

Michela Suely Adriani Alves

CIANOACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM ÁGUAS CONTINENTAIS

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof. Titular Maria do Carmo Calijuri



São Carlos

2005

DEDALUS - Acervo - EESC



31100052140

Class.	TESE - EESC ✓
Cult.	2728 C
Tombo	T 111/05
Syno	1444232

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

A474c Alves, Michela Suely Adriani
Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais / Michela Suely Adriani Alves. -- São Carlos, 2005.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.
Área: Hidráulica e Saneamento.
Orientadora: Prof^a. Tit. Maria do Carmo Calijuri.

1. Florações. 2. Cianobactérias. 3. Cianotoxinas.
4. Métodos de detecção. 5. Casos no Brasil. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

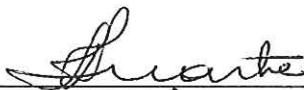
Candidato: Bacharel MICHELA SUELY ADRIANI ALVES

Dissertação defendida e julgada em 18-03-2005 perante a Comissão Julgadora:



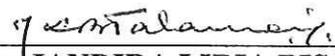
Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado



Profa. Dra. **RUTH DE GOUVÊA DUARTE**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado



Profa. Dra. **JANDIRA LIRIA BISCALQUINI TALAMONI**
(UNESP/Bauru)

Aprovada



Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Dedico esta dissertação:

“A Deus por todas as vitórias conseguidas”.

Ao meu esposo Paulo por todo amor, apoio,
compreensão, amizade, nas horas mais difíceis.

Aos meus amados pais Pedro e Lourdes, meus heróis, meu
esteio, presentes em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Gabriela pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profª Titular Dra Maria do Carmo Calijuri, pela grande orientação, amizade, dedicação e por ter acreditado e tornado possível a minha formação como pesquisadora. Pelo seu exemplo como profissional, a quem realmente admiro.

À Profª Dra Ruth de Gouvêa Duarte, pela valiosa amizade, dedicação e auxílio na correção da presente dissertação.

À Profª Dra Jandira L. B. Talamoni, da Unesp de Bauru, pelas valiosas contribuições, enriquecedoras deste trabalho.

Ao Profº Dr. Ovídio Richard Crnkovic, por ter me apresentado à Escola de Engenharia de São Carlos.

Ao Profº Dr. Luiz Romariz Duarte, pela amizade e paciência.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, pela ajuda e condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho; em especial, às secretárias da pós-graduação Sá e Pavi e a recepcionista Rose

Aos funcionários do Laboratório de Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos: Paulo, Júlio, Cidinha e a estagiária Juliana, por todos os grandes ensinamentos, amizade e compreensão e por terem acreditado em mim antes de tudo.

Aos companheiros do Laboratório BIOTACE: Roseli, Ana Luiza, Patrícia, Adriana, André, Juliana, Luci.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos amigos Lígia, Danielli e Douglas, pelo carinho, apoio e constante ajuda.

“Deus é a minha fortaleza e a minha força, e ele perfeitamente desembaraça o meu caminho”.

II Samuel 30, 22.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE QUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Fitoplâncton	4
3.2 Cianobactérias	10
3.3 Cianotoxinas	34
3.3.1 Neurotoxinas	37
3.3.1.1 Anatoxina-a	37
3.3.1.2 Anatoxina-a (s)	39
3.3.1.3 Saxitoxina e Neosaxitoxina	41
3.3.1.4 Homoanatoxina-a	43
3.3.2 Hepatotoxinas	44
3.3.3 Dermatotoxinas	48
3.4 Fatores que Determinam Degradação de Cianotoxinas	53
3.4.1 Microcistinas	53
3.4.2 Anatoxina-a	54

