproduzem-se assexuadamente, através de divisões da célula ou formação de esporos e células de resistência. Algumas também podem atuar secundariamente na reprodução, pois podem formar novos indivíduos ou resistir a

condições ambientais desfavoráveis, germinando posteriormente, como é o caso de heterócito e acinetos. O heterócito é uma célula de parede espessada, conteúdo claro, e responsável pela assimilação do nitrogênio gasoso (N_2) e sua conversão em formas iônicas assimiláveis pelas outras células vegetativas. O acineto armazena substâncias de reserva, apresentando conteúdo escuro e, freqüentemente ornamentações na parede espessa (STEWART, 1973).

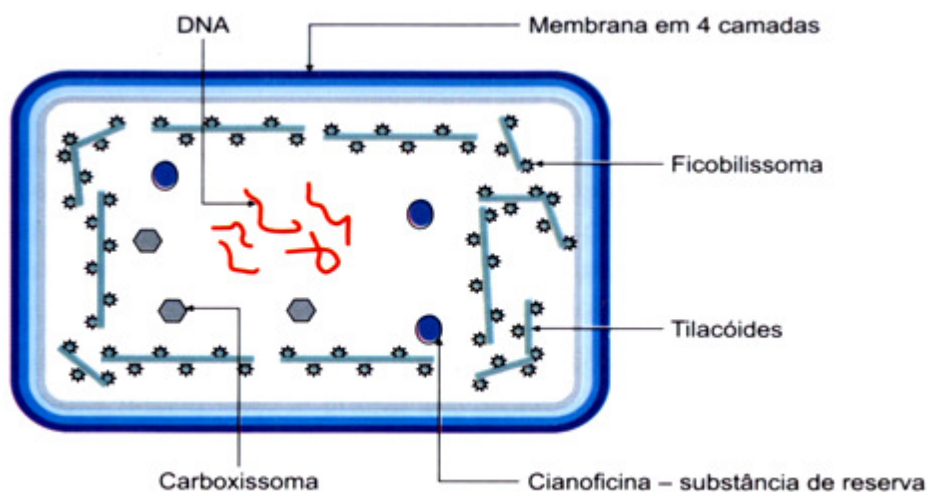


Figura 3- 1: Estrutura de uma cianobactéria (Fonte: CALIJURI *et al.*, 2006).

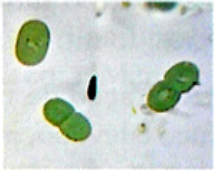
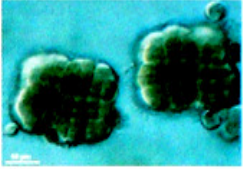

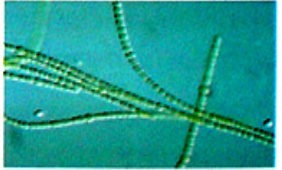

A taxonomia do grupo (Tabela 3-1, realizada segundo KOMAREK & ANAGNOSTIDIS, 1998) está fundamentada na organização da célula, nas medidas das células vegetativas e reprodutivas, presença e espessura da bainha de mucilagem, número, localização e espaçamento dos acinetos e heterócitos, presença de vesícula de gás e grânulos de polifosfatos, entre outras (CHORUS & BARTRAM, 1999). Mais recentemente os padrões de divisão celular (orientação do eixo de divisão celular) e morfologia ultraestrutural das lamelas têm sido utilizados para a identificação das espécies.

A ecologia do grupo é bastante diversificada em virtude das estratégias adaptativas que as cianobactérias apresentam. Essas explicam seu sucesso em responder rapidamente à eutrofização de reservatórios e lagos naturais, tornando-se dominantes na comunidade fitoplanctônica (CARMICHAEL, 1992).

Algumas espécies de cianobactérias são capazes de assimilar compostos orgânicos de baixo peso molecular, e podem subsistir inteiramente deles na ausência de luz. Esta forma de aproveitamento é extremamente vantajosa em ambientes com elevada turbidez e

baixa penetração de raios luminosos, limitando a fotossíntese, ou em águas com zona afótica (zona não iluminada pela luz) extensa na qual uma estratégia heterotrófica seria conveniente para manter o metabolismo celular e a viabilidade das células para um próximo evento de crescimento intensivo. Além disso, a utilização dos compostos orgânicos através da respiração aeróbica gera áreas anóxicas ao redor do heterócito, impedindo a inativação da nitrogenase durante a fixação do nitrogênio gasoso pelo heterócito (CHORUS & BARTRAM, 1999; REYNOLDS, 1984).

Tabela 3- 1: Principais ordens de cianobactérias, segundo RIPPKA (1979) (Fonte: CALIJURI *et al*, 2006)

Grupo	Característica	Exemplos	
I	Unicelular, com células cilíndricas ou ovóides ou esféricas. Reprodução por fissão binária	<i>Synechococcus</i> sp. <i>Gloeotheca</i> sp. <i>Gloeobacter</i> sp. <i>Synechocystis</i> sp. <i>Gloeocapsa</i> sp. <i>Microcystis</i> sp.	 <i>Synechococcus</i> sp.
II	Unicelular que se multiplica por fissão múltipla	<i>Dermocarpa</i> sp. <i>Xenococcus</i> sp. <i>Dermocarpella</i> sp. <i>Myxosarcina</i> sp. <i>Chroococidiopsis</i> sp.	 <i>Chroococidiopsis</i> sp.
III	Filamentosa, sem a formação de heterocistos e um só plano de divisão	<i>Spirulina</i> sp. <i>Oscillatoria</i> sp. LPP Group (<i>Lyngbya</i> / <i>Phormidium</i> / <i>Plectonema</i>) <i>Pseudoanabaena</i> sp.	 <i>Oscillatoria</i> sp.
IV	Filamentosa com heterocistos e com só um plano de divisão	<i>Anabaena</i> sp. <i>Nodularia</i> sp. <i>Cylindrospermum</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Scytonema kalothrix</i> sp.	 <i>Anabaena</i> sp.
V	Filamentosa com heterocistos e com mais de um plano de divisão	<i>Chlorogloeopsis</i> sp. <i>Fischerella</i> sp. <i>Stigonema</i> sp.	 <i>Fischerella</i> sp.

Muitas cianobactérias produzem quelantes (hidroxamatos) eficientes em seqüestrar metais traço da água presentes em baixíssimas concentrações, desta forma, garantindo o funcionamento normal das células (CHORUS & BARTRAM, 1999).

A produção de vesículas gasosas (aerótopos) é uma importante adaptação para viabilizar a suspensão das células na água (WALSBY, 1987). Elas ocorrem em tricomas (*Anabaena*) e em colônias (*Microcystis*), e lhes permite posicionar-se nas zonas mais superficiais da coluna de água, otimizando a fotossíntese, ao mesmo tempo em que podem causar efeito de “sombreamento” de outras espécies localizadas mais abaixo e, portanto, recebendo menor intensidade luminosa para a fotossíntese. Além disso, o posicionamento próximo à superfície da água permite-lhes aumentar a assimilação de nitrogênio gasoso, uma vez que este elemento ocorre em maiores concentrações na superfície, a partir de difusão com a atmosfera. Simultaneamente, como apresentam elevada eficiência fotossintética mesmo quando submetida à intensidade luminosa extensiva (para outras algas), várias espécies mantêm ou aumentam seu crescimento ao mesmo tempo em que a comunidade fitoplanctônica apresenta fotossíntese inibida pelo excesso de luz (CHORUS & BARTMAN, 1999).

A produção de bainhas ou matriz de mucilagem espessada ao redor da parede celular dificulta a manipulação e ingestão das células pelos organismos do zooplâncton, tais como a Dáfnia, diminuindo significativamente as taxas de herbivoria (CARMICHAEL, 1992).

3.3.2 Cianotoxinas

As cianotoxinas são consideradas produtos do metabolismo secundário das cianobactérias e podem causar efeito deletério em tecidos, células ou organismos. Sua função na natureza não é clara, existe uma hipótese de que seriam produzidas com função biológica de defesa, já que elas inibiriam a predação das cianobactérias pelos zooplâncton. As cianotoxinas podem permanecer no interior das células ou serem liberadas para o meio (CARMICHAEL, 1992).

Seus mecanismos de ação são diversos, podendo ser hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas, promotoras de inibição da síntese de proteínas ou produtoras de alteração no sistema imune (KUJBIDA *et al.*, 2006)

Dentre os gêneros de cianobactérias produtoras de toxinas estão: *Anabaena*, *Planktothrix (Oscillatoria)*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2005)

As microcistinas (MCs) são heptapeptídeos monocíclicos compostos por uma D-alanina (D-Ala) na posição 1, dois L aminoácidos variáveis nas posições 2 e 4, o ácido glutâmico (D-Glu) na posição 6, e três aminoácidos incomuns: um ácido D-eritro- β -metil-aspartico (D-MeAsp) na posição 3, um ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10 fenildeca-4,6-dienóico (ADDA) na posição 5, e uma N-metil-deidroalanina (Mdha) na posição 7 (DAWSON, 1998).

Cerca de 70 tipos de MCs já foram identificados e documentados (CARMICHAEL & LI, 2006). As diferenças encontram-se principalmente nos L-aminoácidos das posições 2 e 4, mas algumas variações menos comuns incluem modificações no ADDA e a desmetilação dos aminoácidos Mdha e D-MeAsp (LAWTON & EDWARDS, 2001). A nomenclatura das MCs é baseada nos aminoácidos variáveis e na ausência de grupos metil (CH₃) nos aminoácidos Mdha e D-MeAsp, como ilustra a figura 3-2. A MC mais comum é a LR, cujos aminoácidos variáveis são a leucina (L) e a arginina (R) (FRANGEZ *et al.*, 2003); além dessa as MC-RR e MC-YR estão entre as mais comuns e amplamente distribuídas (GUPTA *et al.*, 2003).

A liberação de toxinas das células para a água parece ocorrer principalmente durante a senescência, morte e lise celular do que pela excreção contínua, e é aumentada por tratamento químico para a erradicação de cianobactérias, especialmente com o uso de algicidas (sulfato de cobre ou herbicidas orgânicos). Infelizmente as toxinas produzidas por cianobactérias são pouco removidas pelos processos convencionais de tratamento de água como floculação, sedimentação, filtração em areia e cloração, e pelos tratamentos que incluem permanganato de potássio ou cloro, que podem liberar as toxinas das cianobactérias (SVRCEK & SMITH, 2004, DUY *et al.*, 2000).

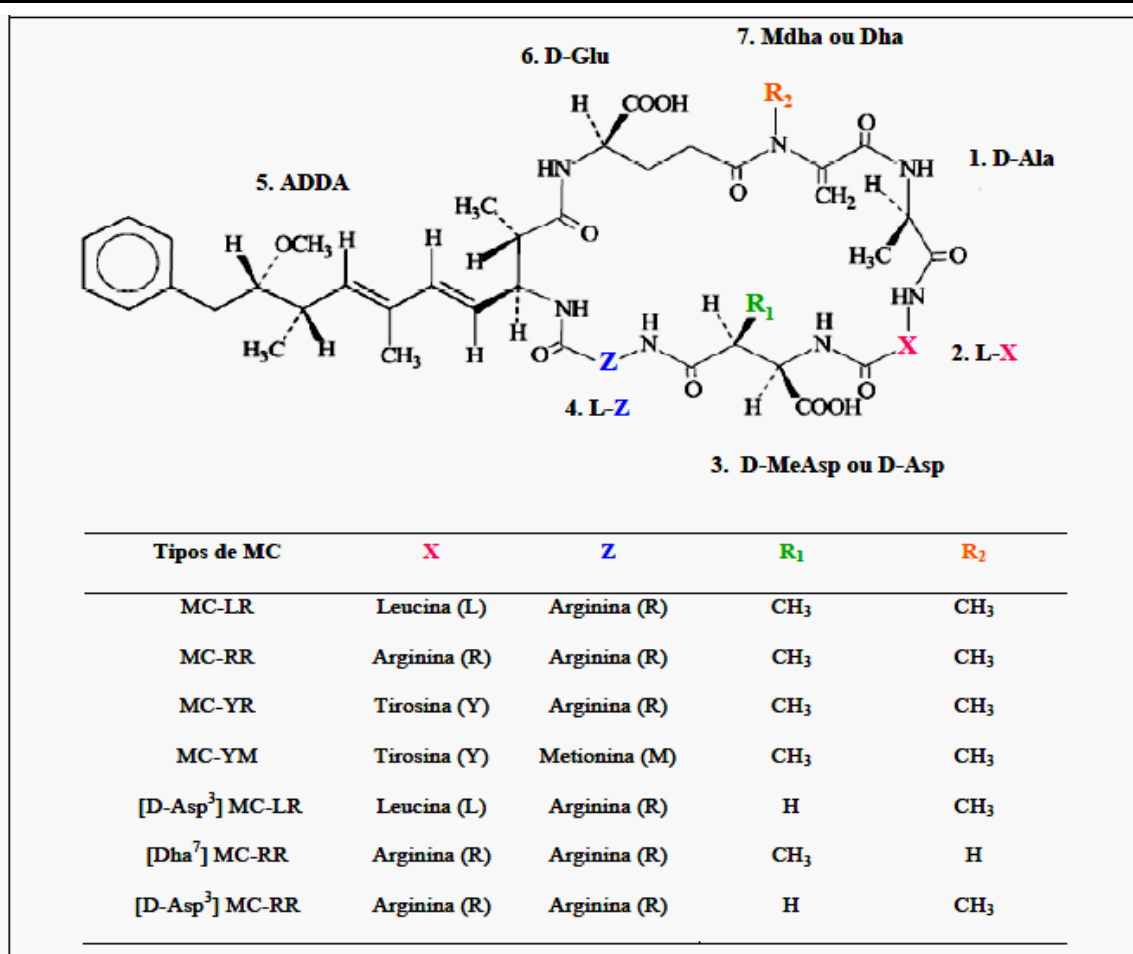


Figura 3- 2: Estrutura química geral e exemplos de microcistinas. (Fonte: MOREIRA, 2007)

3.3.3 Intoxicações por cianotoxinas

As microcistinas (Mcs) já foram causadoras da morte de animais selvagens e domésticos que consumiram água contendo florações densas de cianobactérias (DUY *et al.*, 2000). O primeiro registro de intoxicação de animais por águas contendo cianobactérias ocorreu no lago Alexandrina no Sul da Austrália em 1878. Desde então, têm aparecido cada vez mais relatos de intoxicações de pássaros, peixes e outros animais por cianotoxinas, principalmente por MCs (DAWSON, 1998).

A principal via de exposição às MCs é a oral. Estima-se que 80% da exposição à MC ocorram pela água bebida (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1994). A MC é bastante estável em água e resistente a extremos de pH e temperaturas até 300°C (HARADA, 1996).

A exposição de seres humanos às cianotoxinas está também associada ao acúmulo na cadeia trófica. A bioacumulação de cianotoxinas por animais aquáticos, incluindo peixes, moluscos e zooplâncton já foi demonstrada (AMORIN & VASCONCELOS, 1999), indicando que o consumo de tecidos animais contendo cianotoxinas é possível e pode levar à intoxicação. MAGALHÃES *et al.*, (2003) relataram que estudos realizados em um ecossistema do Rio de Janeiro demonstraram que as hepatotoxinas acumuladas em peixes podem chegar aos consumidores em níveis preocupantes. Além disso, há relatos de pessoas expostas às cianotoxinas através do consumo de certos alimentos que contêm algas (AMORIN & VASCONCELOS, 1999). O consumo de plantas comestíveis (alface, arroz) expostas às microcistinas, via irrigação, pode representar um risco à saúde (CHEN *et al.*, 2004; CODD *et al.*, 1999). Após a ingestão de MC-LR, o estômago absorve alguma quantidade dessa toxina, mas a maior parte é absorvida pelo íleo (ITO *et al.*, 2000); através de sistema orgânico multi-específico de transporte de íons (RUNNEGAR *et al.*, 1991).

As intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (ROSET *et al.*, 2001).

O primeiro caso documentado de morte de seres humanos por hepatotoxinas produzidas por cianobactérias ocorreu após exposição intravenosa em uma clínica de hemodiálise em Caruaru, no estado de Pernambuco, em 1996. Neste episódio, conhecido como “Síndrome de Caruaru”, dos 131 pacientes da clínica de hemodiálise, 116 (89%) apresentaram sintomas de intoxicação pouco tempo após a exposição, sendo estes sintomas predominantemente neurológicos: tontura, vertigem, surdez, distúrbios visuais (dor nos olhos, visão turva, cegueira) e convulsões, além de náuseas e vômitos. Destes, 100 pacientes desenvolveram falência hepática aguda devido à presença de MCs no reservatório (aproximadamente $19\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) que forneceu a água à hemodiálise (AZEVEDO *et al.*, 2002; JOCHINSEN *et al.*, 1998), e em menos de um ano, 52 morreram, demonstrando a toxicidade da MC-LR por via intravenosa. Esse incidente ocorreu porque, após um período de seca na região, esta clínica passou a receber água sem tratamento completo distribuída por caminhões-pipa. Esta água foi obtida do Reservatório Tabocas e tratada com altas doses de cloro, o que levou à lise das células de cianobactérias e à liberação de altas quantidades de microcistinas na água.

MCs são bastante hidrofílicas e, conseqüentemente, não atravessam prontamente membranas celulares e não entram na maioria dos tecidos. Elas utilizam um mecanismo de transporte ativo para penetrar nas células animais: o sistema de transporte multi-específico

de ácidos biliares (ERIKSSON *et al.*, 1990). O fígado é o alvo principal das MCs (MERILUOTO *et al.*, 1990; RUNNEGAR & FALCONER, 1986; FALCONER *et al.*, 1994), já que os hepatócitos possuem o transportador de ácidos biliares e podem capturar a MC ativamente (RUNNEGAR *et al.*, 1991; ERIKSSON *et al.*, 1990). Além disso, FISCHER *et al.*, (2005) demonstraram em seus estudos que a MC-LR atravessa a barreira hematoencefálica de ratos e seres humanos por meio de um polipeptídeo transportador de ânions orgânicos que é encontrado em altas concentrações no cérebro. Portanto, acredita-se que o transporte de MC-LR através da barreira hematoencefálica por esse transportador possa estar ligado aos sintomas neurológicos encontrados em intoxicações por microcistinas (JOCHINSEN *et al.*, 1998).

Os animais e as plantas têm a habilidade de produzir conjugados de MCs para torná-las mais hidrofílicas e menos tóxicas (PFLUGMACHER *et al.*, 2001; METCALF *et al.*, 2000, PFLUGMACHER *et al.*, 1998). Considerando o efeito protetor dos indutores de enzimas, é evidente que o fígado desempenha um papel importante na detoxificação das microcistinas (CHORUS & BARTHAM, 1999). Três produtos metabólicos já foram identificados: conjugados da glutathione e cisteína com a porção M₁ das MCs e um conjugado ainda não identificado formado com o resíduo ADDA (PFLUGMACHER, 2002, KONDO *et al.*, 1996, 1992). Acredita-se que a MC-LR possa ser excretada tanto pelo fígado quanto pelo rim (APELDOORN *et al.*, 2007).

3.3.4 Ocorrência de florações no Brasil

BITTENCOURT-OLIVEIRA (2003) realizou um estudo com amostras de 15 reservatórios de água do Brasil e detectou florações com cepas tóxicas produtoras de MCs em oito deles. Dentre estes reservatórios contaminados destacam-se: o reservatório da Cantareira, que abastece nove milhões de habitantes da região metropolitana de São Paulo (SP); o reservatório de Duas Unas, que abastece 2,6 milhões de habitantes da região metropolitana de Recife (PE); e o reservatório de Irai, que abastece cerca de 2 milhões de habitantes da região metropolitana de Curitiba (PR). Incluem-se também os reservatórios Três Marias (MG), Barra Bonita (SP) e Salto Grande (SP), que são utilizados para a geração de energia, para recreação e para pesca comercial.

De acordo com JARDIM *et. al.*, (2008) constaram-se a ocorrência de florações de cianobactérias na água dos rios das Velhas, São Francisco (Figura 3-3) e Doce que cortam o estado de Minas Gerais. Na ocasião, apesar de não haver nenhum registro de intoxicação em humanos, o consumo de peixes foi vetado, devido ao efeito acumulativo da microcistina.

As análises realizadas pelo laboratório central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA) mostraram que a quantidade de microcistina nas águas dos dois rios reduziu mais de dez vezes, no período de uma semana, retornando a concentrações não alarmantes. A companhia identificou que houve mudança, sem explicação aparente, na espécie de cianobactéria predominante na água dos rios. Embora a nova espécie não apresentasse risco à saúde pública, havia a possibilidade de contaminação.



Figura 3- 3: Floração de cianobactérias no rio das Velhas (MG) durante a estiagem de 2007 (Fonte: JARDIM *et al.*, 2008).

A situação foi mais grave no distrito de Barra do Guacuí, no município de Várzea da Palma, no norte do estado. Segundo JARDIM *et al.*, (2008), a fertilização de rios, lagos e represas causada pelo lançamento de rejeitos orgânicos das atividades antrópicas somada

às elevadas temperaturas ambientais e altas taxas de insolação predominantes no norte do estado de MG, favoreceram as florações do fitoplâncton, inclusive das cianobactérias.

A ocorrência de cianobactérias tem sido dominante em períodos de florações do fitoplâncton, quer em ambientes de reservatórios, lagoas costeiras, rios, lagos de inundação quer em outros lagos naturais. Um levantamento de registros, incluindo florações tóxicas, é apresentado na tabela 3-2, compreendendo os estados do Rio Grande do Sul (RS), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Roraima (RO), Pará (PA), Rio Grande do Norte (RN), Pernambuco (PE) e Bahia (BA), abrangendo um período de trinta e um anos. Os dados incluíram as cianobactérias dominantes e as cianotoxinas, quando identificadas.

Tabela 3- 2: Ocorrências de florações registradas na literatura no território brasileiro nos últimos 31 anos.

Rota de exposição	Ano	Local	Cianobactérias predominantes	Cianotoxinas predominantes	Referências
Reservatório	1977	Santa Maria, RS.	<i>Anabaena</i> sp.	ND	Branco (1978)
Reservatório	1988	Itaparica, BA.	presença	ND	Schulze <i>et al.</i> (2003)
Recreacional	1988	Lagoa das Garças, SP.	<i>Microcystis aeruginosa</i>	MC-LR* e MC-LF*	Azevedo <i>et al.</i> (1994)
Reservatório	1991	Represa Guarapiranga, SP.	<i>Anabaena cf. solitaria</i>	ND	Beyruth <i>et al.</i> (1992)
Hemodiálise	1996	Caruaru, PE.	presença	MC-LR; MC-YR e MC-AR.	Barreto <i>et al.</i> (1996); Azevedo (1998); Jochimsen <i>et al.</i> (1998); Azevedo <i>et al.</i> (2002).
Recreacional	Últimos 24 anos	Lagoa de Patos, RS.	<i>Microcystis aeruginosa</i> ; <i>Anabaena spiroides</i> ; <i>Merismopedia</i> ; <i>Oscillatoria</i> .	MC-LR e MC-FR*	Yunes <i>et al.</i> (1994, 1996, 1998); Mathiensen <i>et al.</i> (1999);
Recreacional	1996-1999	Lagoa de Jacarepaguá, RJ.	<i>Microcystis</i> sp.; <i>Oscillatoria</i> .	microcistinas	Magalhães e Azevedo (1998); Magalhães <i>et al.</i> (2001).
Recreacional	1997	ETA Três Marias, MG.	<i>Microcystis wesenbergii</i>	ND	Jardim <i>et al.</i> (1999)
Lagoa de estabilização de esgotos	1997	ETE Ribeirão das Neves, MG.	<i>Microcystis</i> sp. (<i>M. Aeruginosa</i> , <i>M. panniformis</i> e <i>M. novacekii</i>)	ND	Jardim <i>et al.</i> (1999)
Recreacional	1999	Sepeitiba, RJ.	<i>Synechocystis aquatilis f. aquatilis</i>	microcistinas	Magalhães <i>et al.</i> (2003)

Continuação... Tabela 3- 2: Ocorrências de florações registradas na literatura no território brasileiro nos últimos 31 anos.

Rota de exposição	Ano	Local	Cianobactérias predominantes	Cianotoxinas predominantes	Referências
Reservatório	1999-2000	Belém, PA.	<i>Radiorcystis fernandoi</i> ; <i>Aphanizomenon</i> spp e <i>Planktothrix</i> spp.	MC-LR	Visira <i>et al.</i> (2003, 2005)
Reservatório	2000	Açu, RN.	<i>Microcystis</i> sp. (<i>M. panniformis</i> , <i>M. protocystis</i> , <i>M. novacekii</i>); <i>Aphanizomenon</i> spp; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> .	Microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas	Costa <i>et al.</i> (2006)
Reservatório	2000	ETA Verde Grande, MG.	<i>Microcystis</i> sp. e <i>Radiorcystis</i> sp.	microcistina	Jardim <i>et al.</i> (2001a)
Reservatório	2000-2001	Represa de São Simão, MG/GO.	<i>Microcystis</i> sp; <i>Anabaena circinalis</i> ; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> .	microcistinas	Jardim <i>et al.</i> (2001b)
Reservatório	1999-2002	Medina, Carmo do Rio Claro e Montes Claros, MG.	<i>Microcystis</i> sp. (<i>M. protocystis</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>M. novacekii</i>); <i>Radiorcystis fernandoi</i> ; <i>Aphanizomenon</i> sp.	microcistinas	Jardim e Viana (2003)
Reservatório	2002	Reservatório Tapacurá, PB.	<i>Anabaena spiroides</i> ; <i>Pseudanabaena</i> sp; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ; <i>Microcystis aeruginosa</i> .	saxitoxinas, neosaxitoxinas, dc-saxitoxinas	Molica <i>et al.</i> (2005)
Reservatório	2002-2003	Reservatório de Duas Bocas, ES.	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	ND	Delazari-Barroso <i>et al.</i> (2007)
Reservatório	2002-2006	Pernambuco (PE)	presença	ND	Carvalho <i>et al.</i> (2007)
Reservatório	2004	Billings, SP.	<i>Microcystis</i> sp. (<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. novacekii</i> , <i>M. panniformis</i> , <i>M. protocystis</i>); <i>Planktothrix agardhii</i> ; <i>Radiorcystis fernandoi</i> ; <i>Pseudanabaena mucicola</i> ; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> .	MC-LR, MC-RR e MC-YR.	Anjos <i>et al.</i> (2006)

Continuação... Tabela 3- 2: Ocorrências de florações registradas na literatura no território brasileiro nos últimos 31 anos.

Rota de exposição	Ano	Local	Cianobactérias predominantes	Cianotoxinas predominantes	Referências
Recreacional	2005	Vitória, ES.	<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn	ND	Camarço-Santos & Fernandes (2007)
Reservatório	2005	Reservatório de São Simão, Rio Paranaíba, Brasil central.	<i>Microcystis panniformis</i> ; <i>Anabaena circinalis</i> <i>Anabaena</i> sp. (<i>A. circinalis</i> ; <i>A. crassa</i>); <i>Microcystis</i> sp. (<i>M. aeruginosa</i> ;	ND	Bina & Giani (2007)
Reservatório	2005-2006	Reservatório de Salto Grande, SP.	<i>M. panniformis</i> ; <i>M. protoeystis</i> ; <i>M. wesenbergii</i>); <i>Pseudanabaena mucicola</i> ; <i>Radiorhynchus fernandoi</i> ; <i>Sphaerocavum</i> <i>brasilienses</i>	MC-LR	Agujaro <i>et al.</i> (2007)
Reservatório	2005-2007	Reservatório Samuel, RO.	<i>Microcystis</i> sp.	MC-LR	Nascimento <i>et al.</i> (2007)
Reservatório	2004-2007	Reservatório Vargem das Flores, MG.	<i>Microcystis</i> sp.	ND	Gomes <i>et al.</i> (2007)
Rios	2008	Rios das Velhas, São Francisco e Doce, MG.	<i>Sphaerocavum brasilienses</i> ; <i>M. aeruginosa</i> <i>M. novacekii</i> ; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e <i>Chroococcus</i> <i>dispersus</i> ;	microcistinas	Jardim <i>et al.</i> (2008)

ND, não determinada;*, possível variante

3.3.5 Degradação das microcistinas

Devido a sua estrutura peptídica cíclica as microcistinas são muito estáveis e resistentes a hidrólise química e oxidação, em pH próximo da neutralidade. Além disso, microcistinas e nodularinas mantêm sua toxicidade mesmo após a fervura. Em condições naturais, no escuro, as microcistinas podem persistir por meses ou anos. Em temperatura elevada (40°C) e condições de pH alto ou baixo, foram observadas hidrólises lentas, sendo necessário, aproximadamente, 10 semanas em pH 1 e mais de 12 semanas em pH 9 para a degradação de cerca de 90% da concentração total das microcistinas (HARADA, 1996). Porém, já foi observada uma lenta degradação fotoquímica das microcistinas expostas à luz solar. A taxa desta reação é aumentada pela presença de pigmentos fotossintéticos hidrossolúveis, provavelmente ficobiliproteínas (TSUJI *et al.*, 1993). Na presença desses pigmentos, a degradação fotoquímica de 90% da concentração total das microcistinas pode variar de duas a seis semanas, dependendo da concentração de pigmentos e toxinas. A presença de substâncias húmicas também parece acelerar a degradação das microcistinas sob luz solar.

Embora as microcistinas sejam resistentes a muitas peptidases de eucariontes e bactérias, elas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias encontradas naturalmente em rios e reservatórios. Bactérias capazes de degradar microcistinas já foram isoladas de vários ecossistemas aquáticos e também efluentes de esgotos (AMÉ *et al.*, 2006; CHORUS & BARTHAM, 1999). Este processo pode levar à degradação de 90% do total de microcistinas entre 2 a 10 dias, dependendo principalmente da concentração inicial dessas toxinas e da temperatura da água.

3.3.6 Legislação

A Organização Mundial da Saúde, por meio do adendo da segunda edição do “*Guidelines for Drinking-water Quality*” (WHO, 1998) recomendou o valor limite máximo para microcistina-LR (livre de células) é de $1\mu\text{g.L}^{-1}$, considerando a exposição através da água de consumo humano.

O Brasil, atualmente, possui a mais abrangente legislação federal (BUCH, 2008), a qual inclui padrões obrigatórios de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ para microcistinas, e também recomendações

para saxitoxinas ($3\mu\text{g.L}^{-1}$) e para cilindrospermopsina ($15\mu\text{g.L}^{-1}$) (BRASIL, 2004). Além disso, com relação a normas ambientais, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), por meio da resolução nº 357, de 17 de março de 2005, sobre as condições de balneabilidade, estabelece restrições à recreação de contato primário quando verificada a ocorrência de florações de cianobactérias (CONAMA, 2005).

3.4 Macrófitas aquáticas

A importância das macrófitas aquáticas está amplamente discutida na literatura, sendo sua utilização, como bioindicadoras da qualidade da água em ambientes lóticos e lênticos, uma das mais relevantes (THOMAZ & BINI, 2003). Porém, para seu uso faz-se necessário ter conhecimento prévio das suas características, bem como das condições que limitam sua ocorrência e crescimento; da proliferação e manejo da espécie utilizada.

A diferença nos valores de produtividade e taxas de crescimento de macrófitas aquáticas decorre principalmente da espécie e o tipo ecológico, competição intra e interespecífica e das características abióticas, constituídas de temperatura, radiação, transparência da água, nível da água e velocidade de corrente, tipo de substrato e concentração de nutrientes (CAMARGO *et al.*, 2006).

No Brasil, as macrófitas aquáticas flutuantes mais estudadas são o aguapé (*Eichornia crassipes*), a alface ou repolho da água (*Pistia stratiotes*) e a salvínia (*Salvinia molesta*). Estas espécies são nativas e as mais reportadas, causando problemas de crescimento excessivo em reservatórios (THOMAZ, 2002). Além dessas espécies ainda são comuns a *Eichornia azurea* (aguapé), *Azolla caroliniana* (azola), *Lemna minor* (lentilha da água) e *Spirodela polyrrhiza* (lentilha da água) (KLEIN & AMARAL, 1988).

As macrófitas aquáticas desempenham importante função na manutenção e equilíbrio dos ambientes aquáticos (RODELLA *et al.*, 2006), contribuindo em transformações físicas, químicas e nos processos microbiológicos de remoção dos nutrientes, (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2003), sendo estes também armazenados em forma de vacúolos de reserva (ZANIBONI-FILHO, 1997). Esse processo reduz parcialmente a carga de metabólicos proveniente do cultivo de organismos aquáticos, melhorando substancialmente a qualidade da água (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2002).

3.4.1 Família Lemnaceae

A família Lemnaceae Gray compõe-se das menores Angiospermas conhecidas (COOK, 1990; LANDOLT, 1986, 1981; HILLMAN, 1961). O nome comum no Brasil, quando utilizado ou conhecido, é "lentilha-d'água".

É uma família pequena, com quatro gêneros e 36 espécies (LANDOLT, 1986). A propagação, em geral, é vegetativa e, por isso e pelo reduzido tamanho das plantas, é uma família problemática e de difícil delimitação dos táxons, devendo sua identificação freqüentemente ser auxiliada por dados sobre sua distribuição geográfica (LANDOLT, 1980). Apresenta distribuição sub-cosmopolita, com centro de dispersão tropical e subtropical na América do Sul. No Brasil, a família está representada pelos seus quatro gêneros: *Spirodela*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia*.

LANDOLT (1986) considerou a especialização das Lemnaceae na adaptação ao ambiente aquático, a série de redução do tamanho das plantas e a redução nas peças florais como caracteres derivados. Propôs que o gênero mais primitivo seria *Spirodela*, que ainda possui raízes e o mais evoluído, *Wolffia*, sem raízes. Segundo LANDOLT (1986), as espécies mais primitivas de cada gênero (*Spirodela intermedia*, *Lemna gibba*, *Wolffiella neotropica* e *Wolffia brasiliensis*) encontram-se distribuídas nas regiões mais quentes da América do Sul, provável centro de origem da família.

A família Lemnaceae é bem distribuída no mundo, com exceção de regiões áridas ou muito úmidas, tendo preferência pelas zonas temperadas, subtropicais e tropicais (LANDOLT, 1986). O centro de dispersão é a América do Sul, com centros secundários na América do Norte, Sul da África e Austrália.

As Lemnaceae constituem um elo na cadeia trófica, como alimento para pequenos organismos, peixes e aves, e abrigo de microfauna, e também atuam como despoluidoras (LANDOLT, 1986).

3.4.2 Características da *Spirodela intermedia*

A *Spirodela intermedia* apresenta 3-8 frondes (corpo vegetativo talóide das Lemnaceae) assimétricas, elíptico-circulares, 4 x 2,5-6,7mm e 0,5-1,8mm de espessura, 1-1,3 vezes mais longa que larga; podendo apresentar até 7 frondes unidas em uma planta. Sua epiderme possui estômatos anomocíticos; espaços de ar formados por 3-4 camadas de células no lado ventral da fronde, atingindo quase a borda; apresenta de 9 a 12 nervuras; pigmentos de antocianina no lado ventral e bordos, na planta adulta, viva ou seca. As raízes são fasciculadas, 6-21 por fronde de até 3cm de comprimento, onde 3 a 5 primeiras perfuram o perfilho, o qual desaparece posteriormente. A coifa é pontiaguda (1,0-1,3mm de comprimento) e os traqueídeos são presentes no sistema vascular da raiz. A flor (Figura 3-4) possui 1,5mm de comprimento e está envolta por um perfilho de abertura apical, com rafídeos; o androceu tem 2 estames de tamanhos diferentes, cerca de 0,4mm de comprimento, antera com cerca de 0,25mm de largura; no ovário há 2-5 rudimentos seminiais, estilete curto, estigma circular. Os frutos se caracterizam por apresentar 1,8-2,0 x 1,5-1,9mm e 0,8-1,0mm de espessura, ser levemente alado, possuir de 1 a 3 sementes (cerca de 1,5 x 0,75mm e 0,75mm de espessura, 15-22 estrias longitudinais) (POTT & CERVI, 1999). As características descritas acima estão ilustradas na figura 3-5.

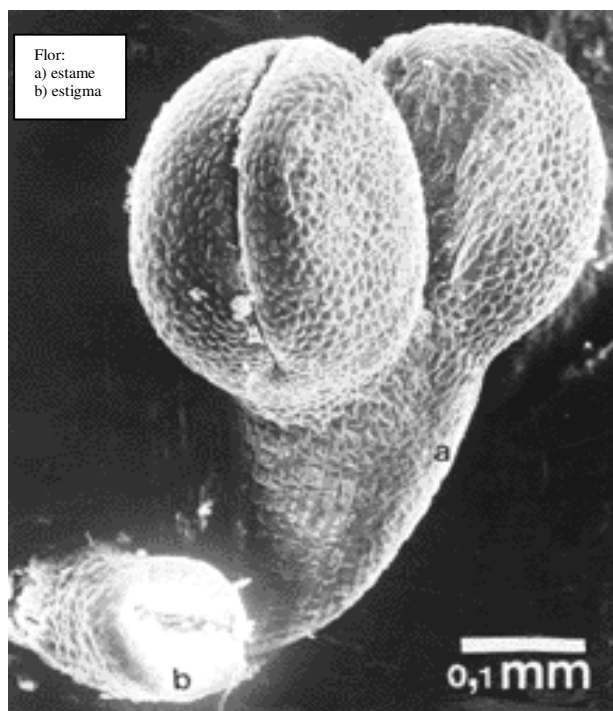


Figura 3- 4: Flor de *Spirodela intermedia*: (a) estame, (b) estigma (Fonte: POTT & CERVI, 1999)

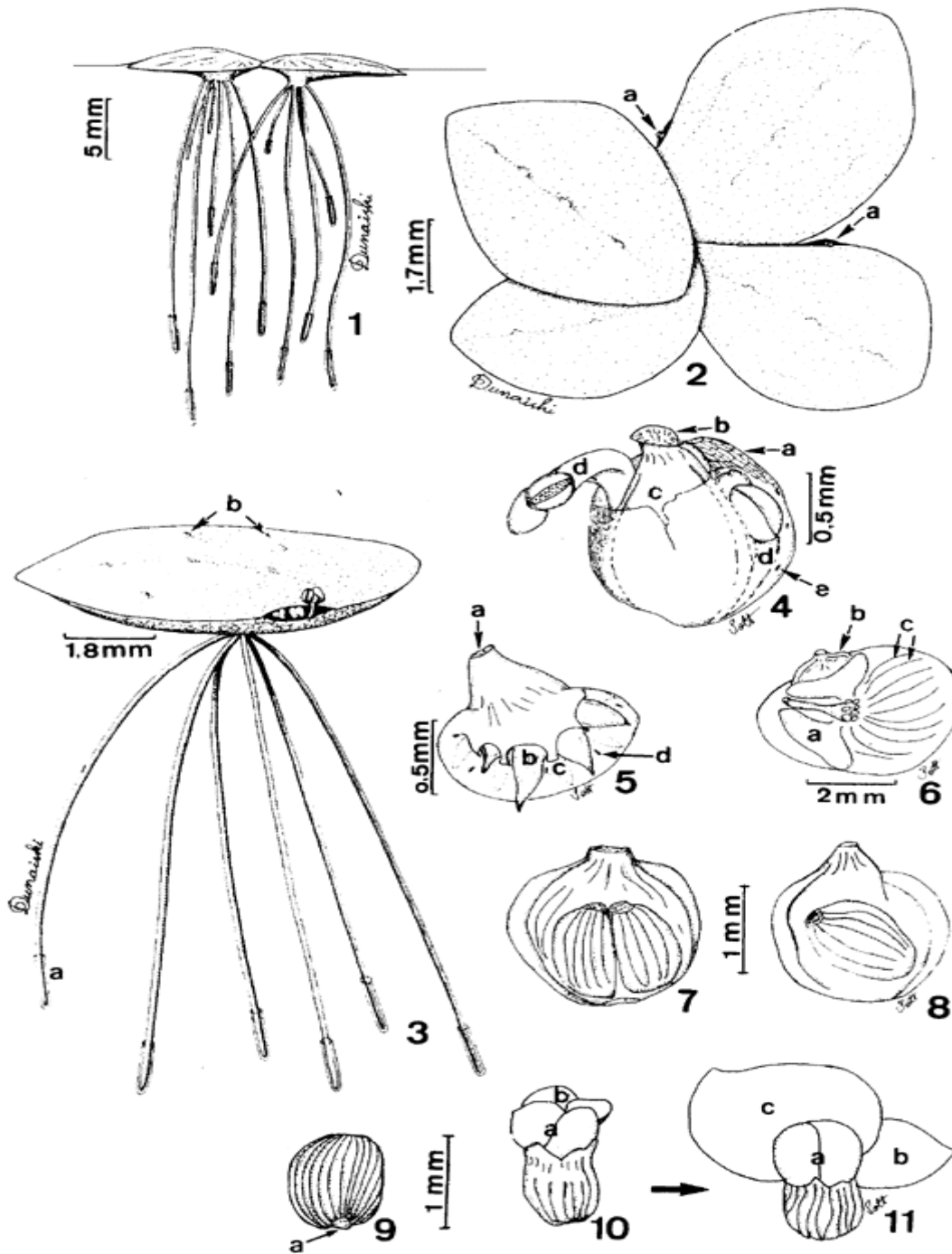


Figura 3- 5: *Spirodela intermedia* 1. Hábito em relação à superfície da água; 2. Vista dorsal (superior): (a) flor; 3. Vista lateral: (a) coifa, (b) papilas; 4. Flor: (a) perfilo com abertura apical, (b) estigma, (c) ovário, (d) estame de maturação desigual, (e) ráfides; 5. Perfilo da raiz: (a) estúpite, (b) raiz primária, (c) raiz secundária (sob perfilo), (d) ráfides; 6. Fronde em vista ventral (inferior): (a) cavidade vegetativa, (b) fruto alado, (c) nervuras; 7. Fruto com 2 sementes; 8. Fruto com 1 semente; 9. Semente: (a) chalaza; 10. Germinação: (a) cotilédone, (b) fronde-mãe; 11. Plântula ainda com a semente: (a) cotilédone, (b) fronde-mãe, (c) fronde-filha. (Fonte: POTT & CERVI, 1999).

A espécie é restrita à América do Sul (da Argentina à Venezuela) e América Central, com climas tropical, subtropical e temperado quente, preferindo verão úmido e inverno suave. No Brasil, ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. No Pantanal, ocorre na sub-região do Nabileque, de solo fértil, especialmente ao sul da Lagoa do Jacadigo, ao longo da estrada MS-454, e na área de inundação do Rio Paraguai. Assemelha-se a *S. polyrrhiza*, em tamanho e forma, por isso muitas vezes é confundida com ela. Ocorre geralmente em água lântica, ou então em enseadas de rios, entre a vegetação aquática, junto com outras espécies flutuantes e em "taboal", "pirizal" e "caetezal", formando um mosaico a meia sombra. A floração inicia-se em abril e ocorre até outubro, quando frutifica plenamente, apresentando, geralmente, duas sementes por fruto (POTT & CERVI, 1999).

3.4.3 Tratamento de água utilizando macrófitas aquáticas flutuantes

Várias opções de tratamento para remoção de células de cianobactérias e toxinas dissolvidas dos corpos d'água têm sido desenvolvidas e adaptadas em diferentes países (carvão ativado, filtração lenta em filtros de areia, coagulação, membrana filtrante, cloração, ozonização etc) (JURCZAK *et al.*, 2005; HOEGER *et al.*, 2005, NEWCOMBE & NICHOLSON, 2004; GRUTZMACHER *et al.*, 2002; FALCONER *et al.*, 1989). A gestão e tratamento de cianobactérias e suas toxinas, geralmente, aumenta o custo dos processos de tratamento d'água, aceitável para países desenvolvidos, mas pode ser um problema para outros países que possuem restrição econômica e de recursos tecnológicos. Conseqüentemente, alternativas eficientes e baratas de opções de tratamento devem ser desenvolvidas.

A qualidade das águas de reservatórios públicos pode ser afetada pelas atividades humanas na bacia hidrográfica, a montante de represa ou do ponto de captação. Assim, é necessário estudar um conjunto de medidas mitigadoras deste impacto, visando reduzir a possibilidade de que a atividade antrópica na bacia inviabilize o uso da água como fonte de abastecimento público.

Muito tem sido pesquisado a respeito de plantas que possam atuar como atenuadoras deste processo, denominado fitodepuração, que resulta em uma melhoria da qualidade da água decorrente do desenvolvimento de plantas.

As macrófitas aquáticas vêm constituindo uma alternativa em diversos sistemas de tratamento de efluentes, a exemplo do tratamento de esgoto doméstico (SOUSA *et al.* 2004), na aqüicultura (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2006; SCHULZ *et al.*, 2004; SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2003; SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2002; ZANIBONI-FILHO, 1997) e pós-tratamento de efluentes agroindustriais (REIDEL *et al.*, 2005).