3.4.3 Anatoxina-a (s)	55
3.4.4 Saxitoxinas	55
3.4.5 Cylindrospermopsinas	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 Amostragem e Preservação	57
4.2 Análises Quantitativa e Qualitativa do Fitoplâncton	58
4.3 Determinação através de Biomassa	61
4.3.1 Tamanho e Volume Celular	61
4.3.2 Peso Fresco	64
4.3.3 Carbono Orgânico	64
4.3.4 Clorofila a	65
4.4 Métodos de Determinação de Toxinas	69
4.4.1 Métodos Biológicos	70
4.4.1.1 Bioensaios com Camundongos	70
4.4.2 Métodos Bioquímicos	73
4.4.3 Métodos Físico-Químicos	81
4.5 Testes de Toxicidade	87
4.5.1 Teste de Toxicidade Aguda	87
4.5.2 Teste de Toxicidade Subaguda e Subcrônica	88
4.5.3 Teste de Toxicidade Crônica	89
5 OCORRÊNCIAS DE FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS NO BRASIL	90
6 LEGISLAÇÃO	100
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Principais diferenças entre células procarióticas e eucarióticas.	21
Tabela 2-	Algumas possíveis rotas de exposição às toxinas de cianobactérias, presentes em águas continentais (C), águas de transição (T) ou marinhas (M).	49
Tabela 3-	Cianotoxinas, alvo primário em mamíferos e gêneros responsáveis pela produção.	50
Tabela 4-	Ocorrências de florações de cianobactérias no Brasil.	92
Tabela 5-	Desempenho de algumas técnicas de tratamento para remoção de cianotoxinas.	117
Tabela 6-	Estratégias utilizadas para o controle das florações.	122

Lista de Quadros

Quadro 1-	Principais esquemas de classificação dos organismos vivos.	15
Quadro 2-	Faixas de toxicidade das cianobactérias para camundongos (mg de peso seco de células/kg de peso corpóreo).	72
Quadro 3-	Padrão de turbidez para água pós filtração ou pré desinfecção.	107
Quadro 4-	Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde.	107
Quadro 5-	Número mínimo de amostras para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo do manancial.	111
Quadro 6-	Frequência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo do manancial.	112
Quadro 7-	Espécies de cianobactérias e limite máximo admissível em água bruta.	120

Lista de Figuras

Figura 1-	Esquema dos cinco reinos a que pertencem os seres vivos.	5
Figura 2-	(a) Tapetes de bactérias crescendo, como estromatólitos, na Austrália Ocidental. (b) Corte transversal através de estromatólitos fósseis em Montana, mostrando camadas de crescimento bacteriano.	11
Figura 3-	Origem da vida na Terra.	12
Figura 4-	Fósseis de cianobactérias. Sítio arqueológico; Austrália Central, datado da Era Proterozóica (850 milhões de anos). (a) Forma colonial Chroococales. (b) Forma filamentosa <i>Palaeolynbya</i> sp.	12
Figura 5-	Cianobactérias filamentosas da Formação Lakhanda, no oeste da Sibéria. Esses microfósseis datam da Era Pré Cambriana tardia e têm aproximadamente 950 milhões de anos.	13
Figura 6-	Árvore evolutiva universal pela comparação de seqüências do RNA ribossômico.	16
Figura 7-	<i>Prochloron</i> sp., procarionte fotossintético semelhante aos vegetais.	19
Figura 8-	Desenho esquemático da estrutura de uma cianobactéria.	20
Figura 9-	<i>Anabaena planktonica</i> com heterocisto intercalar.	22
Figura 10-	<i>Cylindrospermum majus</i> , com heterocisto terminal e acineto.	23
Figura 11-	<i>Gloeotrichia echinulata</i> , mostrando filamentos longos e afilados.	24
Figura 12-	(a) <i>Anabaena</i> sp. (b) <i>Anabaena circinales</i> .	25
Figura 13-	(a) <i>Anabaenopsis</i> sp. (b) <i>Anabaenopsis circularis</i> .	26
Figura 14-	(a) <i>Nodularia</i> sp. (b) <i>Nodularia spumigena</i> .	26
Figura 15-	(a) <i>Aphanizomenon</i> sp. (b) <i>Aphanizomenon flos aquae</i> .	27
Figura 16-	(a) <i>Nostoc</i> sp. (b) <i>Nostoc</i> sp.	28
Figura 17-	(a) <i>Oscillatoria</i> sp. (b) <i>Oscillatoria ornata</i> .	29
Figura 18-	(a) <i>Lyngbya</i> sp. (b) <i>Lyngbya hieronimusii</i> .	29
Figura 19-	(a) <i>Phormidium</i> sp. (b) <i>Phormidium autumnale</i> .	30
Figura 20-	(a) <i>Spirulina</i> sp. (b) <i>Spirulina</i> sp.	30
Figura 21-	(a) <i>Gloeotrichia</i> sp. (b) <i>Gloeotrichia echinulata</i> .	31