As plantas aquáticas além de impedir o crescimento de algas, permitem também a remoção de nitrogênio, fósforo, sólidos suspensos, carga orgânica e alcalinidade (TRIPATHI & SHUKLA, 1991).

Muitas espécies utilizadas na fitodepuração melhoram a oxigenação de águas profundas, como é o caso de *Lemna minor* (COSSU *et al.*, 2001). Segundo JEDICKE *et al.*, (1989) o aguapé pode duplicar a concentração de oxigênio dissolvido na água, proveniente da fotossíntese das folhas e fluxo interno de gases. Essa macrófita também é conhecida por ser capaz de absorver metais pesados (PERAZZA *et al.*, 1981). Segundo LENZI *et al.*, (1994) o aguapé poderia ser utilizado na descontaminação de águas poluídas com baixas concentrações de cromo (até $10\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$).

Constata-se que estudos utilizando macrófitas aquáticas em tratamento de água para a remoção de nutrientes, aumento de oxigênio dissolvido e captura de metais pesados demonstraram sua eficácia quanto utilizadas. Trabalhos mais recentes apostam na utilização destas plantas na remoção de cianotoxinas.

NIMPTSCH *et al.*, (2008) utilizaram no lago Chaohu, na China, um sistema de tanques contendo uma combinação da macrófitas *Lemna* sp., *Myriophyllum* sp. e *Hydrilla* sp. para eliminação de toxinas de cianobactérias. A biomassa de macrófita utilizada foi hábil na redução das concentrações iniciais de 12,11 e 9,17 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC-LR a valores abaixo dos recomendados pela OMS (1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC-LR) em apenas três dias. O referido autor considera o sistema de tanques de macrófitas funcional no tratamento de águas contaminadas com microcistinas.

3.4.4 Utilização da biomassa produzida

A possibilidade do uso da biomassa produzida após a utilização das macrófitas no tratamento de águas contaminadas deve ser avaliada. Antes de se destinarem estas plantas para utilização, devem ser feitas análises de concentrações de macro e micronutrientes, bem como metais pesados e cianotoxinas.

Pela potencialidade que as macrófitas aquáticas apresentam, diversos trabalhos mencionam o aproveitamento de biomassa, como a produção de adobe (BEZERRA *et al.*, 2007), adubação orgânica (SAMPAIO & OLIVEIRA, 2005) e compostagem (REIDEL *et al.*, 2005).

Em um estudo de composição química de macrófitas aquáticas realizado por HENRY-SILVA & CAMARGO (2002) foram observado o potencial de lâminas foliares de *Eichornia crassipes* e *Salvinia molesta*, e a planta toda de *Pistia stratiotes* como alimento, condicionado a estudos de aceitabilidade pelos animais.

A reciclagem de nutrientes perdidos pela erosão dos solos agrícolas para os corpos de água, através de utilização de plantas aquáticas flutuantes, seria, segundo KLEIN & AMARAL (1988), uma forma eficiente e de baixo custo de proporcionar uma maior estabilidade no ciclo dos nutrientes na bacia hidrográfica.

Em qualquer dos casos é fundamental conhecer a natureza e a concentração de outras substâncias que podem ser tóxicas. Conseqüentemente, a utilização da biomassa de macrófitas empregadas no tratamento de águas contaminadas com cianotoxinas deve ficar restrito a tecnologias que imobilizem essas toxinas, pois vários autores já comprovaram a bioacumulação de MCs em macrófitas aquáticas (SAQRANE *et al.*, 2007; MITROVIC *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2005; PFLUGMACHER *et al.*, 1999 e 1998). Estas tecnologias ainda são um desafio para a ciência.

3.4.5 Metabolização de cianotoxinas pelas macrófitas

Similar aos animais, plantas também metabolizam compostos orgânicos estranhos (xenobióticos) com diferentes tipos de sistemas enzimáticos de desintoxicação. Enquanto nos animais o processo é geralmente conectado a excreção de sub-produtos da metabolização via urina e/ou fezes, as plantas possuem a habilidade de isolar estes metabólitos (SANDERMANN, 1994). O processo de desintoxicação está dividido em três etapas: transformação, principalmente por oxidação e hidrólise (fase I), seguida por conjugação (fase II) associado a compartimentação interna e processos de armazenamento (fase III) (SANDERMANN, 1992).

Macrófitas aquáticas são conhecidas por acumular (PFLUGMACHER *et al.* , 1999) e metabolizar as microcistinas via biotransformação através da conjugação com a glutathiona (GSH) mediada pela glutathiona S-transferase (PFLUGMACHER *et al.* , 2001; PFLUGMACHER *et al.* , 1998).

4 Materiais e Métodos

A parte experimental desta pesquisa foi realizada em escala de bancada e teve por principal objetivo avaliar a utilização da macrófita aquática *Spirodela intermedia* na eliminação de cianotoxinas via bioacumulação. Neste capítulo é detalhada a obtenção da toxina, o cultivo e avaliação do crescimento da *Spirodela intermedia*, os equipamentos, a metodologia, os materiais empregados e a descrição do experimento realizado.

4.1 Materiais e Reagentes:

- Acetonitrila grau HPLC (Vetec);
- Ácido trifluoracético (TFA);
- Água Milli-Q do sistema Millipore (resistência 18,2M Ω);
- Balança eletrônica;
- Bandejas de Polietileno de 5 litros de capacidade;
- Bombinhas de oxigênio;
- Cartucho de octadecilsilano (ODS-C₁₈);
- Centrífuga com temperatura controlada;
- CLAE-DAD (Waters Alliance modelo 2998 equipado com detector fotodiodo (DAD));
- Coluna de extração de fase sólida (Sep-Park plus tC18, Water);
- Coluna para CLAE Merck LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m);
- Cultivo da cepa HBRF01 monoespecífica de *M. protocystis*;
- Cultivo de *M. novacekii* proveniente da Lagoa do Gambá;
- Cultura da macrófita *Spirodela intermedia*;
- ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) - kit enzimático de placas (Envirologic).
- Filtros seringa (Mirex) de 0,45 micrômetros;
- Graal de vidro;
- Lâminas e lamínulas;
- Leitora de ELISA;

- Liofilizador (MicroModulyo);
- Meio líquido ASM-1;
- Mesa agitadora (Nova Ética);
- Metanol grau HPLC (Vetec);
- Microfiltro fibra de vidro GF-1 47mm (Macharey-Nagel);
- Microscópio binocular (LEITZ), modelo Laborlux com a ocular direita contendo um retículo de Whipple calibrado com régua micrométrica padrão;
- Padrões de microcistinas Axxora (Grünberg, Alemanha), 98% de pureza;
- Sala de cultivo para a macrófita com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e foto período 12 h claro/12 h escuro, usando luz fria fluorescente com intensidade da ordem de $40 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- Seringas de 10mL;
- Seringas de 1mL;
- Solução nutritiva de Hoaglan com 1/5 da força iônica;
- Tinta Nanquim;
- Tubos Falcon;
- Ultra-sônica (USC 1400, UNIQUE);
- Vials de 1mL (Water);

4.2 Metodologia

4.2.1 Cultivo e avaliação do crescimento da *Spirodela intermedia*

A macrófita aquática *Spirodela intermedia* foi fornecida ao laboratório de Qualidade de Água da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pelo professor Mauro Schettino do Departamento de Ciências Biológicas. Ela é originária da região do Pantanal, e foi cedida a UFOP pela pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Vali Joana Pott.

A *Spirodela intermedia* já era cultivada há dois anos no laboratório antes de ser utilizada neste experimento.

O cultivo foi realizado em solução nutritiva de Hoagland com 1\5 da força iônica original e pH 7 (HOAGLAND *et al.*, 1950) (Tabela 4-1). As condições de cultivo foram: aeração constante, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e foto período 12 h claro/12 h escuro usando luz fria fluorescente com intensidade da ordem de $40\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A cultura foi realizada em bandejas de polietileno, contendo cinco litros de solução nutritiva (Figura. 4-1).



Figura 4- 1: Cultura de *Spirodela intermedia* a partir da qual as plantas foram retiradas para a realização do experimento.

Tabela 4- 1: Soluções necessárias para o preparo da Solução nutritiva para o crescimento da *Spirodela intermedia* segundo HOAGLAND *et al.*, 1950.

Soluções Estoque	Concentração	Soluções estoque de Micronutrientes	Concentração
KH ₂ PO ₄	136,09g.L ⁻¹	H ₃ BO ₃	2,86g.L ⁻¹
KNO ₃	101,10g.L ⁻¹	MnCl ₂	1,81g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	346,47g.L ⁻¹	ZnSO ₄	0,22g.L ⁻¹
Ca(NO ₃).4H ₂ O	236,15g.L ⁻¹	CuSO ₄	0,08g.L ⁻¹
		Na ₂ MoO ₄	0,02g.L ⁻¹
		Fe-EDTA	0,045mM

Preparo da solução nutritiva de Hoagland com 1/5 da força iônica

Volume retirado das soluções estoque para o preparo de 1L da solução nutritiva, com 1/5 da força iônica:

Solução Estoque	Volume da alíquota (mL)
KH ₂ PO ₄	0,2
KNO ₃	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4
Ca(NO ₃).4H ₂ O	1,0
Micronutrientes	0,2
Fe-EDTA	0,1

Para a avaliação do crescimento foi colocado 1,0 g de massa fresca de *Spirodela intermedia* em um béquer contendo 100 mL de solução nutritiva de Hoagland.

O experimento foi realizado em quintuplicata (Figura 4-2). As coletas de biomassa foram realizadas nos tempos de 7, 14, 21 dias.

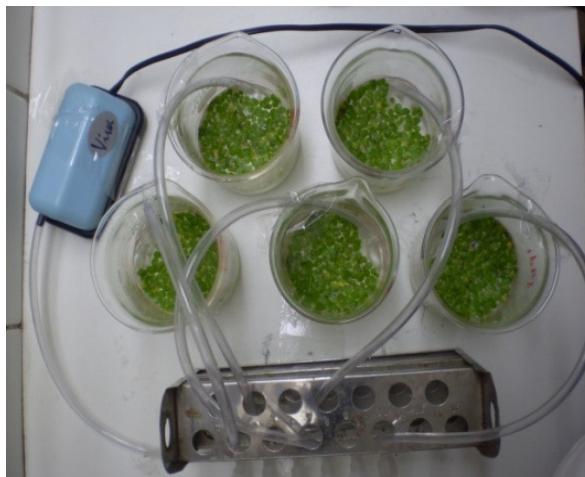


Figura 4- 2: Avaliação do crescimento da *Spirodela intermedia* realizada em quintuplicata.

4.2.2 Obtenção da toxina

Coleta da amostra da floração de cianobactérias na Lagoa do Gambá

Com o objetivo de obter uma cepa de cianobactéria produtora de microcistinas, amostras de água com concentração de aglomerados algais foram coletadas de uma floração na Lagoa do Gambá, Ouro Preto (20°23'78''S, 43°30'05''W, figuras 4-3 e 4-4) em julho de 2007.

As amostras (cinco litros) foram coletadas na superfície da água, acondicionadas em recipientes plásticos e preservadas em gelo a aproximadamente 4,0°C (COPASA-MG, 1992). Em seguida foram encaminhadas para exame imediato no laboratório de Hidrobiologia da COPASA.

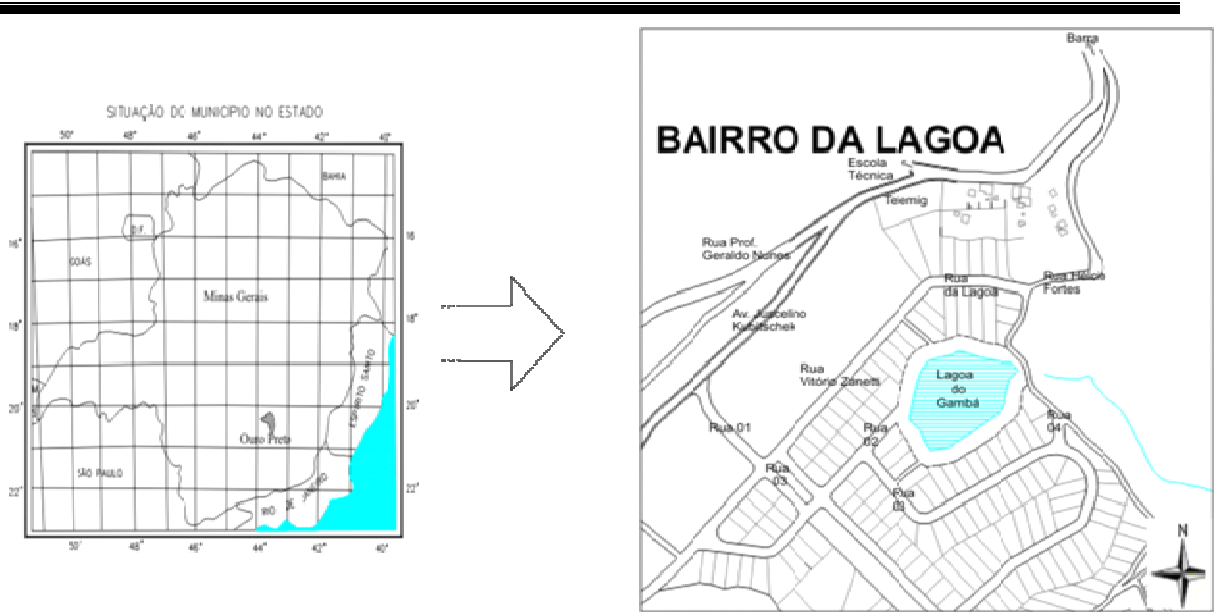


Figura 4- 3: Localização geográfica da Lagoa do Gambá e da cidade de Ouro Preto (Fonte: BORGES, 2006)



Figura 4- 4: (A) Vista panorâmica da lagoa; (B) Foto da floração de cianobactérias na Lagoa do Gambá em julho de 2007.

Utilizou-se para a análise qualitativa um microscópio binocular da marca LEITZ, modelo Laborlux com a ocular direita contendo um retículo de Whipple calibrado com régua micrométrica padrão. Pequenas alíquotas de amostras *in vivo* foram depositadas em

lâminas de vidro e cobertas com tinta nanquim para favorecer uma melhor visualização da mucilagem e das colônias das cianobactérias, no aumento de 40 vezes. Cobriu-se então a lâmina, contendo a amostra, com uma lamínula, e a observação passou a ser feita em aumentos maiores (400 e 1000 vezes), para facilitar a visualização e aumentar a precisão da medida das células. Para o aumento de 1000 vezes, utilizou-se sempre óleo de imersão. O sistema de classificação de cianobactérias adotado foi o de KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998. De acordo com esta classificação, a espécie isolada foi a *Microcystis novacekii*.

Avaliação da toxicidade da cepa de *Microcystis novacekii*

A toxicidade da amostra de seston foi testada em camundongos machos suíços de 21 a 25 gramas de massa corporal através da injeção intraperitoneal (i.p) do extrato em diferentes doses, segundo CETESB (1993). Foram calculadas três faixas de dosagens (1 a 100; 101 a 500 e 501 a 1000mg.kg⁻¹ de massa corporal) e para cada concentração foram utilizados quatro animais. Os camundongos foram continuamente observados durante 24 h após a (i.p) e pesados em balança eletrônica. O grupo controle foi injetado com 1mL de 0,9% NaCl pH 4.0.

A ausência de toxicidade da amostra foi um fator limitante para a realização dos experimentos, incluídos nos objetivos propostos para este trabalho. Este resultado conduziu à necessidade do cultivo de uma espécie tóxica de *Microcystis sp.* cedida pelo Laboratório de Hidrobiologia da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).

Cultivo em massa da *Microcystis protocystis* (COPASA)

Uma linhagem de *Microcystis protocystis*, conhecida por produzir altos níveis de microcistina-RR, proveniente da floração natural de cianobactérias no reservatório de Furnas (21°. 27' 29,3''S/45°. 59'47''O) (Figura 4-5), situado ao sul do estado de Minas Gerais, foi fornecida pelo laboratório de Hidrobiologia da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA) e cultivada em grandes quantidades para a produção de toxina.

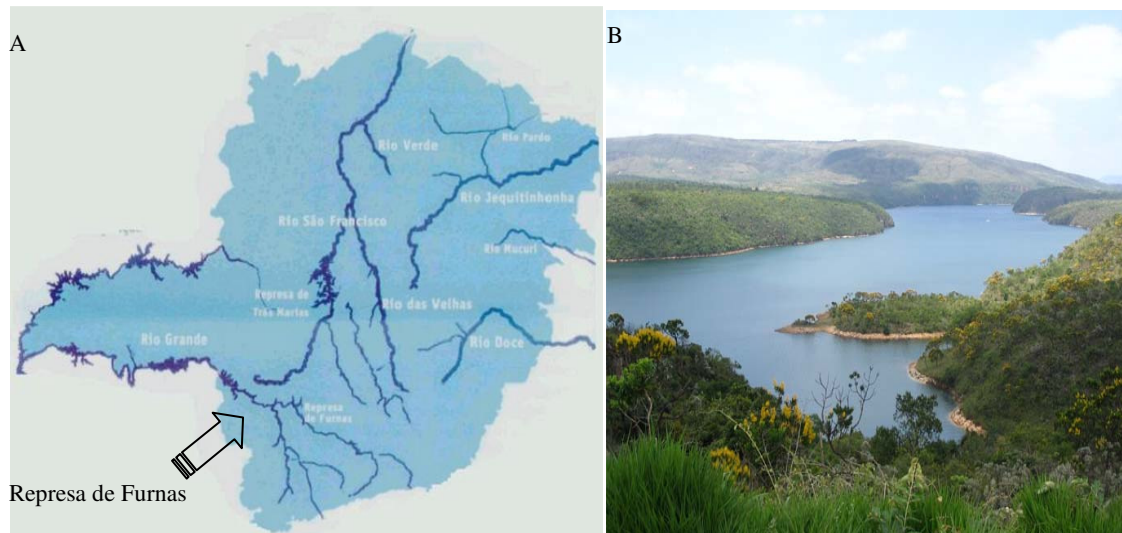


Figura 4- 5: A: Localização geográfica da represa de Furnas (Fonte: COPASA) B: Vista panorâmica do reservatório de Furnas (Fonte: <http://www.minastour.com.br/website/imagens>-acesso em: 15/01/2009)

O cultivo foi realizado em meio líquido ASM-1 (Tabela 4-2) (GORHAM *et al.*, 1964), sob aeração, temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação contínua de luz fria fluorescente com intensidade da ordem de $40\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A cultura em massa de *M. protocystis* foi realizada em um frasco de vidro de nove litros durante oito semanas. A contagem de células foi realizada semanalmente com a câmara de Sedgwick-Rafter, segundo A.P.H.A, (2005), para observar o crescimento da cultura (Figura 4-6).



Figura 4- 6: Cultivo da cepa HBRF01 mono específica de *M. protocystis* do reservatório de Furnas

Tabela 4- 2: Soluções necessárias para o preparo do meio ASM-1 segundo GORHAM *et al.*, 1964.

Solução-estoque A:			
NaNO ₃			1,70g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O			0,49g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O			0,41g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O ou CaCl ₂			0,29g / 0,219g
Água deionizada			200mL
Solução-estoque B:			
KH ₂ PO ₄ ou KH ₂ PO ₄ . 3 H ₂ O			0,87g/ 1,14g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O ou Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O			1,78g / 1,15g
Água deionizada			100mL
Solução-estoque C:			
H ₃ BO ₃			2,48g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O			1,39g
FeCl ₃ . 6 H ₂ O			1,08g
ZnCl ₂			0,335g
CoCl ₃ . 6 H ₂ O			0,019g
CuCl ₃ . 2 H ₂ O			0,0014g
Água deionizada			100mL
Solução-estoque D:			
EDTA de sódio (EDTA Na ₂)			1,86g
Água deionizada			100mL
Preparo do meio de cultura líquido ASM-1:			
Em 977,5mL de água deionizada adicionar:			
Solução A	20mL	Solução C	0,1mL
Solução B	2,0mL	Solução D	0.4mL

Extração, Purificação e Identificação de Microcistina-RR

Extração

As células foram submetidas ao processo de gelo (-20°C) e degelo (três vezes), para a ocorrência de lise celular e liberação das microcistinas intracelulares para o meio. O volume do cultivo foi dividido em frascos previamente pesados. O concentrado algal foi liofilizado em um liofilizador de bancada da marca MicroModulyo por 48 horas; em seguida, os frascos com o material liofilizado foram novamente pesados para o cálculo da concentração em mg.L⁻¹. Após a liofilização, foram obtidos 7,02g de peso seco de células da alga. Este material foi extraído de acordo com a metodologia descrita por FASTNER *et al.*, (1998), usando 35mL de metanol 75%.

Purificação

A purificação foi realizada seguindo o método proposto por (KRISHNAMURTHY *et al.*, 1986). Por esse método, toda a amostra foi centrifugada três vezes a 2200G s⁻¹ e o sobrenadante foi recolhido e evaporado em capela, a aproximadamente 40°C. Esse concentrado foi purificado em um cartucho de octadecilsilano (ODS-C₁₈), previamente ativado com 6mL de metanol a 100 %, seguido por 6mL de água ultra-pura (Milli-Q). Um litro resultante da extração foi dividido em volumes iguais de 200mL. Posteriormente, eles foram passados em cinco colunas de ODS. A coluna foi lavada com dois volumes de 6mL de água MilliQ e dois volumes de 6mL de metanol 20%. Logo após, a toxina foi eluída da coluna por uma solução de metanol 75% (com 0,1% de ácido trifluoracético – TFA). Essa última fração foi recolhida, completamente seca e ressuspensa em 6mL de água MilliQ.

Identificação

Para a determinação da microcistina, primeiramente foi utilizado o método imunoenzimático do tipo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), sendo

oferecido comercialmente sob a forma de um kit enzimático de placas (Envirologic). A avaliação dos resultados do ELISA em comparação com as análises na CLAE mostrou uma grande diferença nas concentrações. De acordo com MERILUOTO & CODD (2006), o ELISA pode fornecer muitos resultados falsos positivos. Devido à incoerência nos resultados do ELISA, as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram preferidas.

As amostras foram analisadas no Laboratório multiusuário da Escola de Farmácia, utilizando-se um equipamento com detector foto-diodo (DAD). A separação cromatográfica foi desenvolvida em coluna Merck LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m). A determinação das microcistinas por CLAE-DAD foi realizada, usando um gradiente de fase móvel de MilliQ + 1% TFA (eluente A) e acetonitrila + 1% (eluente B) e detecção por foto-diodo em comprimento de onda de 200-300nm. As condições de gradiente linear foram determinadas como: 65% eluente A e 35 % eluente B como condições iniciais. Depois das análises, o gradiente foi reajustado para as condições iniciais. O total de tempo gasto em uma corrida foi de vinte e cinco minutos, utilizando uma temperatura de 40°C para a coluna. O volume de injeção da amostra foi de 80 μ L, com fluxo de 1mL por minuto. Para a quantificação de microcistinas-RR foram utilizados padrões de microcistinas Axxora (Grünberg, Alemanha), 98% de pureza. Uma curva analítica foi realizada, usando as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 50, 100 μ g.mL⁻¹.

Devido ao cromatograma do extrato bruto da toxina extraída da *M. protocystis* mostrar vários diferentes picos ao lado do pico da MC-RR, uma nova purificação da MC-RR foi realizada, usando SEP colunas (Sep-Park plus tC18, Water). Para isso, o extrato bruto foi passado na SEP coluna previamente ativada com 5,0mL de metanol 100%. Logo após, essa foi eluída com 5,0mL de metanol 100%. Esse eluente foi completamente seco e ressuspense em 1,0mL de metanol 100 %.

O diagrama que mostra as etapas de extração, identificação e quantificação da microcistina é apresentado na figura 4-7.

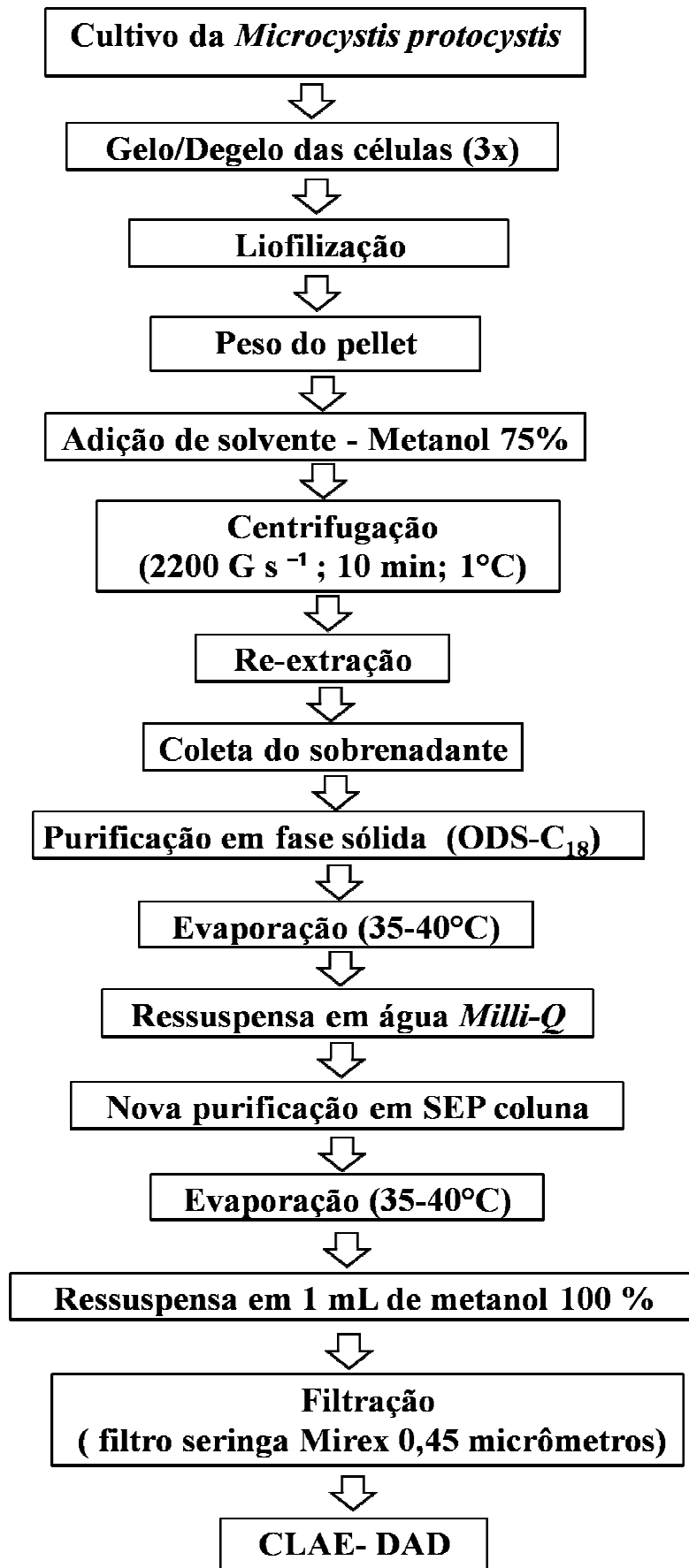


Figura 4- 7: Extração, identificação e quantificação da microcistina.

4.2.3 Remoção da MC-RR pela macrófita *Spirodela intermedia*

Para a avaliação do potencial de remoção da MC-RR da água, foi utilizado 1,0g de peso fresco de *Spirodela intermedia* para 100mL de solução nutritiva de Hoagland, contendo MC-RR. O experimento foi realizado sob as mesmas condições do cultivo descritas. Esse foi feito em triplicata nas concentrações de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\mu\text{g.L}^{-1}$. As coletas foram realizadas com 0, 1, 2, 3, 7, 14, e 21 dias. O controle não continha a macrófita, apenas os 100mL de solução nutritiva de Hoagland com MC-RR (Figura 4-8). As condições climáticas dos controles foram idênticas às do experimento (Figura 4-9).

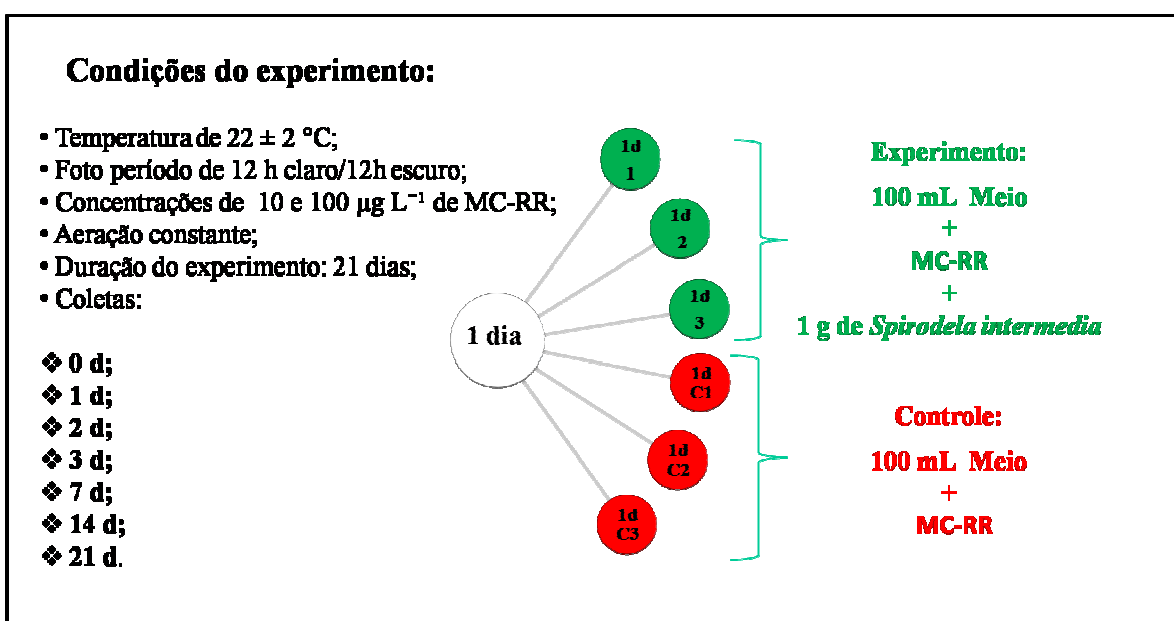


Figura 4- 8: Esquema da exposição da *Spirodela intermedia* a duas concentrações de microcistina-RR ($10\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\mu\text{g.L}^{-1}$).



Figura 4- 9: Exposição da *Spirodela intermedia* à MC-RR.

4.2.4 Preparo das amostras para as análises na CLAE

Após o experimento, as amostras coletadas foram divididas em Amostra 1 (água) e Amostra 2 (*Spirodela intermedia*). As Amostras 1 foram filtradas com microfiltro fibra de vidro GF-1 47mm (Macharey-Nagel) para remover o material em suspensão. O filtrado das amostras de água (100mL) foi concentrado em uma coluna de extração de fase sólida (Sep-Park plus tC18, Water) previamente ativada com 5mL de metanol 100%. O cartucho Sep-Park foi eluído com 5,0mL de metanol 100%. Este foi evaporado a 35-40°C, ressuspensão em 1,0mL de metanol 100%, filtrado em filtros seringa (Mirex) de 0,45µm e levados para análise de MC-RR na CLAE-DAD.

Após as coletas, as Amostras 2 foram lavadas com água destilada. As plantas foram pulverizadas em um graal de vidro. Para a extração das cianotoxinas foram acrescentados 4,0mL de metanol 100%. Esse material foi transferido para tubos Falcon e homogeneizado por uma hora. A pasta fluida obtida foi ultra-sonicada por um minuto e deixada sob agitação por 24 horas. Logo após, realizou-se uma centrifugação a 2200G.s⁻¹ e 1°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e as amostras foram submetidas a uma re-extração. Os sobrenadantes coletados foram evaporados a 35-40°C e ressuspensos em 1,0ml de metanol 100%. Esses foram filtrados em filtro seringa (Mirex) de 0,45µm e levados para análise na CLAE-DAD e no espectrômetro de massas.

4.2.5 Análise no Espectrômetro de Massas (LC-MSMS)

As análises no Espectrômetro de Massas (LC-MSMS), para a identificação da microcistina-RR, foram realizadas apenas nas Amostras 2. Estas se baseiam no tempo de retenção na fase reversa da CLAE e na observação dos valores m/z. Para essas análises, utilizou-se uma combinação de Agilent 1200 e de um quadrupolo detector 3200 de massas. Para a CLAE uma coluna STAR RP-18 endcapped 30 x 4mm de diâmetro interno (ID) e 3µm partículas foram utilizadas. Foi utilizado um gradiente linear de acetonitrila e água, ambos contendo 0,5% de ácido fórmico. Para a ionização dos parâmetros MSMS utilizou-se: 3,8KV de tensão capilar, cone de 80V de tensão, temperatura da fonte de 150°C, temperatura de dessolvatação de 300-350°C, fluxo de do cone de gás de 50Lh⁻¹, dessolvatação gás 650L.h⁻¹.

As análises de espectrometria de massas foram gentilmente realizadas pelo Prof.Dr. Stephan Pflugmacher do IGB - Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlin, Alemanha.

O diagrama que mostra as etapas do preparo das amostras para a leitura na CLAE-DAD e no LC-MSMS é apresentado na figura 4-10.

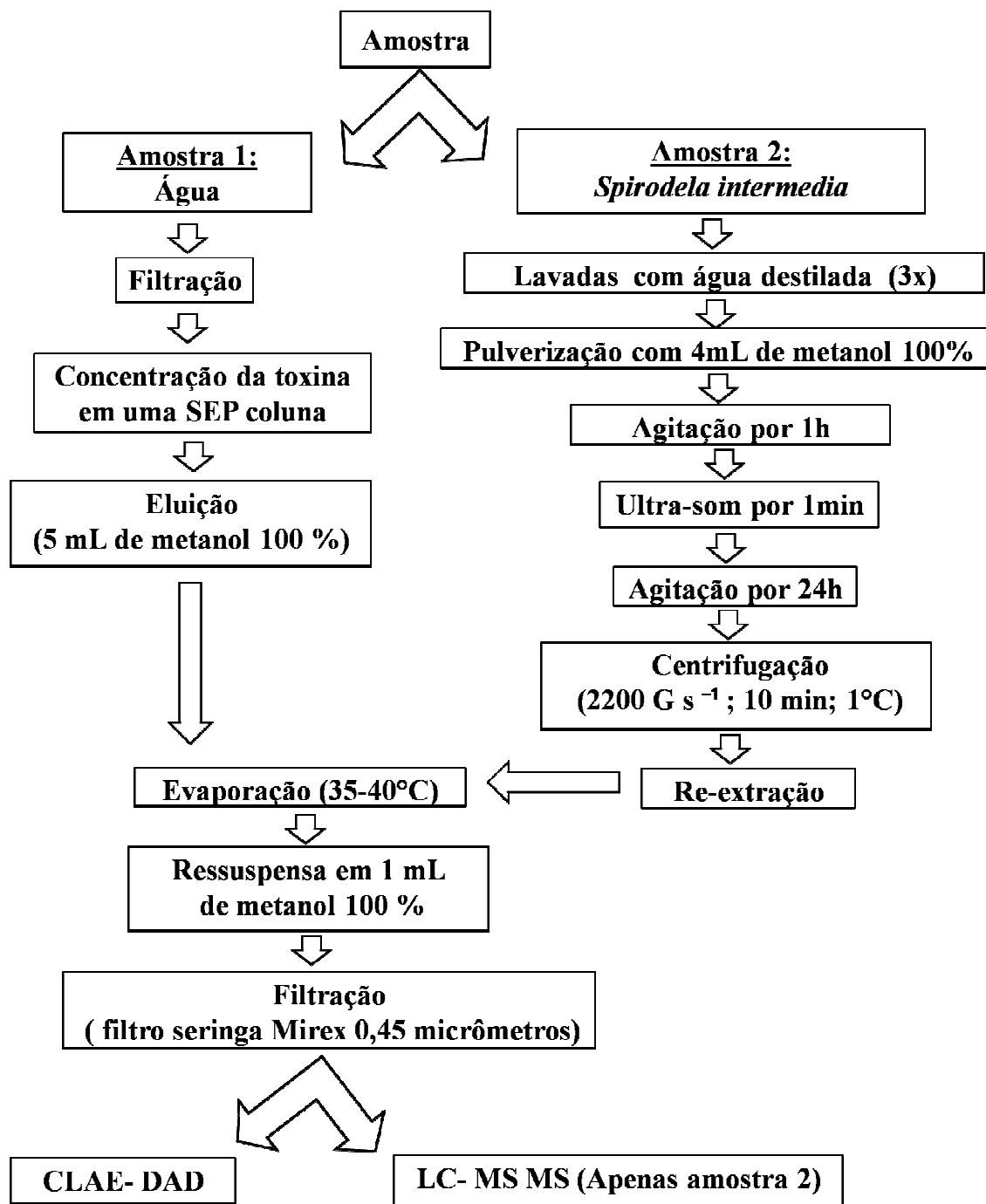


Figura 4- 10: Esquema do preparo das amostras para a leitura na CLAE-DAD e no LC-MSMS

5 Resultados e discussão

Nesta sessão, são apresentados e discutidos os seguintes resultados: avaliação de toxicidade da cepa de *M. novacekii* encontrada na lagoa do Gambá; obtenção, quantificação e caracterização da toxina extraída da cepa HBRF01 monoespecífica de *M. protoctyctis*; avaliação do crescimento da macrófita utilizada; análise da concentração de MC-RR encontrada na água após o tratamento pela *Spirodela intermedia*; análise da concentração de MC-RR bioacumulada pela planta e identificação dos conjugados de microcistinas encontrados na *Spirodela intermedia*.

Como mencionado nos itens anteriores, o impacto do crescimento populacional desordenado, assim como as inúmeras atividades humanas, contribuem para o desequilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos, levando-os a condições cada vez mais críticas de poluição (COELHO-BOTELHO, 2004).

O estado trófico ou grau de fertilidade de massas de água varia de oligotróficas, mesotróficas a eutróficas com o aumento da oferta de nutrientes e matéria orgânica. A eutrofização é frequentemente o resultado de uma elevada oferta de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, para as águas de superfície que resulta numa maior produção de produtores primários, especialmente fitoplâncton e plantas aquáticas. Fitoplâncton são desagradáveis em altas densidades. A visão e o cheiro oriundo da decomposição de coágulos ou massas do fitoplâncton diminuem o valor recreativo da maioria das águas e, geralmente, gera preocupações no público. Além disso, florações de fitoplâncton produtores de toxina podem causar doença generalizada. A floração é uma notável concentração de fitoplâncton, muitas vezes localizados em ou próximo à superfície.

Estes nutrientes em conjunto com a alta temperatura, podem ser utilizados para uma rápida expansão das cianobactérias em comparação com macrófitas vindo concorrer para uma maciça proliferação de algas (PEARL *et al.*, 2008).

Entre os diversos problemas ocasionados pelas florações, está o aumento no custo do tratamento da água de abastecimento e aumento na probabilidade de intoxicações humanas em razão das toxinas produzidas por cianobactérias.

No Brasil, já foi documentada a existência de cianotoxinas em vários mananciais de água. De acordo com a Portaria 518 do Ministério da Saúde, as instituições responsáveis pelo abastecimento de água estão obrigadas ao monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas (BRASIL, 2004).

5.1 Avaliação da toxicidade da espécie de cianobactéria encontrada na lagoa do Gambá em junho de 2007

A análise qualitativa do fitoplâncton mostrou o domínio de colônias de *Microcystis novacekii* (Figura 5-1) na água da lagoa do Gambá. De acordo com SANT'ANNA & AZEVEDO (2000), as espécies de *Microcystis* (ordem Chroococcales) são as mais encontradas em florações de cianobactérias em água doce no Brasil. O gênero é caracterizado por células que se dividem principalmente em três planos, possuem aerótopos e formam colônias irregulares (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998).

As colônias jovens são esféricas a ligeiramente ovais, com diâmetros entre 50-70 μ m. Quando alcançam aproximadamente 60-70 μ m de diâmetro começam a se dividir em duas partes ou mais, assim, outras colônias vão sendo formadas. O tamanho das células varia entre 2,4-6,0 μ m.

De acordo com KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1998), a espécie *M. novacekii* ocorre em águas eutrofizadas, formando ou contribuindo para o desenvolvimento de florações na água. Entretanto, ela não faz parte das cianobactérias planctônicas bem conhecidas e raramente é citada na literatura relevante, apesar de poder ser distinguida pelo formato das colônias e pelo envelope mucilaginoso homogêneo e extenso (HINDÁK, 2006).

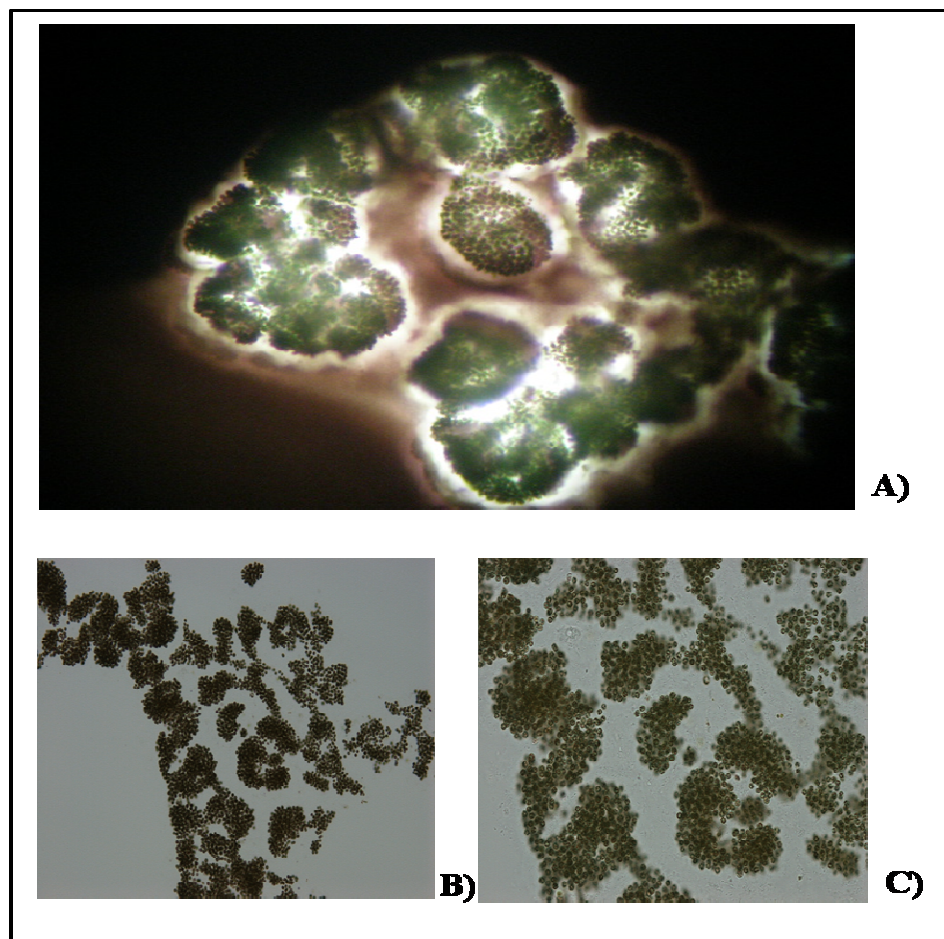


Figura 5-1: Formas coloniais de *Microcystis novacekii* encontradas na floração da lagoa do Gambá em julho de 2007. ((A) (aumento 100X, coloração com nanquim); (B) (aumento 200X); (C) (aumento 400X)).

5.1.1 Análise por ELISA

O resultado da análise da presença de microcistinas no material coletado da floração da Lagoa do Gambá realizada pelo kit ELISA foi negativo. Mesmo com um limite de detecção do Kit ELISA de $0,2\mu\text{g.L}^{-1}$, microcistinas não foram detectadas.

5.1.2 Bioensaio em camundongos

No teste de toxicidade com os camundongos, não foi observada a morte de animais em nenhum dos grupos. Devido à essa ausência, não foi possível calcular o valor da DL_{50} . O método apresenta pouca sensibilidade para detectar baixas concentrações de cianotoxinas.

5.1.3 Análise na CLAE

A partir dos valores obtidos por meio das análises cromatográficas foi elaborada uma curva analítica para microcistina-RR. As análises foram realizadas em triplicata adotando as massas estabelecidas na metodologia apresentada anteriormente. Os dados obtidos possibilitaram a definição da equação da reta, bem como o valor do coeficiente de correlação linear (R^2) (Figura 5-2).

A curva analítica apresentou boa linearidade (R^2 igual a 0,997), e foi usada para determinar a concentração de microcistina-RR tanto no cultivo quanto após a realização do experimento.