Figura 22-	(a) <i>Microcystis aeruginosa</i> . (b) <i>Microcystis aeruginosa</i>	32
Figura 23-	(a) <i>Gomphosphaeria</i> sp. (b) <i>Gomphosphaeria lacustris</i>	32
Figura 24-	Estrutura química da anatoxina-a.	38
Figura 25-	Estrutura química da anatoxina-a (s).	40
Figura 26-	Estimulação normal na contração muscular. (b) Efeitos da anatoxina-a na contração muscular. (c) Efeitos da anatoxina-a (s) na contração muscular.	41
Figura 27-	Estrutura geral saxitoxinas.	42
Figura 28-	(a) Efeitos da saxitoxina e da neosaxitoxina na propagação do impulso nervoso. (b) Eventos normais da propagação do impulso nervoso.	43
Figura 29-	Estrutura química homoanatoxina-a.	44
Figura 30-	Estrutura química da hepatotoxina microcistina.	45
Figura 31-	Estrutura química geral das nodularinas	45
Figura 32-	Estrutura química da hepatotoxina cilindrospermopsina.	47
Figura 33-	(a) Fígado normal. (b) Fígado após atuação de hepatotoxinas.	48
Figura 34-	Fórmulas geométricas para estimativa de biovolume.	61
Figura 35-	Esquema do método ELISA. (a) Amostra com toxina. (b) Amostra controle (sem toxina).	76
Figura 36-	Leitora de microplacas por absorbância.	77

RESUMO

ALVES, M.S.A. (2005). *Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais*. 149 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

As cianobactérias pertencem a um grupo de organismos que surgiram no Planeta há cerca de 3,5 bilhões de anos. Durante 270 milhões de anos elas dominaram, em um período que ficou conhecido como o Período das Cyanophyceae (Pré-Cambriano). Águas eutrofizadas oferecem os requisitos para haver floração aumentando as chances estatísticas de aparecimento de cianobactérias, inclusive as tóxicas. Há alteração substancial das características das comunidades e do ecossistema e, por seu potencial tóxico, esses organismos causam conseqüências danosas à integridade ambiental e à saúde pública. Essas florações são resultado da interação de fatores físicos, químicos e bióticos, evidenciados por crescimento explosivo – florações - de poucas espécies, freqüentemente as menos exigentes a gás carbônico. Entre as cianobactérias formadoras de florações destacam-se os gêneros: *Aphanizomenon* sp., *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp., *Microcystis* sp., *Gloeotrichia* sp., *Cylindrospermopsis* sp. e *Nodularia* sp. Entre as cianobactérias produtoras de toxinas destacam-se as espécies: *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Nodularia spumigena*. O problema para a saúde pública e ambiental relaciona-se à liberação das toxinas que sempre ocorre após a lise celular, devido ao uso de algicidas, ao estresse celular ou à senescência. As cianotoxinas – neurotoxinas, hepatotoxinas, endotoxinas (lipopolissacarídeos) – não causam os mesmos efeitos nos diferentes organismos que as ingerem. Para análises quantitativas e qualitativas das amostras fitoplanctônicas são necessárias rotinas laboratoriais, que têm início desde a coleta, estocagem, sedimentação e identificação das espécies ao microscópio. Em câmaras de sedimentação apropriadas é possível contar e identificar os organismos em questão. O volume celular é estimado por meio de formas geométricas, correspondentes às dimensões celulares dos organismos. O carbono orgânico e os pigmentos fotossintetizantes, principalmente a clorofila a, fornecem indicação da biomassa fitoplanctônica. A extração desta pode ser feita utilizando-se acetona, etanol ou metanol. Os métodos mais usados para determinação da concentração de clorofila a são: fluorimetria, espectrofotometria e HPLC, este último o método mais preciso. No Brasil têm sido registradas ocorrências de florações de cianobactérias e a preocupação tem aumentado significativamente após o caso de Caruaru (PE). Como é difícil prever as florações de cianobactérias potencialmente tóxicas, alguns métodos laboratoriais, como Bioensaios, HPLC, CG, ELISA, Inibição de Fosfatase e Inibição de Acetilcolinesterase têm sido de grande ajuda na determinação das cianotoxinas, o que possibilita que as empresas abastecedoras de água tomem as providências cabíveis, quanto ao abastecimento da população e cumprimento da Portaria 518, de 24 de março de 2004. No entanto a Portaria nº518 do Ministério da Saúde mostra-se ineficaz pela falta de