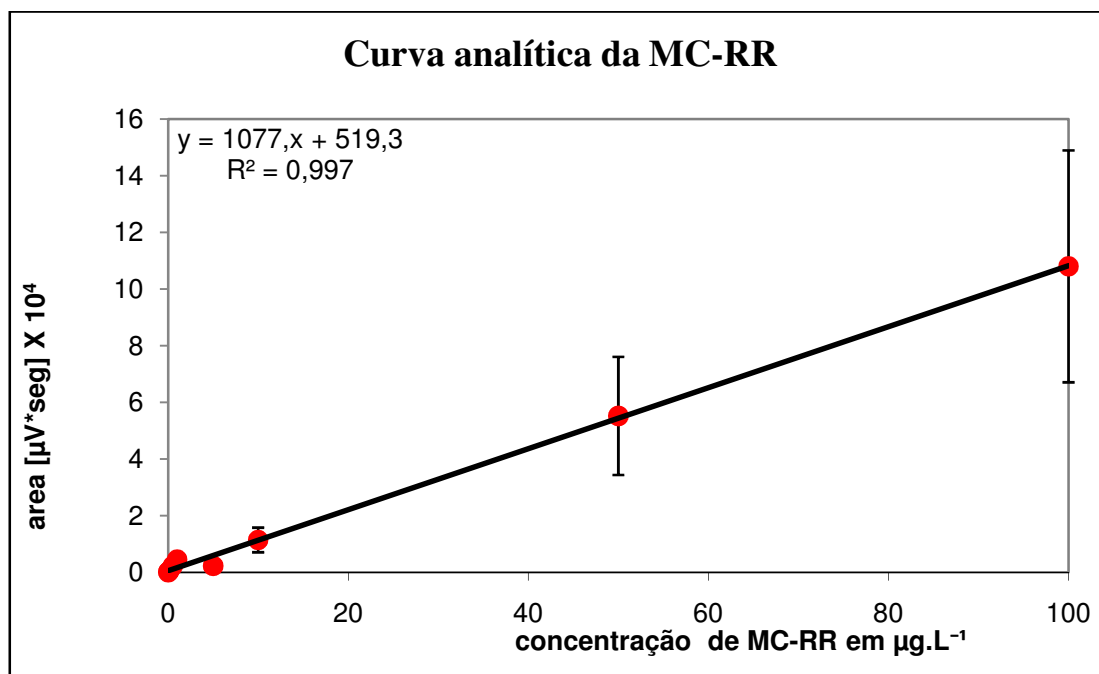


Figura 5- 2: Curva analítica da microcistina-RR produzida em CLAE-DAD.

A análise do CLAE não detectou a presença de microcistinas na amostra. A técnica deve combinar a identificação dos espectros na região do UV de microcistinas (microcistina-LR, microcistina-RR, microcistina-YR, etc) com o tempo de retenção característico de cada variante e quantificar a amostra em comparação com um padrão puro de concentração conhecida de microcistina. Na Figura 5-3 observa-se a ausência de picos característicos das variantes de microcistinas no espectro da amostra da lagoa.

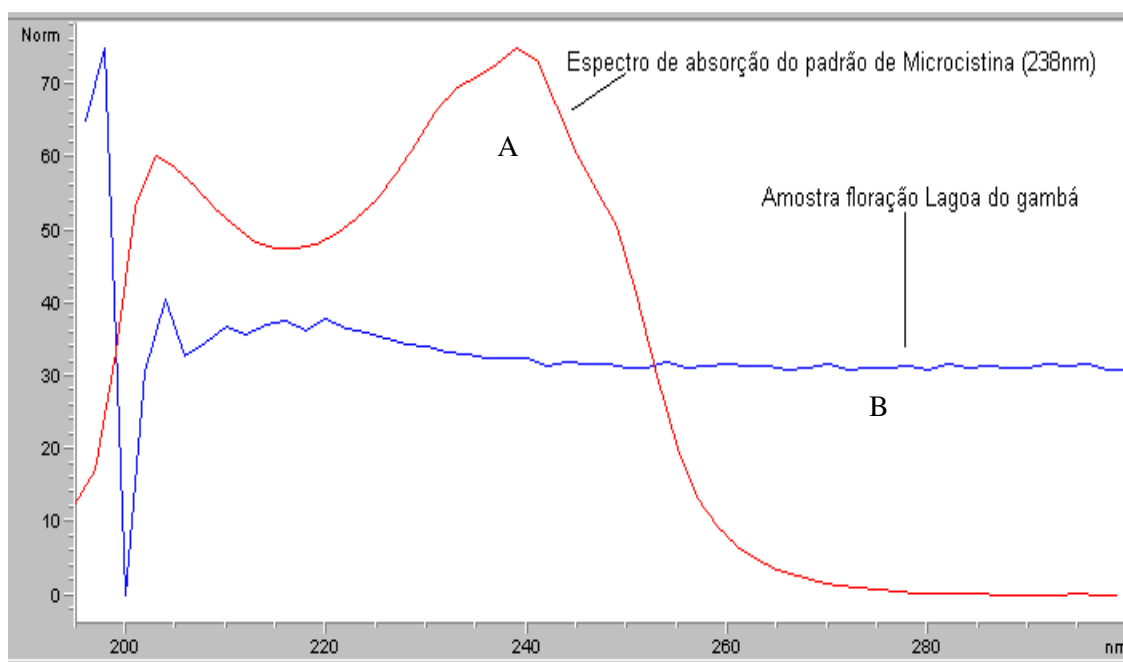


Figura 5- 3: Análise na CLAE da amostra da floração da Lagoa do Gambá. (A) padrão de MC-LR (*Microcystis* RST 9501); (B) amostra de floração da Lagoa do Gambá.

Os resultados sugerem, portanto, que a floração algal na lagoa do Gambá não apresentava microcistinas. Para outros propósitos, o cultivo da espécie de *Microcystis novacekii* ficou mantido no laboratório de Hidrobiologia da COPASA.

5.2 Avaliação do crescimento da cepa HBRF01 monoespecífica de *M. protocystis*

A figura 5-4 mostra a curva de crescimento da *M. protocystis* (Figura 5-5) realizada a partir de um inóculo fornecido pelo Laboratório de Hidrobiologia da COPASA. A curva (figura 5-4) mostra um padrão típico de crescimento de bactérias, onde pode ser observada uma fase *lag*, fase *log* (fase de grande aumento no número de células) e fase estacionária. A contagem de células foi realizada semanalmente até que não fosse observado um aumento significativo no número de células (fase estacionária). Após oito semanas de cultivo, a massa algal foi congelada e liofilizada para a extração da toxina.

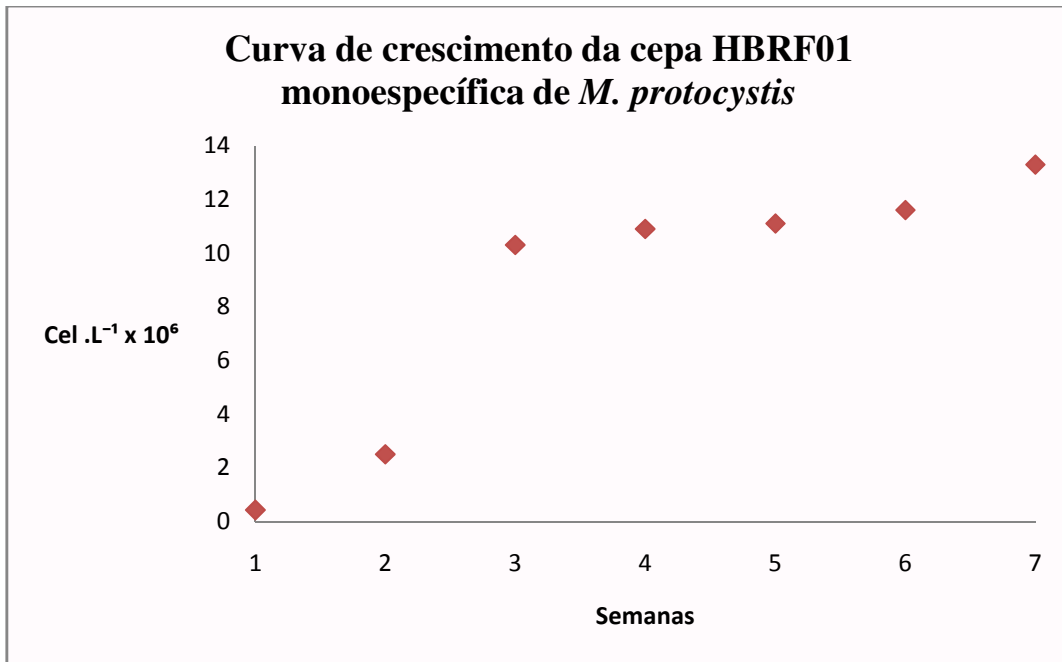


Figura 5- 4: Curva de crescimento da cultura da cepa HBRF01 mono específica de *M. protocystis* monitorada pela contagem de células usando a câmara de Sedgwick-Rafter segundo A.P.H.A, (2005).

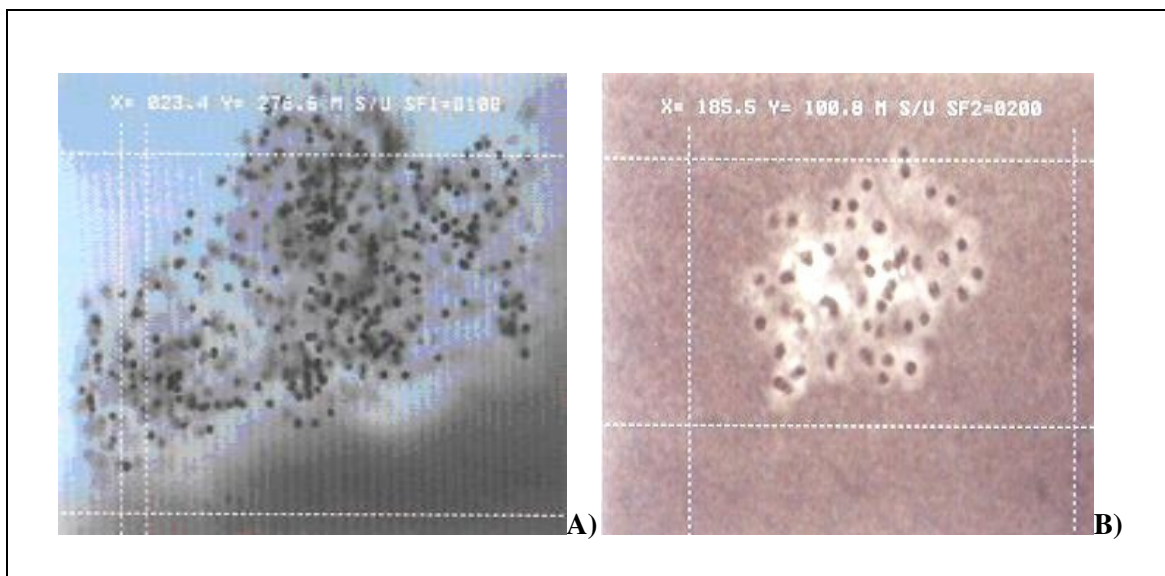


Figura 5-5: A: *M. protocystis* isolada da represa de Furnas em Novembro de 2003, 100 x. B: *M. protocystis* com detalhe da mucilagem individual (com tinta nanquim), 200 x (Fonte: Dr. Fernando Antônio Jardim).

5.3 Obtenção da toxina através da cultura da cepa HBRF01 monoespecífica de *M. protoctystis*

O resultado da purificação de microcistina-RR extraída do cultivo está representado na figura 5.6. A figura 5.6A mostra o cromatograma do padrão de microcistina-RR (Padrões de microcistinas Axxora (Grünberg, Alemanha), 98% de pureza) e a figura 5.6B mostra o cromatograma da toxina purificada.

A análise quantitativa da toxina resultou em uma solução-estoque com concentração de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ de microcistina-RR.

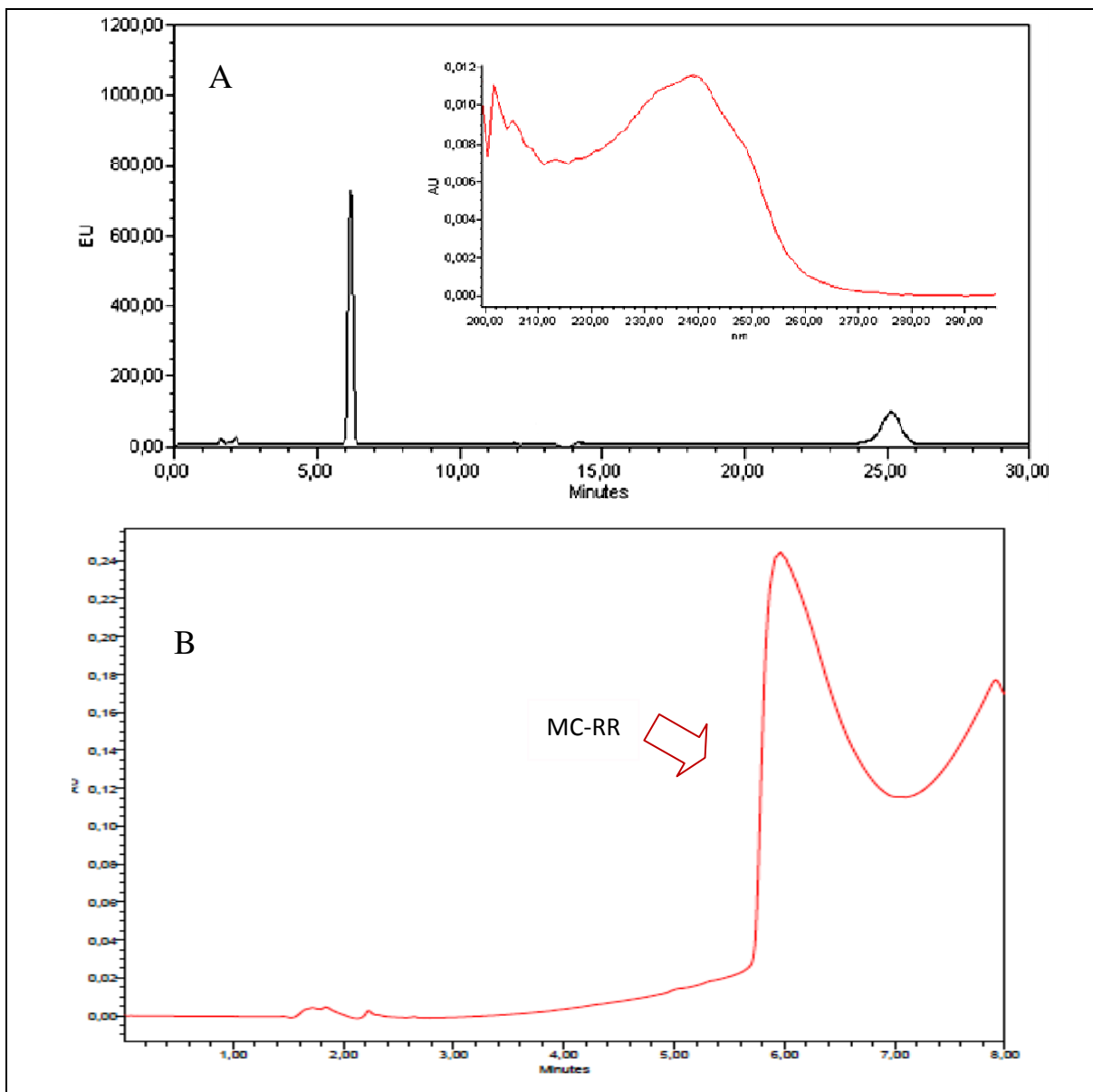


Figura 5- 6: Identificação de microcistina-RR extraída do cultivo de *Microcystis protoctystis*, por CLAE, absorvância em 240nm. A: Padrão de MC-RR. B: Amostra purificada a partir do cultivo lisado.

5.4 Avaliação do Crescimento da *Spirodela intermedia*

A avaliação do crescimento da macrófita durante o período do experimento teve como objetivo observar se durante os 21 dias de exposição haveria um aumento significativo da massa fresca.

A curva de crescimento (Figura 5-7) mostra um aumento de 0,3 gramas de peso fresco na massa da *Spirodela intermedia*, visto que este foi maior do sétimo ao décimo - quarto dia.

Macrófitas da família *Lemnaceae* são difundidas e possuem um rápido crescimento. Devido a sua alta sensibilidade a compostos químicos, incluindo metais pesados, detergentes e herbicidas (LANDOLT, 1986), plantas dessa família são usadas para biotestes de toxicidades (LEWIS, 1994).

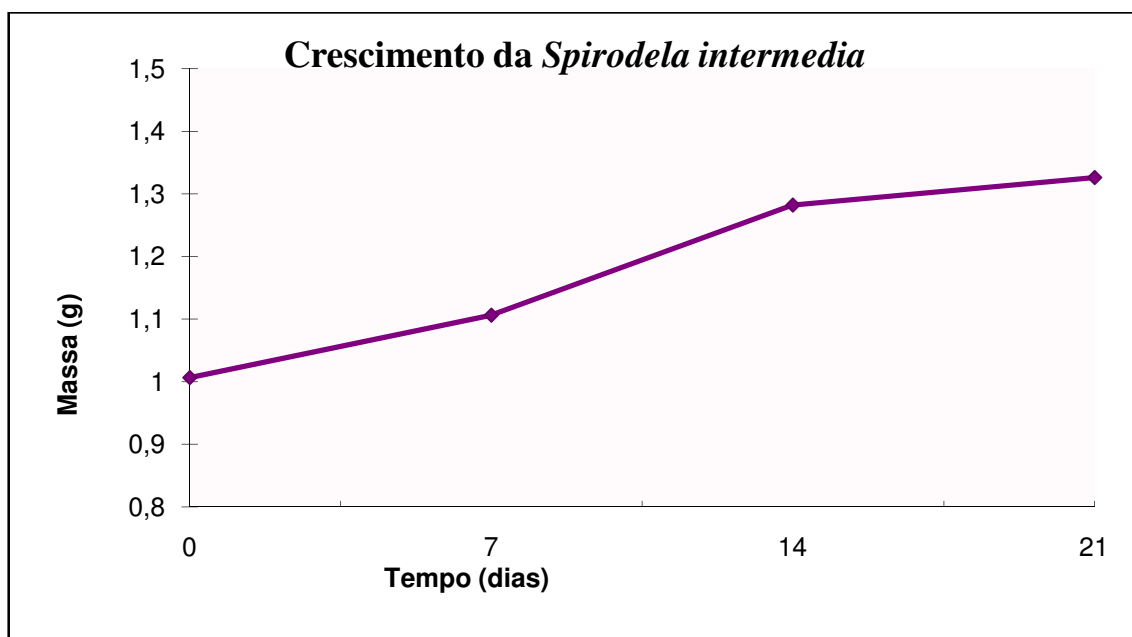


Figura 5- 7: Curva de crescimento da *Spirodela intermedia* sem a presença da toxina.

5.5 Remoção da MC-RR pela Macrófita *Spirodela intermedia*

A *Spirodela intermedia* foi exposta a concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os gráficos com os resultados são apresentados nas figuras 5-8 e 5-9.

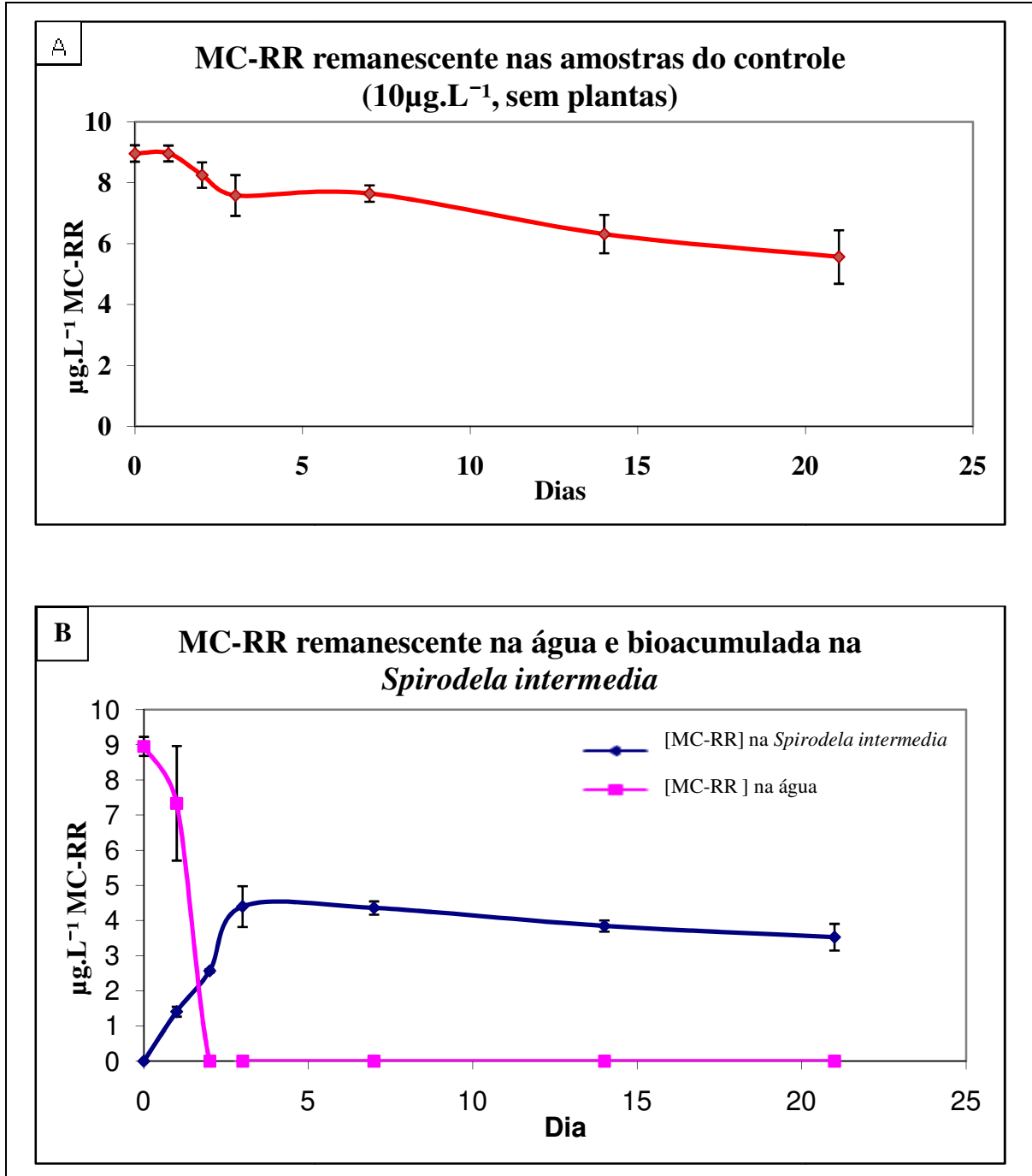


Figura 5- 8: A: Concentração da MC-RR nas amostras do controle (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sem plantas) após 21 dias de experimento. B: Concentração MC-RR remanescente na água \blacksquare e bioacumulada na *Spirodela intermedia* \blacklozenge após 21 dias de exposição a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