artigos sobre o gerenciamento dos corpos hídricos eutrofizados, que mostram alterações em suas características e que podem ser associados a problemas de saúde pública, e também pela falta de penalidades e outras sanções (exemplo: fiscalização) que auxiliem no cumprimento da legislação. Devido a isso, procedimentos e profissionais devem ser encontrados e treinados para o entendimento de como, onde e por que, as florações acontecem.

Palavras – Chave: florações, cianobactérias, cianotoxinas, métodos de detecção, casos no Brasil.

ABSTRACT

ALVES, M.S.A. (2005). *Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais*. 149 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

Cyanobacteria are part of a group of organisms that have had a long evolutionary history extending to at least 3,5 billion years ago. During 270 million years they had been dominant, in a period that was known as the “Age of Cyanophyceae” (Early Cambrian Period or Proterozoic Era). Eutrophic waters offer the requirements for the blooms increasing statistically the chances of cyanobacteria emergence, including the toxic ones. There is substantial disturbance of characteristics of the communities and ecosystem and, because of their toxic potential, those organisms cause harmful consequences to the environmental integrity and public health. Those blooms are a result of an interaction of physical, chemical and biotic factors, evidenced by the proliferation of few species, frequently the least demanding ones to carbonic gas. Globally among the most frequently found freshwater cyanobacteria forming water-blooms it must be emphasized the following strains: *Aphanizomenon* sp., *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp., *Microcystis* sp., *Gloeotrichia* sp., *Cylindrospermopsis* sp. and *Nodularia* sp. Among the cyanobacteria producing toxins it must be emphasized the following species: *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Nodularia spumigena*. Environmental and public health problems are largely associated with the release of toxins occurring after cellular lysis, caused by the use of algicides, cell stress or senescence. Cyanotoxins - neurotoxins, hepatotoxins, endotoxins (lipopolysaccharides) – cause distinct effects in the different organisms ingesting them. For quantitative and qualitative analyses of phytoplanktonic samples they are necessary laboratory routines as collection, stocking, sedimentation and identification of the species performed by microscopic examination. It is possible to count and identify such organisms in appropriate sedimentation chambers. Cell volumes are calculated for each species from formulae for solid geometric shapes that most closely match the cell shape based on cell dimensions. Organic carbon and photosynthetic pigments primarily chlorophyll-a are used to estimate the biomass of the phytoplankton. Chlorophyll-a extraction can be made by using acetone, ethanol or methanol. The major methods used for determination of chlorophyll-a concentrations are fluorometry, spectrophotometry and HPLC. In particular, HPLC has been considered the most accurate analytical method. Occurrences of cyanobacteria blooms in Brazil have been recorded, and a concern has becoming increasingly significant after the Caruaru (PE) episode. It is difficult to foresee the potentially toxic cyanobacteria blooms, so some laboratory methods as Bioassays, HPLC, CG, ELISA, Inhibition of Phosphatase and Inhibition of Acetylcholinesterase have been of great help in the determination of the cyanotoxins, what permits that the Health Authorities take reasonable providences related to drinking water supplies and fulfill the Guideline 518, of March 24, 2004. Nevertheless, National