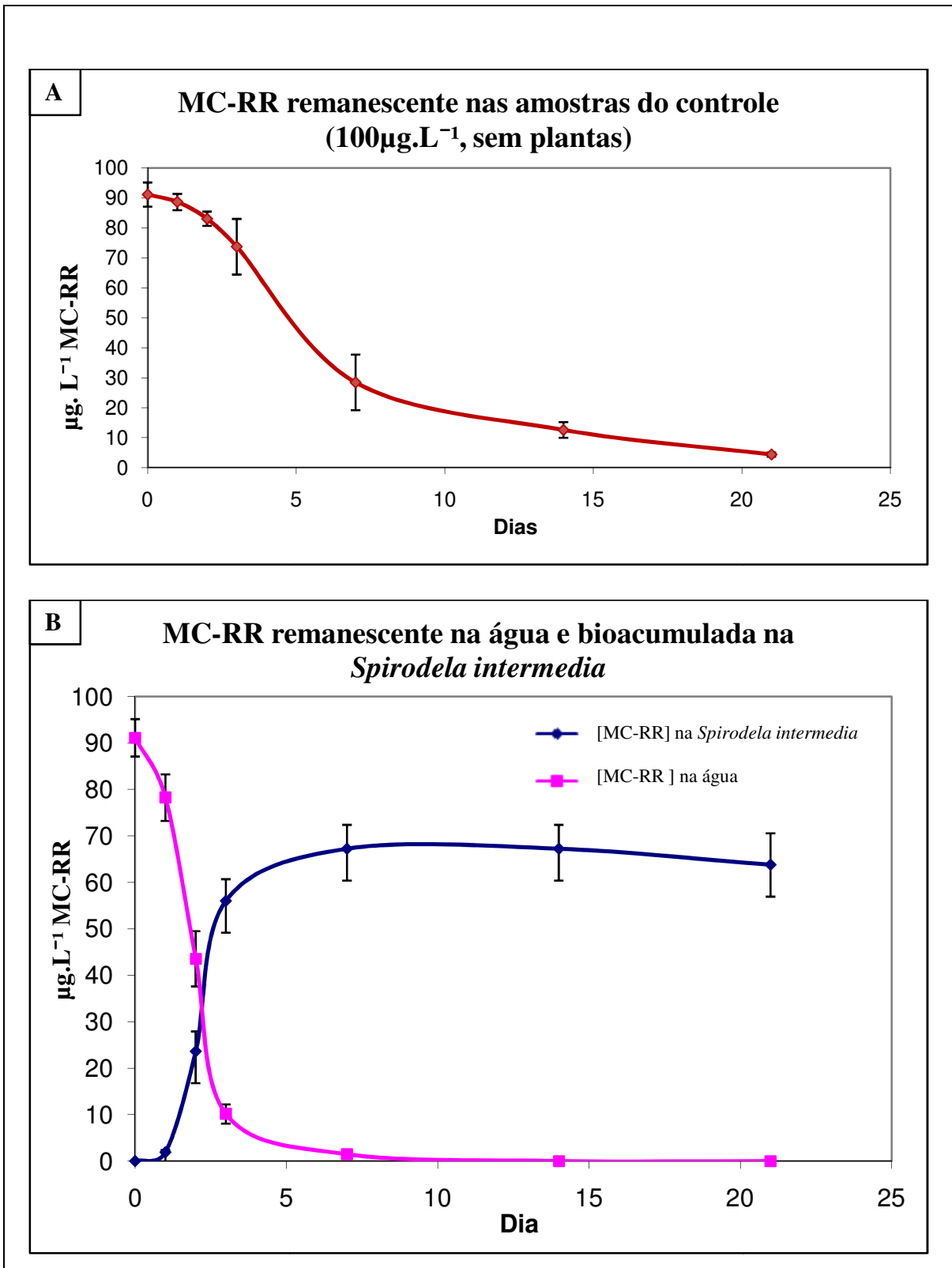


Figura 5- 9: A: Concentração da MC-RR nas amostras do controle (100µg.L⁻¹, sem plantas) após 21 dias de experimento. B: Concentração da MC-RR remanescente na água ■ e bioacumulada na *Spirodela intermedia* ◆ após 21 dias de exposição a 100µg.L⁻¹.

A diminuição na concentração de MC-RR observada nos grupos controle (Figura 5-8A e 5-9A) pode ser explicada pela ação de bactérias. No experimento que utilizou concentração de $10\mu\text{g.L}^{-1}$, após 21 dias foram detectadas $5,56\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR remanescente, ocorrendo uma redução de 44,4% na concentração. Onde foi utilizado concentração de $100\mu\text{g.L}^{-1}$, foram detectadas $4,37\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR remanescente, ocorrendo uma redução de 95,63% na concentração.

Microcistinas são quimicamente e fisicamente estáveis (HARADA, 1996), mas a degradação natural em águas por atividade microbiana foi descrita por vários autores (AMÉ *et al.*, 2006; HARADA *et al.*, 2004; ISHII *et al.*, 2004; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2001; BOURNE *et al.*, 1996). As microcistinas são oligopeptídeos. É provável que essas sejam usadas como fonte de carbono e nitrogênio pelas bactérias.

Quando a biodegradabilidade da MC foi experimentalmente testada, usando comunidade microbiana natural, a persistência das toxinas foi de dias, até várias semanas. Esta discrepância na duração deve-se às diferentes composições das bactérias, grau de adaptação, etc (AMÉ *et al.*, 2006). LAHTI *et al.*, (1998) testaram, em experimentos realizados no laboratório, a habilidade de um amplo número de bactérias isoladas a partir da água e do sedimento de um lago em degradar MCs. Apenas 17% deteve essa habilidade. Em AMÉ *et al.*, (2006) das três bactérias isoladas do reservatório de San Roque, (Córdoba, Argentina) apenas uma foi hábil em degradar a MC-RR. Várias bactérias foram isoladas e caracterizadas em diferentes corpos de água, sugerindo que a degradação de MCs por bactérias está distribuída em todo o mundo (WELKER *et al.*, 2001). Entretanto, o gênero *Sphingomonas* é frequentemente encontrado em água doce. Por exemplo, *Sphingomonas sp.* ACM 3962 foi isolada do lago Centenaty-Austrália (BOURNE *et al.*, 1996); *Sphingomonas sp.* Y2 foi isolada do lago Suwa-Japão (PARK *et al.*, 2001) e *Sphingomonas sp.* CBA4 foi isolada do reservatório de San Roque, (Córdoba, Argentina) (AMÉ *et al.*, 2006). SAITO *et al.*, (2003) identificaram o gene *mIra* como sendo o responsável pela degradação da MC, entretanto esse gene não é exclusivo do gênero *Sphingomonas*.

AMÉ *et al.*, (2006) propõem que o primeiro passo da degradação da MC-RR pelas *Sphingomonas sp.* seja através da desmetilação. Porém, infelizmente, os produtos da desmetilação mantêm a estrutura responsável pela toxicidade das MCs (SIVONEN & JONES, 1999).

A capacidade de eliminação da MC-RR pela macrófita aquática *Spirodela intermedia* foi avaliada pelo presente trabalho. As figuras 5-8B e 5-9B mostram que a espécie testada está apta a reduzir a concentração de MC-RR em uma razão maior do que a redução microbiana observada nos controle (Figuras 5-8A e 5-9A). *Spirodela intermedia* ($1\text{g}.0,1\text{L}^{-1}$) foi capaz de reduzir as concentrações de 10 e $100\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ a valores abaixo dos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para água potável ($1,0\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ MC-LR) em apenas 2 e 4 dias respectivamente, enquanto que a degradação causada apenas por bactérias (controle, sem plantas) não alcançou os níveis preconizados após os 21 dias do experimento.

Na recente VII Conferência Internacional sobre Cianobactérias Tóxicas realizada no estado do Rio de Janeiro em agosto de 2007, foram apresentados os resultados da utilização de macrófitas aquáticas na biofiltração de toxinas de cianobactérias no Lago Chaohu, China (NIMPTSCH *et al.*, 2007) .

O Lago *Chahohu* está localizado na província de Anhui, cerca de 400km a oeste de Shangai, sendo considerado um dos cinco maiores lagos de água doce do país, possuindo uma área de 780Km^2 . Em consequência das atividades antrópicas como agricultura e o desenvolvimento industrial, o aporte de nutrientes (P e N) tornaram o lago eutrófico. Principalmente nos meses de verão, massivas proliferações de cianobactérias potencialmente tóxicas ocorrem com frequência. As águas do lago são utilizadas com propósitos recreacionais, além de ser uma importante fonte de abastecimento para a população da cidade de Hefei (YANG *et al.*, 2006).

Como já foi falado anteriormente, cianotoxinas são extremamente estáveis na água devido a sua estrutura química, tolerando mudanças na temperatura e na composição química da água (HARADA, 1996), porém o processo usual de tratamento da água não é suficiente para remover as toxinas (SVRCEK & SMITH, 2004, DUY *et al.*, 2000). A proposta de NIMPTSCH *et al.*, (2008) é melhorar os tratamentos preliminares de água (antes de entrar nas estações de tratamento), aplicando o conceito de “fígado verde” através da utilização do potencial de bioacumulação de macrófitas aquáticas. O referido trabalho avaliou a capacidade de eliminação da MC-LR através da bioacumulação pelas seguintes macrófitas: *Hydrilla* sp., *Myriophyllum* sp. e *Lemna* sp.. Em uma escala piloto, a combinação dessas plantas foi capaz de reduzir concentração iniciais de $12,11\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ e $9,17\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ a valores abaixo dos recomendados pela OMS ($1,0\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ MC-LR) em apenas

três dias. NIMPTSCH *et al.*, (2008) consideram que seus primeiros resultados demonstraram que a utilização de macrófitas para eliminação de cianotoxinas é funcional, embora o monitoramento dos períodos vegetativos e a densidade das plantas precisem ser melhorados para aumentar a eficácia desse tipo de tratamento.

5.5.1 Bioacumulação da MC-RR pela *Spirodela intermedia*

A bioacumulação da MC-RR pela *Spirodela intermedia* é evidenciada nas figuras 5-8B e 5-9B. Após os 21 dias de experimento, foram detectados até $67,24\mu\text{g.g}^{-1}$ peso fresco (PF) nas amostras expostas a $100\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-RR. Nas expostas a $10\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-RR, foram detectados até $4,36\mu\text{g.g}^{-1}$ PF.

A absorção de MC-LR em plantas aquáticas foi bem investigada por PFLUGMACHER *et al.*, (1999 e 1998), onde macrófitas aquáticas como *Ceratophyllum demersum*, *Elodea Canadensis*, *Vesicularia dubyana* e *Phragmites australis* puderam fazer a absorção de MC-LR em uma escala de $1,0-120\text{pg.g}^{-1}$ PF. A absorção de *Lemna gibba* foi confirmada por SAQRANE *et al.*, (2007), onde uma exposição por 12 dias a $300\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC-LR equivalentes) resultou em uma absorção de MC-LR de $2,24\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (PS). Efeitos fisiológicos (crescimento, produção de oxigênio fotossintético e análises de pigmentos) em concentrações ambientais relevantes de MC-LR ($0,1-5,0\mu\text{g.L}^{-1}$) nas macrófitas aquáticas *C. demersum*, *E. canadensis*, *M. spicatum* e *P. australis* foram reportadas por PFLUGMACHER (2002). Os resultados mostraram que todas as plantas testadas sofreram efeitos negativos no crescimento, fotossistemas e pigmentos padrão, entretanto *M. spicatum* e *P. australis* apresentaram menor sensibilidade a MC-LR do que as outras espécies testadas (PFLUGMACHER, 2002). LEBLANC *et al.*, (2005) também testaram concentrações ambientalmente relevantes entre $0,1-10\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-LR na *Lemna gibba L.* e observaram a ausência de efeitos negativos no crescimento, número de frondes, biomassa e clorofila.

A influência de extratos tóxicos de cianobactérias no crescimento e na morfologia da plantas aquáticas *Spirodela oligorrhiza* foi comparada com MC-LR comercial (ROMANOWSKA-DUDA & TARCZYNSKA, 2002). Isto foi feito através da incubação durante 96 horas de exposição com altas concentrações de microcistinas ($0,344\text{mg.L}^{-1}$) de

extrato bruto, reduzindo em 50% a formação de frondes em relação ao controle. A redução do número de frondes também foi observada após 24 horas de exposição na presença de 0.2 e 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR comercial. Os resultados confirmam que a toxicidade de hepatoxinas de cianobactérias na *Spirodela oligorrhiza* pode ser usada como bioindicador (ROMANOWSKA-DUDA & TARCZYNSKA, 2002).

No trabalho de MITROVIC *et al.*, (2005), duas plantas aquáticas, *Lemna minor* e *Wolffia arrhiza* e uma alga filamentosa *Chladophora fracta*, foram expostas a MC-LR. O crescimento da *L. minor* (o peso e o número de frondes) e o comprimento da raiz foram significativamente reduzidas e a atividade da peroxidase foi aumentada depois de 5 dias de exposição a concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MC-LR. O crescimento da *W. arrhiza* (número de fronde) foi significativamente reduzido depois de 5 dias de exposição a 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MC-LR. O crescimento e a atividade da peroxidase da *C. fracta* não foram afetadas por concentrações até 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MC-LR. Além disso, a *L. minor* acumulou MC-LR até concentrações de 0, 288 \pm 0.009 ng.mg^{-1} PS durante os 5 dias de experimento, equivalente a uma taxa de acumulação de 0.058 ng.mg^{-1} dia $^{-1}$. A *C. fracta* acumulou MC-LR até concentrações de 0, 042 \pm 0.015 ng.mg^{-1} PF durante os 5 dias de experimento, equivalente a uma taxa de acumulação de 0.008 ng.mg^{-1} dia $^{-1}$ (MITROVIC *et al.*, 2005).

WEIß *et al.*, (2000) mostraram que microcistina- RR em concentrações na escala de 100-1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-RR, não teve efeitos significativos no fotossistema da *Lemna minor* L., enquanto altas concentrações (3000-5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-RR) inibiram o fotossistema. Reforçando os resultados de WEISS *et al.*, (2000) onde a exposição a 3 $\mu\text{gMC-RR.mL}^{-1}$ inibiram o crescimento e diminuíram a clorofila da *L. minor*. YIN *et al.*, (2005) demonstraram que MC-RR pode ser acumulada diferentemente em raízes e folhas da *Vallisneria natans*. Além disso, foi reportado que a acumulação de toxina em raízes e folhas das plantas foi tempo e concentração dependente, com maior acumulação nas raízes do que nas folhas. Quando a planta aquática *V. natans* foi exposta a 10 mgMC-RR.L^{-1} por 16 dias, a MC-RR acumulada foi de 0,3 $\mu\text{gMC-LR}_{\text{equivalentes.g}^{-1}}$ nas folhas e 14,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ nas raízes (YIN *et al.*, 2005).

5.5.2 Metabolização da MC-RR pela *Spirodela intermedia*

Similar aos animais, plantas também metabolizam compostos orgânicos estranhos (xenobióticos) com diferentes tipos de sistemas enzimáticos de desintoxicação. O processo de desintoxicação está dividido em três etapas: transformação, principalmente por oxidação e hidrólise (fase I), seguida por conjugação (fase II) associado à compartimentação interna e processos de armazenamento (fase III) (SANDERMANN, 1994).

A habilidade natural das plantas em se desintoxicar, livrando-se de substâncias tóxicas (moléculas xenobióticas) foi modelada no conceito referido como fígado verde “Green Liver” (COLEMAN *et al.*, 1997; SANDERMANN, 1994, 1992). Sendo realizado através de quatro passos sequenciais. Na fase I, moléculas perigosas ativam etilhidrolases ou oxidases, por exemplo citocromo P-450 oxidase. Essa ativação resulta na introdução dos grupos funcional carboxila ou hidroxila ou na exposição a grupos semelhantes. Moléculas ativadas são melhores avaliadas para os próximos passos do processo de desintoxicação. Na fase II essas são conjugadas a moléculas extremamente polares, tais como glicose, malonato, sulfatos ou glutathiona. Esta conjugação é catalizada por famílias enzimáticas como por exemplo glicosiltransferases ou glutathiona S-transferases. A introdução de glicose ou glutathiona às substâncias xenobióticas induz mudanças em suas propriedades físico-químicas que, com frequência, reduzem a sua toxicidade. Na fase III, a molécula de conjugado é exportada por transportadores energeticamente dependentes, específicos do citosol, para vacúolos ou para cloroplastos. Exemplos destes transportadores são MRPs (multi-drug-resistance-associated-proteins) que são membros da superfamília de transportadores ABC (ATP-binding-cassette) (KOLUKISA OGLU *et al.*, 2002). A fase IV inclui todos os demais possíveis processos, incluindo degradação e reações de reciclagem. Para alguns compostos, nos processos finais de desintoxicação ocorre a compartimentação (fase III).

Glutathiona (GSH) é um tripeptídeo glutamil-cisteínil-glicina contendo grupos sulfidril que são muito reativos (RENNENBERG, 1982). GSH é sintetizada a partir de glutamato, cisteína e glicina em duas reações ATP-dependente catalizadas pela glutamilcisteína sintase e glutathiona sintase. Estas enzimas estão presentes no citosol e nos cloroplastos. GSH representa a mais importante não-proteica tiol presente nas células das plantas, e sua forma de armazenamento é através da redução do enxofre (HELL, 1997). A

concentração da GSH foi estimada em torno de 300 e 1300nmol.g⁻¹ PF na maioria dos tecidos (SCHNUG *et al.*, 1995). Além do seu papel de composto central no metabolismo do enxofre, GSH possui vários e importantes papéis tais como: antioxidantes diretos, regeneração de ascorbato, proteção por redução e como precursor de fitoquímicos (NOCTOR & FOYER, 1998).

Fitoquímicos são pequenos peptídeos formados por repetição de glutamil-cisteínil usados pelas plantas como quelante na desintoxicação por metais pesados (COBBETT & GOLDSBROUGH, 2002). A alta reatividade e solubilidade em água da GSH fazem desta, uma molécula ideal para proteger as plantas contra várias perturbações incluindo stress oxidativo, moléculas xenobióticas e metais pesados (XIANG *et al.*, 2001).

Macrófitas aquáticas são conhecidas por acumular (PFLUGMACHER *et al.*, 1999) e metabolizar as microcistinas via biotransformação através da conjugação com a GSH mediada pela glutathione S-transferase (PFLUGMACHER *et al.*, 2001; PFLUGMACHER *et al.*, 1998).

A presente investigação mostrou que a *Spirodela intermedia* está apta a absorver, bioacumular e metabolizar a microcistina-RR, levando à formação de conjugados de glutathione e cisteína.

Os conjugados de cisteína com MC-RR (MC-RR-CYS, *m/z* 1158,6) e glutathione com MC-RR (MC-RR-GSH, *m/z* 1345,3) foram detectados na análise no espectrômetro de massas (Figura 5-10B) das amostras de *Spirodela intermedia*, após 21 dias de exposição a 100µg.L⁻¹ de MC-RR. A ausência desses picos é observada no cromatograma (Figura 5-10A) da amostra controle.

É conhecido que a MC-LR pode se conjugar com a GSH, e na etapa final da degradação, é conjugado com a cisteína (MC-LR-Cys); esse composto vai neutralizar os sítios eletrofílicos da MC-LR, aumentando a sua solubilidade em água, conseqüentemente diminuindo a toxicidade e melhorando a excreção da MC-LR (KONDO *et al.*, 1992). Isso é comprovado por trabalhos que encontraram os conjugados de microcistinas com cisteínas em rins de camundongos (ITO *et al.*, 2002, KONDO *et al.*, 1996), além disso CHEN *et al.*, (2007) detectaram esses conjugados nos rins de todas as 20 amostras de peixes (*Aristichthys nobilis*) do Lago Taihu, China.

Resultados e Discussão

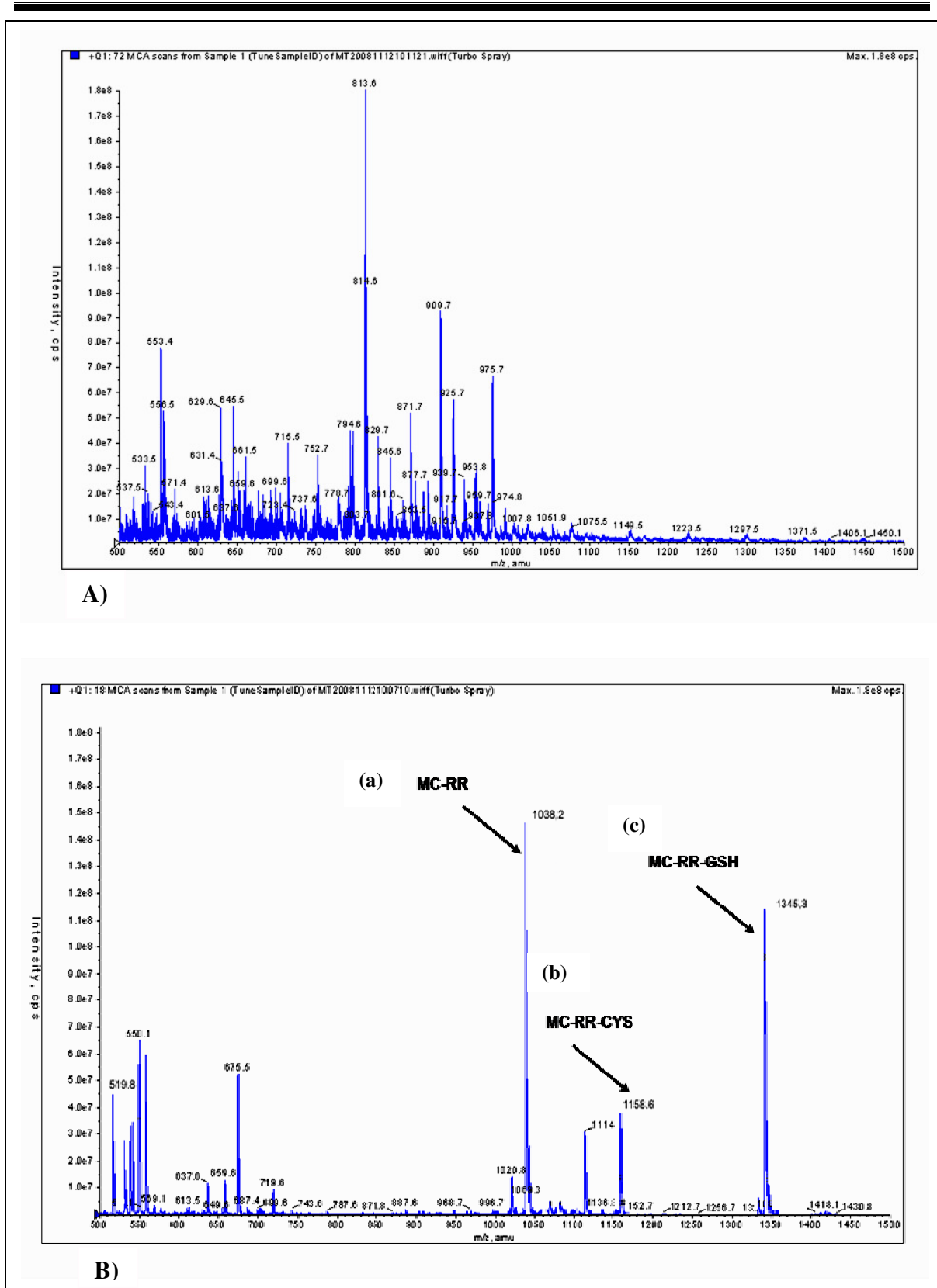


Figura 5- 10: Determinação da massa dos picos de uma amostra controle de *Spirodela intermedia* (A- não exposta a MC-RR) e dos picos de uma amostra de *Spirodela intermedia* que foi exposta 21 dias a MC-RR (B). (a) m/z 1038,2 corresponde a MC-RR; (b) m/z 1158,6 corresponde a MC-RR-CYS e (c) m/z 1345,3 corresponde a MC-RR-GSH.

O metabolismo da MC-RR na *S.intermedia* parece ser similar ao da MC-LR na *Phragmites australis*, onde ocorreu a formação do conjugado de glutathiona através da atividade da glutathiona S-transferase (PFLUGMACHER *et al.*, 2001). Além disso, no presente estudo, que pela primeira vez utiliza a MC-RR, a formação do conjugado de glutathiona com MC-RR foi visto na *S. intermedia*, além da subsequente degradação deste metabólito em porções glicina pela atividade da carboxipeptidase, responsável pela clivagem em porções glicina (PFLUGMACHER *et al.*, 2001). Assim este caminho parece mesmo ser geral em plantas aquáticas e pode se aplicar também em diferentes microcistinas semelhante ao mostrado pela MC-LR e MC-RR.

Através de experimentos *in vitro*, conjugados de GSH foram detectados em macrófitas (*Ceratophyllum demersum*), invertebrados (*Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*), ovos de peixes e peixes (*Danio rerio*) (PFLUGMACHER *et al.*, 1998).

Em PFLUGMACHER (2002) a hipótese para a possível reação, após a absorção da MC-LR nas células das plantas, está mostrada na figura 5-11.

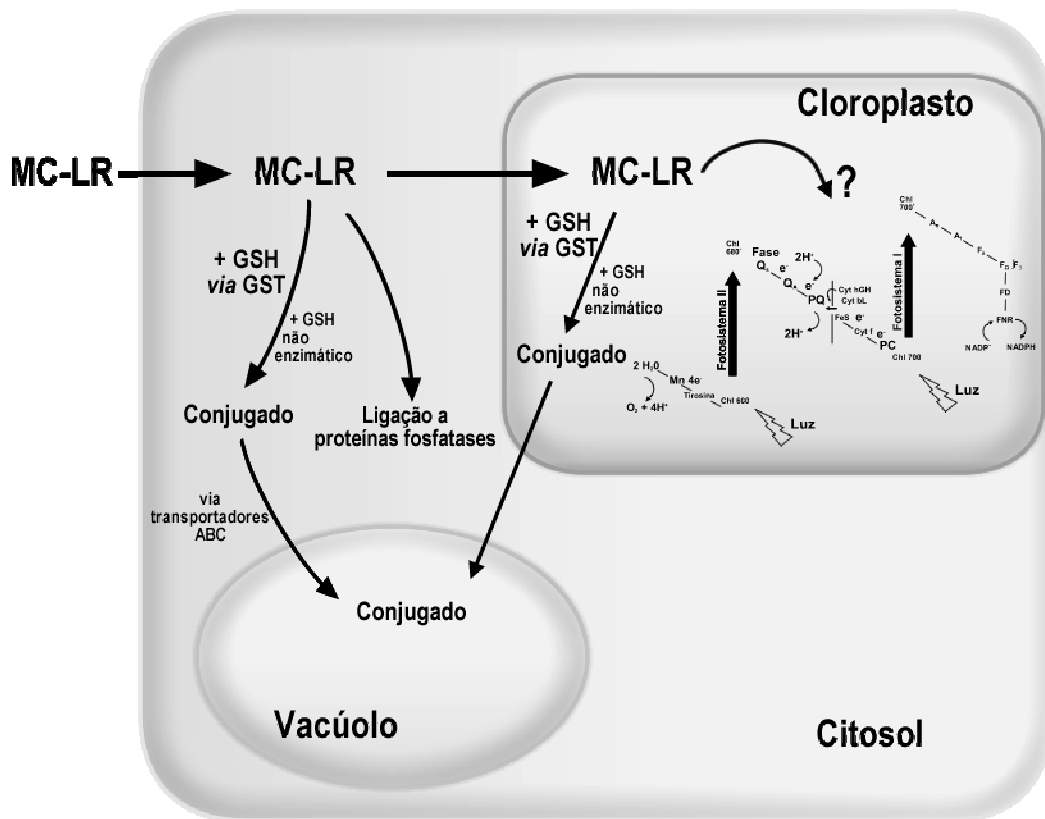


Figura 5- 11: Hipótese dos possíveis caminhos após a absorção da MC-LR pela planta

(Adaptado de PFLUGMACHER, 2002).

Depois da absorção, certa quantidade de MC-LR (menos que 10%) irá formar um conjugado não enzimático com a GSH. A segunda quantidade irá formar um conjugado com a GSH via sistema glutathione S-transferase (PFLUGMACHER *et al.*, 2001, 1998). Uma parte restante de MC-LR vai se ligar a proteínas fosfatase (MACKINTOSH *et al.*, 1990) e possivelmente a outras proteínas celulares. Finalmente, algumas MC-LR remanescentes são absorvidas pelo cloroplasto. No cloroplasto, três possíveis caminhos foram postulados: conjugado não enzimático com a GSH, conjugado enzimático GSH via sistema GST e reações com proteínas ou estruturas do aparelho fotossintético do cloroplasto, resultando na detecção de fatores inibitórios. Para remover os conjugados GSH, as plantas os transferem para o vacúolo via MRPs “multi-drug-resistant-associated proteins” que faz parte da família do ABC-transportadores, para armazenamentos preliminares e futuros processos com o conjugado GSH (WALBOT *et al.*, 2000; COLEMAN *et al.*, 1997; MARTINOIA *et al.*, 1993).

6 Conclusão

A análise qualitativa da floração de cianobactérias observada na Lagoa do Gambá mostrou a dominância da espécie *Microcystis novacekii*. As análises toxicológicas demonstraram a ausência de produção de toxinas pela espécie.

O cultivo da *Microcystis protocystis*, a extração e a purificação da toxina foram realizados com êxito.

A *Spirodela intermedia* adaptou-se às condições de cultivo empregadas, produzindo biomassa suficiente para a realização dos experimentos.

Neste estudo, que pela primeira vez utiliza a MC-RR, a formação do conjugado de glutationa com MC-RR foi visto na *S. intermedia*, bem como a subsequente degradação deste metabólito em conjugados de cisteína. Assim este caminho parece mesmo ser geral em plantas aquáticas e pode se aplicar também em diferentes microcistinas semelhante ao mostrado pela MC-RR.

A biomassa de macrófitas aplicada foi hábil em reduzir as concentrações iniciais de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\mu\text{g.L}^{-1}$ a valores abaixo do recomendado pela OMS para água potável, $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$, em 2 e 4 dias respectivamente. Conclui-se que a absorção, acumulação e metabolismo da microcistina-RR por plantas aquáticas flutuantes aumentam as possibilidades do uso destas plantas na purificação de água com remoção de toxinas e acarretam em futuras implicações no ecossistema aquático e na transferência da toxina na cadeia alimentar.

7 Perspectivas

1. Como consequência da incidência de florações de cianobactérias na Lagoa, outras vezes mais intensas do que a observada em julho de 2007, torna-se altamente desejável a necessidade do monitoramento regular da mesma, ainda com o acompanhamento e a identificação do fitoplâncton associada com outros dados limnológicos que não estiveram incluídos no objetivo deste trabalho.
2. Para a comprovação da ausência de toxicidade da cepa de *Microcystis novacekii*, isolada na lagoa do Gambá, estudos de biologia molecular são necessários para o seqüenciamento e pesquisa da presença dos genes característicos de cepas tóxicas.
3. Como no ambiente, na maioria dos casos, mais de uma variante de toxina pode estar presente nas florações, é necessário ver a absorção diferencial de uma mistura de variantes de microcistina.
4. Para estimar a captação de toxinas naturais dentro de uma floração, é necessário utilizar materiais que simulem as ocorrências naturais.
5. Outras espécies da família *Lemnaceae* deverão ser testadas para ver diferentes possibilidades de captação.

8 Referências

- A.P.H.A. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington, APHA/WEF/AWWA.* (2005).
- AGUJARO, L. F., CANTUSIO, R. N., GENUÁRIO, D. B., FIORE, M. F., & ISAAC, R. L. Occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins in the Salto Grande reservoir, SP, Brazil: Toxicity and recreational water use area. *VII International Conference on Toxic Cyanobacterial. Rio de Janeiro state .* (2007).
- AMÉ, M. V., ECHENIQUE, J. R., PFLUGMACHER, S., & WUNDERLIN, D. A. Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba- Argentina). *Biodegradation* , 17, pp. 447-455. (2006).
- AMORIN, A., & VASCONCELOS, V. Dynamics of microcystin in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* , 37, pp. 1041-1052. (1999).
- ANDREOLI, C. V., & CARNEIRO, C. *Gestão Integrada de Mananciais de abastecimentos Eutrofizados*. Curitiba: Sanepar. (2005).
- ANJOS, F. M., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., ZAJAC, M. P., HILLER, S., CHRISTIAN, B., ERLER, K. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon* , 48, pp. 239-245. (2006).
- APELDOORN, M. E., EGMOND, H. P., SPEIJERS, G. J., & BAKKER, G. J. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* , 51, pp. 7-60. (2007).
- AZEVEDO, S. M. F.O, EVANS, W. R., CARMICHAEL, W., & NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of applied phycology* , 6, pp. 261-265. (1994).
- AZEVEDO, S.M. F.O. Effects of toxic Cyanobacteria on environmental quality and human health in Brazil. *International Conference on Toxic Cyanobacteria*. Beaufort, NC. USA. (1998).

-
- AZEVEDO, S. M.F.O, CARMICHAEL, W., JOCHIMSEN, E. M., RINEHART, K. L., LAU, S., SHAW, G. R., AZEVEDO, S.M.F.O., CAR Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* , 182, pp. 441-446. (2002).
- BEYRUTH, Z., SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T., CARVALHO, M. C., & PEREIRA, H. A. Toxic algae in freshwaters of São Paulo State. In: M. CORDEIRO-MARINHO, M. T. AZEVEDO, C. L. SANT'ANNA, N. Y. TOMITA, & E. M. PLASTINO, *Algae and Environment: a general approach*. (pp. 53-64). SBFic/CETESB. (1992).
- BEZERRA, T. P., SILVA, C. P., & LOPES, J. P. Utilização da macrófita aquática *Egeria densa* PLANCHON, 1849 (Hydrocharitacea) na produção de tijolos para a construção civil. *Revista Brasileira de Engenharia Pesca, Maranhão* , 2 (1), pp. 113-127. (2007).
- BINA, B., & GIANI, A. Growth and toxin production of *Microcystis panniformis* and *Anabaena circinalis* under different environmental conditions. *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. Rio de Janeiro state* . (2007).
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae* , 2 (1), pp. 51-60. (2003).
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., KUJBIDA, P., CARDOZO, K., CARVALHO, V., MOURA, A., COLEPÍCOLO, P. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komarek et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 326 (3), pp. 687-694. (2005).
- BLOM, J. F., ROBINSON, J. A., & JUTTNER, F. High grazer toxicity of [D-Asp(3) (E)-Dhb (7)] microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* , 39, pp. 1923-1932. (2001).
- BORGES, D. V. Ficoflórula da Lagoa do Manso (Parque Estadual do Itacolomi) e da Lagoa do Gambá, Ouro Preto-MG: uma análise comparativa. *Ouro Preto, UFOP, (Monografia)* . , p. 36. (2006).
- BOURNE, D. G., JONES, G. J., BLAKELEY, R. L., JONES, A., NEGRI, A. P., & RIDDLES, P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl. Environ. Microbiol* , 62, pp. 4086-4094. (1996).

BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce initiation à la systématique, 2: les algues jaunes et brunes, les Crysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées. *Éditions N. Boubée*, 2. (1968).

BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce: initiation à la systématique, 1: les algues vertes. *Éditions N. Boubée*, 1. (1972).

BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce: initiation à la systématique, 3: les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. *Paris, Éditions Boubée*, 3. (1985).

BRANCO, S. M. Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária. *São Paulo: Companhia de Saneamento Ambiental*, p. 620. (1978).

BRASIL. Portaria nº518 de 25 de Março de 2004. Brasília: Ministério da Saúde. (2004).

BRIAND, J. F., LÉBOULANGER, C., & HUMBERT, J. F. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming. *J Phycol*, 40, pp. 231-238. (2004).

BUCH, M. D. Effective doses, guidelines & regulations. *Adv Exp Med Biol*, 53, pp. 619-831. (2008)

CALIJURI, M. C., ALVES, M. S., & SANTOS, A. C. *Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais*. São Carlos: RiMa. (2006).

CAMARGO, A. F., PEZZATO, M. M., HENRY-SILVA, G. G., & ASSUMPTÃO, A. M. Primary production of *Utricularia foliosa* L., *Egeria densa* planchon and *Cabomba furcata* schult & schult from rivers of the coastal plain of the State of São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia, Netherlands*, 570 (13), pp. 35–39. (2006).

CAMARGO-SANTOS, D., & FERNANDES, V. O. First report of a non-visible bloom of *Pseudanabaena catenata* Lauterborn in an artificial lagoon from Espírito Santo state, Brazil (UFES Lagoon, Vitória). *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. Rio de Janeiro state*. (2007).

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, pp. 445-459. (1992).

CARMICHAEL, W. W., & LI, R. Cyanobacterial toxins in the Salton Sea. *Saline Systems* , 19, pp. 2-5. (2006).

CARVALHO, P. V., OLIVEIRA, M. S., SILVA, J. D., COSTA, A. N., & BOTTER-CARVALHO, M. L. Cyanobacterial blooms in water supply reservoirs of Pernambuco state: interannual differences. *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. Rio de Janeiro state* . (2007).

CETESB, N. *Teste para avaliação de toxicidade aguda de cianobactérias - método de ensaio. São Paulo*. (1993).

CHEN, J., SONG, L., DAI, J., GAN, N., & LIU, Z. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* , 43 (4), pp. 393-400. (2004).

CHEN, J., & XIE, P. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology* , 20, pp. 572-584. (2005).

CHEN, J., XIE, P., ZHANG, D., & LEI, H. In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish - bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental Pollution* , 147, pp. 150-157. (2007).

CHORUS, I., & BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: World Health Organization. (1999).

CHRISTOFFERSEN, K., LYCK, S., & WINDING, A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* , 27, pp. 125-136. (2002).

COBBETT, C., & GOLDSBROUGH, P. Phytochelations and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* , 53, pp. 159-182. (2002).

COELHO-BOTELHO, M.J. Dinâmica da comunidade zooplancônica e sua relação com grau de trofia em reservatórios. *CETESB*, 2004

-
- COLEMAN, J. O., BLAKE-KALFF, M. M., & DAVIES, T. G. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* , 2, pp. 144-151. (1997).
- CONAMA, C. N. *Resolução N°357 de 17 de Março de 2005*. Brasília. (2005).
- CODD, G. A. *Water Sci. Technol.* 32. pp. 149-156. (1995).
- COOD, G. A., METCALF, J. S., & BEATTIE, K. A. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacterial. *Toxicon* , 37, pp. 1181-1185. (1999).
- COOK, C. D. *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publishers, The Hague . (1990).
- COPASA, M. G. *Norma Técnica n° T 126. Coleta de Amostra de Águas para Análise Hidrobiológica*. (1992).
- COSSU, R., HAARSTAD, K., LAVAGNOLO, M. C., & LITTARRU, P. Removal of municipal solid waste COD and NH-N by phyto-reduction: A laboratory-scale comparison of terrestrial and aquatic species at different organic loads. *Ecological Engineering* , 16, pp. 459-470. (2001).
- COSTA, I. A., AZEVEDO, S. M., SENNA, P. A., BERNARDO, R. R., COSTA, S. M., & CHELLAPPA, N. T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.* , 66 (1B), pp. 211-219. (2006).
- DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. *Toxicon* , 36 (7), pp. 953-962. (1998).
- DELAZARI-BARROSO, A., HUSZAR, V. L., & AZEVEDO, S. M. Dynamics of a phytoplankton community dominated by desmids and cyanobacteria in a tropical reservoir (Southeastern Brazil). *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria*. Rio de Janeiro . (2007).
- DI BERNARDO, L. Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento. *ABES.Rio de Janeiro* , p. 140. (1995).
- DUY, T. N., LAM, P. K., SHAW, G. R., & CONNELL, D. W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in Water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* , 163, pp. 113-185. (2000).

ENGLER, A. Vergleichende Untersuchungen über die morphologischen Verhältnisse der Araceae. *Nov. Acta. Acad. Caesar. Leop. Carol* , 39, pp. 159-232. (1877).

ERIKSSON, J. E., GRÖNBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J. P., & MERILUOTO, J. A. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica Biophysica Acta* , 1025 (1), pp. 60-66. (1990).

FALCONER, I., RUNNEGAR, M., BUCKLEY, T., HUYN, V., & BRADSHAW, P. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *J. Am. Water Works Assoc* , 81, pp. 102-105. (1989).

FALCONER, I. R., BURCH, M. D., STEFFENSEN, A. D., CHOICE, M., & COVERDALE, B. R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environmental Toxicology and Water Quality* , 9 (2), pp. 131-139. (1994).

FASTNER, J., FLIEGER, I., & NEUMANN, U. Optimised extraction of microcystins from field samples – a comparison of different solvents and procedures. *Technical Note. Wat. Res.* 32 , 10, pp. 3117-3181. (1998).

FICHER, W.J., ALTHEIMER, S., CATTORI, V., MEIER, P.J., DIETRICH, D.R., HAGENBUCH, B. Organic ion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203 (3), pp. 257-263. (2005).

FRANGEZ, R., ZUZEK, M. C., MRKUN, J., SUPUT, D., SEDMAK, B., & KOSEC, M. Microcystin-LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells in vitro. *Toxicon* , 41 (8), pp. 999-1005. (2003).

GOMES, L. N., JUNGBLUT, A. D., GIANI, A., SPERLING, E., & NEILAN, B. A. Investigation of microcystin genotypes in a cyanobacteria population: case study of Vargem das Flores, Brazil. *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. Rio de Janeiro state* . (2007).

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T., & KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). pp. 15, 796-804. (1964).

-
- GRUTZMACHER, G., BOTTCHEER, G., CHORUS, I., & BARTEL, H. Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environ Toxicol* , 17, pp. 386-394. (2002).
- GUPTA, N., PANT, S. C., VIJAYARAGHAVAN, R., & RAO, P. V. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* , 188, pp. 285-296. (2003).
- HARADA, K. i. Chemistry and detection of microcystins. In: M. F. WATANABE, k. -i. HARADA, W. W. CARMICHAEL, & H. FUJIKI, *Toxic Microcystis* (pp. 103-148). CRC Press, Boca Raton, FL. (1996).
- HARADA, K. i., IMANISHI, S., KATO, H., MIZUNO, M., ITO, E., & TSUJI, K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon* , 44, pp. 107-109. (2004).
- HELL, R. Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* , 202, pp. 138-148. (1997).
- HENRY-SILVA, G. G., & CAMARGO, A. F. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. *Acta Scientiarum, Maringá* , 24 (2), pp. 519-526. (2002).
- HENRY-SILVA, G. G., & CAMARGO, A. F. Efficiency of aquatic macrophytes to treat Nile tilapia pond effluents. *Scientia Agricola, Piracicaba* , 63 (5), pp. 433-438. (2006).
- HILLMAN, W. S. The Lemnaceae, or duckweeds. *Bot. Rev.* , 27, pp. 221-287. (1961).
- HINDÁK, F. Three planktonic cyanophytes producing water blooms in Western Slovakia. *Czech Phycology Olomouc* , 6, pp. 59-67. (2006).
- HOAGLAND, D. R., & ARNON, D. I. *The water culture method for growing plants without soils*. California Agricultural Experimental Station. (1950).
- HOEGER, S. J., HITZFELD, B. C., & DIETRICH, D. R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicol Appl Pharm* , 203, pp. 231-242. (2005).

-
- ISHII, H., NISHIJIMA, M., & ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Res* , pp. 2667-2676. (2004).
- ITO, E., KONDO, F., & HARADA, K. I. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon* , 38, pp. 37-48. (2000).
- ITO, E., TAKAI, A., KONDO, F., MASUI, H., IMANISHI, S., & HARADA, K. I. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of micorcystins and related compounds. *Toxicon* , 40, pp. 1017-1025. (2002).
- JARDIM, F. A., MOREIRA, A. A., BRAGA, J. M., & AZEVEDO, S. F. Avaliação preliminar da ocorrência e toxicidade de cianobactérias em amostras de seston. *20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Rio de Janeiro.* (1999).
- JARDIM, F. A., MOREIRA, A. A., VIANA, T. H., LADEIA, M. M., & VIANNA, L. N.. Detecção de toxicidade em cianobactérias como ferramenta para o monitoramento e tomada de decisões no sistema de tratamento de água de Montes Claros – MG. *XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. João Pessoa. PB.* (2001a)
- JARDIM, F. A., ROLLA, M. E., VIANNA, L. N., & AZEVEDO, S. M. Primeira detecção de cianobactérias tóxicas em uma represa da CEMIG - São Simão-MG/GO. *VIII Congresso Brasileiro de Limnologia -João Pessoa-PB.* (2001b).
- JARDIM, F. A., & VIANA, T. H. Análise de Algas – Cianobactérias e Cianotoxinas como parâmetros de controle do tratamento da água para abastecimento. *Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Joinville, SC.* (2003).
- JARDIM, F. A., RESENDE, R. M., LADEIA, M. M., GIANI, A., CERQUEIRA, D. A., & JARDIM, B. F. Cyanobacteria blooms in waters of river intake areas in Minas Gerais-Brazil, during the dry season of 2007-Contingency Plants. *Simpósio Ítalo-Brasiliro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 9. Florença (Itália): ANDIS.* (2008).
- JEDICKE, A., FURCH, B., SAINT-PAUL, U., & SCHLÜTER, U. B. Increase in the oxygen concentrations in Amazon waters resulting from the root exudation of two notorious water plants, *Eichornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae). *Amazoniana, Kiel* , 11 (1), pp. 53-69. (1989).

-
- JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAEL, W. W., AN, J. S., CARDO, D. M., COOKSON, S. T., HOLMES, C. E. Liver failure and death following exposure to microcystins toxins at a hemodialysis Center in Brazil. *The New England Journal of Medicine* , 338, pp. 873-888. (1998).
- JURCZAK, T., TARCZYNSKA, M., IZYDORCZYK, K., MANKIEWICZ, J., ZALEWSKI, M., & MERILUOTO, J. Elimination of microcystins by water treatment processes-examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Res* , 39, pp. 2394-2406. (2005).
- KAEBERNICK, M., NEILAN, B. A., BÖRNER, T., & DITTMANN, E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol* , 66, pp. 3387-3392. (2000).
- KAEBERMICK, M., & NEILAN, B. A.. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol* , 35, pp. 1-9. (2001)
- KLEIN, V. L., & AMARAL, F. C. Plantas daninhas aquáticas flutuantes. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte* , 13 (150), pp. 35-43. (1988).
- KOLUKISA OGLU, H. U., BOVET, L., KLEIN, M., EGGMANN, T., GEISLER, M., WANKE, D. Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* , 216, pp. 107-119. (2002).
- KOMÁREK, J., & ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. *Süßwasserfl, Mitteleuropa* , 19. (1998).
- KONDO, F., IKAI, Y., OKA, H., OKUMURA, M., ISHIKAWA, N., HARADA, K. I. Formation, characterization and toxicity of glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology* , 5, pp. 591-596. (1992).
- KONDO, F., MATSUMOTO, H., YAMADA, S., ISHIKAWA, N., ITO, E., NAGATA, S. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo mouse and rat livers. *Chemical Research in Toxicology* , 9, pp. 1355-1359. (1996).
- KÖRNER, S., & NICKLISCH, A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *J. Phycol.* , 38, pp. 862-871. (2002).

KRISHNAMURTHY, T., CARMICHAEL, W. W., & SARVER, E. W. Toxic peptides from freshwater Cyanobacteria (blue-green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. pp. n.9, 865-873. (1986).

KUIPER-GOODMAN, T., GUPTA, S., CAOMBLEY, H., & THOMAS, B. H. Microcystins in drinking water: risk assessment and derivation of a possible guidance value for drinking water. In: *Proceeding of Toxic Cyanobacteria: Current Status of Research and Management* (pp. 67-73). Adelaide: Australian Centre for Water Quality Reserch. (1994).

KUJBIDA, P., HATANAKA, E., CAMPA, A., COLEPICOLO, P., & PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and Biophysical Reserch* , 341 (1), pp. 273-277. (2006).

LAHTI, K., NIEMI, M. R., RAPALA, J., & SIVONEN, K. Biodegradation of cyanobacterial hepatotoxins-characterization of toxin degrading bacteria. In: B. REGUERA, J. BLANCO, M. L. FERNANDEZ, & T. WYATT, *Harmfull Algae* (pp. 363-365). Xunta de Galicia and Intergovernmental Ocennographic Commission of UNESCO, Paris. (1998).

LANDOLT, E. Key to the determination of taxa within the family of Lemnaceae. *Veröff. geobot. Inst.* , 70, pp. 13-21. (1980).

LANDOLT, E. Distribution of the family Lemnaceae in North Carolina. *Veröff. geobot. Inst.* , 77, pp. 112-148. (1981).

LANDOLT, E. Biosystematic invertigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) - The family of Lemnaceae - a monographic study. pp. 71:1-566. (1986).

LAWTON, L. A., & EDWARDS, C. Purification of microcystins. *Journal of Chromatography A* , 912 (2), pp. 191-209. (2001).

LEBLANC, S., PICK, F. R., & ARANDA-RODRIGUEZ, R. Allelopathic Effects of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on Duckweed, *Lemna gibba* L. *Environ Toxicol* , pp. 67-73. (2005).

-
- LEHTIMAKI, J., SIVONEN, K., LUUKKAINEM, R., & NIEMELA, S. I. The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia atrains*. *Arch Hydrobiol* , 130, pp. 269-282. (1994).
- LENZI, E., LUCHESE, E. B., & LIMA, S. B. Otimização da utilização de *Eichornia crassipes*-aguapé-na despoluição de soluções contaminadas com cromo. *Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba* , 37 (3), pp. 603-609. (1994).
- LEWIS, M. A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environ Pollut* , 87, pp. 319-336. (1994).
- MACKINTOSH, C., BEATTIE, K., KLUMPP, S., COHEN, P., & CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS* , pp. 187-192. (1990).
- MAGALHÃES, V. F., & AZEVEDO, S. M. Ecological implications of hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in Jacarepaguá Lagoon. In: B. REGUERA, J. BLANCO, M. L. FERNANDEZ, & T. WYATT, *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful* (pp. 26-28). Vigo, Espanha. (1998).
- MAGALHÃES, V. F., SOARES, R. M., & AZEVEDO, S. M. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* , 39, pp. 1077-1085. (2001).
- MAGALHÃES, V. F., MARINHO, M. M., DOMINGOS, P., OLIVEIRA, A. C., COSTA, S. M., AZEVEDO, L. O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* , 42, pp. 289-295. (2003).
- MARTINOIA, E., GRILL, E., TOMMASINI, R., KREUZ, K., & AMRHEIN, N. ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* , 364, pp. 247-249. (1993).
- MATTHIENSEN, A., YUNES, J. S., & CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no Estuário na Lagoa dos Patos, RS. *Rev. Brasil. Biol.* , 59 (3), pp. 361-376. (1999).

McELHINEY, J., LAWTON, L. A., & LEIFERT, C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* , 39, pp. 1411-1420. (2001).

MERILUOTO, J. A., NIGARD, S. E., DAHLEM, A. M., & ERIKSSON, J. E. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon* , 28 (12), pp. 1439-1446. (1990).

MERILUOTO, J., & CODD, G. *Toxic cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*, 65 (1). (2006).

METCALF, J. S., BEATTIE, K. A., PFLUGMACHER, S., & CODD, G. A. Immunocrossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiology Letters* , 189 (2), pp. 155-158. (2000).

MITROVIC, S. M., PFLUGMACHER, S., JAMES, K. J., & FUREY, A. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquatic Toxicology* , 68, pp. 185-192. (2004).

MITROVIC, S. M., ALLIS, O., FUREY, A., & JAMES, K. J. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 61, pp. 345-352. (2005).

MOLICA, R. J., OLIVEIRA, E. J., CARVALHO, P. V., COSTA, A. N., CUNHA, M. C., MELO, G. L. Occurrence of saxitoxins and an-anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* , 4, pp. 743-753. (2005).

MOREIRA, C. Q. *Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica*. 155p. Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Universidade Federal de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia. São Paulo. (2007).

-
- NASCIMENTO, E. L., GOMES, A. M., BASTOS, W. R., AZEVEDO, S. M., & MIYAI, R. K. Occurrence of toxic *Microcystis* blooms in Samuel reservoir – occidental Amazon, Brazil. *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. Rio de Janeiro state* . (2007).
- NEWCOMBE, G., & NICHOLSON, B. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *J Water Supply Res T* , 53, pp. 227-239. (2004).
- NIMPTSCH, J., LI, K., & PFLUGMACHER, S. Using the bioaccumulation potential of aquatic macrophytes. Biofiltration of cyanobacterial toxins in lake CHAOHU (China), an application of the "Green Liver Concept". *VII International Conference on Toxic Cyanobacteria*, (p. 64). Rio de Janeiro. (2007).
- NIMPTSCH, J., WEIGAND, C., & PFLUGMACHER, S. Cyanobacterial toxin elimination via bioaccumulation of MC-LR in aquatic macrophytes: an application of the "Green Liver Concept". *Environ Sci Technol* , 42 (22), pp. 8552-7. (2008).
- NOCTOR, G., & FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* , 49, pp. 249-279. (1998).
- PAERL, H. W., BLAND, P. T., BOWLES, N. D., & HAIBACH, M. E. Adaptation to high intensity, low wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl Env Microbiol* , 49, pp. 1046-1052. (1985).
- PAERL, H., & HUISMAN, J. Blooms like it hot. *Science* , 320, pp. 57-58. (2008).
- PARK, H. D., SASAKUM, Y., MARAYAMA, T., YANAGISAWA, E., HIRAISHI, A., & KATO, K. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin Microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol* , 16, pp. 337-343. (2001).
- PAUL, V. J. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: H. HUDNELL, & KENNETH, *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs* (Vol. 619, p. 950). Elsevier. (2008).
- PERAZZA, M. C., NAVAS-PEREIRA, D., & MARTINS, M. T. O aguapé: meios de controle e possibilidades de utilização. *Revista DAE* , pp. 18-25. (1981).

-
- PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K. A., KRAUSE, E., CODD, G. A. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1425, pp. 527-533. (1998).
- PFLUGMACHER, S., CODD, G. A., & STEINBERG, C. E. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environ Toxicol* , 14, pp. 111-115. (1999).
- PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., BEATTIE, K. A., KRAUSE, E., STEINBERG, C. E., & CODD, G. A. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. *Environ Toxicol Chem* , 20 (4), pp. 846-852. (2001).
- PFLUGMACHER, S. Possible Allelopathic Effects of Cyanotoxins, with Reference to Microcystin-LR, in Aquatic Ecosystems. *Environ Toxicol* , 17, pp. 407-413. (2002).
- PFLUGMACHER, S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology* , 70, pp. 169-178. (2004).
- PIETSCH, C., WIEGAND, C., AMÉ, M. V., NICKLISCH, A., WUNDERLIN, D., & PFLUGMACHER, S. The Effects of a Cyanobacterial Crude Extract on Different Aquatic Organisms: Evidence for Cyanobacterial Toxin Modulating Factors. *Environ Toxicol* , 16, pp. 535-542. (2001).
- POTT, V. J., & CERVI, A. C. A família Lemnaceae Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. *Revta brasil. Bot.* , 22 (2), pp. 153-174. (1999).
- RAMOS, A. G., MARTEL, A., CODD, G. A., SOLER, E., COCA, J., RDO, A. Bloom of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the Northwest African upwelling. *Mar Ecol Prog Ser* , 301, pp. 303-305. (2005).
- RAPALA, J., SIVONEN, K., LYRA, C., & NIEMELA, S. I. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* , 63, pp. 2206-2212. (1997).

-
- REIDEL, A., DAMASCENO, S., ZENATTI, D. C., SAMPAIO, S. C., FEIDEN, A., & QUEIROZ, M. M. Utilização de efluente de frigorífico, tratado com macrófitas aquáticas, no cultivo de tilápias do Nilo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental: suplemento, Campina Grande* , 9, pp. 181-185. (2005).
- RENNENBERG, H. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* , 21, pp. 2771-2781. (1982).
- REYNOLDS, C. S. The ecology of freshwater phytoplankton. *Cambridge Studies in Ecology, Cambridge Univ. Press, Oxford* , p. 384. (1984).
- RIPPKA, R., DERUELLES J., WATERBURY J. B., HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* , V. 111 pp. 1-61. (1979)
- ROBARTS, R. D., & ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N Z J Mar Freshw Res* , 21, pp. 391-399. (1987).
- RODELLA, R. A., COSTA, N. V., COSTA, L. D., & MARTINS, D. Diferenciação entre *Egeria densa* e *Egeria najas* pelos caracteres anatômicos foliares. *Planta Daninha, Viçosa* , 24 (2), pp. 211-220. (2006).
- RODHE, W.. Crystallisation of eutrophication concepts in northern Europe. In: G. A. ROHLICH, *Eutrophication- causes, consequences, correctives* (pp. 65-97). Washington-DC: National Academy of Sciences. (1969)
- ROMANOWSKA-DUDA, Z., & TARCZYNSKA, M.. The Influence of Microcystin-LR and Hepatotoxic Cyanobacterial Extract on the Water Plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environ Toxicol* , 17, pp. 434-440. (2002)
- ROMANOWSKA-DUDA, Z., MANKIEWICZ, J., TARCZYNSKA, M., WALTER, Z., & ZALEWSKI, M. The Effect of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) on Water Plants and Animal Cells. *Polish Journal of Environmental Studies* , 11, No.5, pp. 561-566. (2002).
- ROSET, J., AGUAYO, S., & MUÑOZ, M. J. Detección de cianobacterias y toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicologia* , 18, pp. 65-71. (2001).

-
- RUNNEGAR, M. T., & FALCONER, I. R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructure morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* , 24 (2), pp. 109-115. (1986).
- RUNNEGAR, M. T., GERDES, R. G., & FALCONER, I. R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* , 29 (1), pp. 43-51. (1991).
- SAITO, T., OKANO, K., PARK, H. D., ITIYAMA, T., INAMORI, Y., NEILAN, B. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlr A*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol* , 229, pp. 271-276. (2003).
- SAMPAIO, E. V., & OLIVEIRA, N. M. Aproveitamento da macrófita aquática *Egeria densa* como adubo orgânico. *Planta Daninha, Viçosa* , 23, pp. 169-174. (2005).
- SANDERMANN, H. J. Plant metabolism of xenobiotics. *Biochem* , 17, pp. 82-84. (1992).
- SANDERMANN, H. J. Higher plant metabolism of xenobiotics: The "green liver" concept. *Pharmacogenetics* , 4, pp. 225-241. (1994).
- SANT'ANNA, C., & AZEVEDO, M. Contribution to the knowlegde of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* , 71, pp. 359-385. (2000).
- SAQRANE, S., ELGHAZALI, I., OUAHID, Y., EL HASSNIB, M., EL HADRAMI, I., BOUARAB, L. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress indution. *Aquatic Toxicology* , 83, pp. 284-294. (2007).
- SCHNUG, E., HANEKLAUS, S., BORCHERS, A., & POLLE, A. Relations between sulfur supply and glutathione and ascorbate concentrations in *Brassica napus*. *Zeitschrift Fur Pflanzenerahrung Und Bodenkunde* , 158, pp. 67-69. (1995).
- SCHRENK, C., PFLUGMACHER, S., BRÜGGEMANN, R., SANDERMANN, H., JR., STEINBERG, C. E. Glutathione S-Transferase Activity in Aquatic Macrophytes with Emphasis on Habitat Dependence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 40, pp. 226-233. (1998).

-
- SCHUBERT, E., SCHUBERT, L. B., CABALLI, V., & PACHECO, M. R. Reconhecimento de algas e contagem de células e cianofíceas nos mananciais que abastecem as Etas do SAMAE de Blumenau. *SAMAE-Blumenau-SC* , p. 27. (2003)
- SCHULZ, C., GELBRECHT, J., & RENNERT, B. Constructed wetlands with free water surface for treatment of aquaculture effluents. *Journal Applied Ichthyology. Berlin* , 20 (1), pp. 64-70. (2004).
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., FAVERO, E. G., & BRAGA, F. M. Utilization of macrophyte biofilter in effluent from aquaculture: I. floating plant . *Brazilian Journal Biology, São Carlos* , 62 (4a), pp. 713-723. (2002).
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., BARROS, A. F., & BRAGA, F. M. Effects of floating macrophyte cover on the water quality in fishpond. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 25, n.1, p. 101-106, 2003. *Acta Scientiarum, Maringá* , 25 (1), pp. 101-106. (2003).
- SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol* , 56, pp. 2658-2666. (1990).
- SIVONEN, K., & JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: I. CHORUS, & J. BARTRAM, *Toxic Cyanobacterial in Water- A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (pp. 41-111). London: E&FN Spon. (1999).
- SOUSA, J. T., HAANDEL, V. A., LIMA, E. P., & HENRIQUE, I. N. Utilização de wetland construído no póstratamento de esgotos domésticos pré-tratados em reator UASB. *Engenharia Sanitária Ambiental, Rio de Janeiro* , 9 (4), pp. 285-290. (2004).
- STEWART, W. D. Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol* , 27, pp. 283-316. (1973).
- SVRCEK, C., & SMITH, D. W. Cyanobacterial toxins and the current state of Knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ* , 3, pp. 155-185. (2004).
- THOMAZ, S. M. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. *Planta Daninha, Viçosa* , 20 (especial), pp. 21-33. (2002).

THOMAZ, S. M., & BINI, L. M. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. *Maringá: EDUEM* . (2003).

TONK, L., VISSER, P. M., CHRISTIANSEN, G., DITTMANN, E., SNELDER, E. O., WIEDNER, C. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl Env Microbiol* , 71, pp. 5177-5181. (2005).

TRIPATHI, B. D., & SHUKLA, S. C. Biological treatment of wastewater by selected aquatic plants. *Environ. Poll* , 69, pp. 69-78. (1991).

TSUJI, K., NAITO, S., KONDO, F., ISHIKAWA, N., WATANABE, M. F., SUZUKI, M. E. Stability of microcystins from cyanobacteria: effects of light on decomposition and isomerization. *Environmental Science and technology* , 28, pp. 173-177. (1993).

UTKILEN, H., & GJOLME, N. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl Environ Microbiol* , 58, pp. 1321-1325. (1992).

VASCONCELOS, V. M., SIVONEN, K., EVANS, W. R., CARMICHAEL, W. W., & NAMIKOSHI, M. Microcystin (heptapeptide hepatotoxins) diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese fresh waters. *Waters Res.* , 30, pp. 2377-2384. (1996).

VIEIRA, J. M., AZEVEDO, M. T., AZEVEDO, S. M., HONDA, R. Y., & CORRÊA, B. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. *Toxicon* , 42, pp. 709-713. (2003).

VIEIRA, J. M., AZEVEDO, M. T., AZEVEDO, S. M., HONDA, R. Y., & CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* , 45, pp. 901-909. (2005).

WALBOT, V., MÜLLER, L., ILADY, R. A., & GOODMAN, C. D. Do glutathione S-transferases act as enzyme or carrier proteins for their natural substrates? In: C. BRUNOLD, H. RENNENBERG, L. J. DE KOK, I. STULEN, & J. C. DAVIDIAN, *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants* (pp. 155-165). Berne: Switzerland: Paul Haupt. (2000).

-
- WALSBY, A. E. Mechanisms of buoyancy regulation by planktonic cyanobacterial with gas vesicles. In: P. FAY, & C. VAN BAALEN, *The Cyanobacteria* (pp. 377-414). Amsterdam: Elsevier. (1987).
- WATANABE, M. F., & OISHI, S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl Environ Microbiol* , 49, pp. 1342-1344. (1985).
- WEISS, J., LEIBERT, H. P., & BRAUNE, W. Influence of microcystins-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor* L. *J. Appl. Bot.* , 74, pp. 100-105. (2000).
- WEIß, J., LIEBERT, H. P., & BRAUNE, W. Influence of Microcystin-RR on Growth and Photosynthetic Capacity of the Duckweed *Lemna minor* L. *Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik* , 74, pp. 100-105. (2000).
- WELKER, M., STEINBERG, C., & JONES, G. Release and persistence of microcystins in natural waters. In: I. CHORUS, *Cyanotoxins* (pp. 83-101). Berlin: Springer. (2001).
- WIEDNER, C., VISSER, P. M., FASTNER, J., METCALF, J. S., CODD, G. A., & MUR, L. R. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl Env Microbiol* , 69, pp. 1475-1481. (2003).
- WHO. Cyanobacterial toxins: microcystins. In: W. H. Organisation, *Guidelines for drinking water quality* (pp. 95-110). Geneva, Switzerland. (1998)
- XAVIER, C. F., DIAS, L. N., & BRUNKOW, R. F. Eutrofização. In: C. V. ANDREOLI, & C. CARNEIRO, *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados* (p. 500). Curitiba: Sanepar. (2005).
- XIANG, C. B., WERNER, B. L., CHRISTENSEN, E. M., & OLIVER, D. J. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* , 126, pp. 564-574. (2001).
- YANG, H., XIE, P., XU, J., ZHENG, L., DENG, D., ZHOU, Q. Seasonal variation of microcystin concentration in Lake Chaohu, a shallow subtropical lake in the People's Republic of China. *B Environ Contam Tox* , 77, pp. 367-374. (2006).

YIN, L., HUANG, J., LI, D., & LIU, Y. Microcystin-RR uptake and its effects on *Valisneria Natants*. *Environ. Toxicol.* , 20, pp. 308-313. (2005).

YOO, R. S., CARMICHAEL, W. W., HOEHN, R. C., & HRUDEY, S. E. *Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide*. American Water Works Association-Research Foundation, USA. (1995).

YUNES, J. S., NIENCHESKI, L. F., SALOMON, P. S., PARISE, M., BEATTIE, K. A., RAGGETT, S. L. Development and toxicity of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *IOC Workshop Report (COI/UNESCO)* , 101 (111), pp. 14-19. (1994).

YUNES, J. S., SALOMON, P. S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K. A., RAGGETT, S. L., & CODD, G. A. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *J. Aq. Ecos. Health* , 5, pp. 223-229. (1996).

YUNES, J. S., NIENCHESKI, L. F., SALOMON, P. S., PARISE, M., BEATTIE, K. A., RAGGETT, S. L. Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, southern Brazil. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* , 26, pp. 1796-1800. (1998).

ZANIBONI-FILHO, E. Caracterização e tratamento do efluente das estações de piscicultura. *Revista UNIMAR, Maringá* , 19 (2), pp. 537-548. (1997).