Legislation becomes inefficient by the lack of ordinances about the management of eutrophic water bodies, which may notably alter the characteristics of aquatic ecosystems and cause public health problems. Penalties and other sanctions to assist in enforcement of the legislation are also needed. Procedures must be taken and operators must be trained in order to clarify how, where and why blooms happen.

Key words: blooms, cyanobacteria, cyanotoxins, detection methods, Brazilian episodes.

1 Introdução

“Knowledge is of a two kinds; we know a subject ourselves or we know where we can get information up it”
(Samuel Johnson, 1709-1784)

A introdução, de forma acelerada, de nutrientes orgânicos e minerais nos lagos, rios e represas contribui para o aumento da produtividade dos mesmos e, freqüentemente, ocasiona o fenômeno conhecido por eutrofização das águas, responsável por desequilíbrios ecológicos nos ecossistemas aquáticos, dificultando o mais nobre dos seus usos legítimos: água para abastecimento.

Águas residuárias, efluentes industriais, águas de chuvas drenadas da área urbana e águas de drenagem de terrenos agriculturados são as mais importantes fontes alóctones do incremento de fertilizantes nos corpos de água.

A fertilização de uma coleção de água é problemática quando causa desequilíbrios ecológicos caracterizados, de forma especial, por uma produção de biomassa maior que aquela que pode ser absorvida e estabilizada por uma cadeia alimentar.

A conseqüência imediata é o acúmulo de biomassa que passa a ser diretamente utilizada por organismos decompositores, provocando elevadas demandas de oxigênio. Ademais, essa biomassa tende a se depositar no fundo dos lagos e represas, assoreando-os e entrando em processo de decomposição anaeróbia com formação de sub-produtos os quais, por sua toxidez e outras características, afetam – negativamente – todo o ecossistema aquático.

Do ponto de vista da integridade ambiental e da saúde pública, esse é um dos mais preocupantes problemas para os sanitaristas de nossa época, especialmente quanto à água para abastecimento. Algumas espécies de cianobactérias, dependendo de sua densidade, podem ser indicadoras da qualidade das águas, mais propriamente, de seu estado de trofia.

A presença de cianobactérias tóxicas é problemática e a maior das preocupações é o fato de as toxinas serem liberadas para a água quando da lise desses organismos, o que pode acontecer também por estresse, na fase de senescência, se digeridas por outros organismos e, ainda, por ação de agentes químicos e processos físicos.

Assim, os estresses causados pela eutrofização e a contaminação das águas por toxinas não podem ser solucionados apenas através de uma mais aprimorada e econômica tecnologia de tratamento de resíduos municipais e industriais. Há necessidade de serem incrementadas pesquisas básicas com vistas ao melhor conhecimento das estratégias de sobrevivência das cianobactérias e dos fatores intervenientes no processo de produção de toxinas, imprescindível como subsídio à engenharia sanitária e ambiental no que tange à captação, tratamento e distribuição de água de abastecimento público.

O expressivo aumento de corpos de água eutrofizados e o fato de as cianobactérias – potencialmente tóxicas – neles proliferarem significativamente, em contraponto à sempre crescente demanda de água que atenda a critérios e padrões de qualidade, chamados padrões de potabilização, nos alertaram para a necessidade de serem reunidas informações a respeito da ocorrência de cianobactérias em águas continentais, dos agravos à saúde que elas possam promover, das metodologias para sua determinação e, ainda, buscar relatos de casos de intoxicação ocorridos em nosso país.

2 Objetivos

“O arqueiro que ultrapassa o alvo falha tanto como aquele que não o alcança”
(Michael E. de Montaigne, 1533-1592)

Pelo fato de as cianobactérias e, mais especificamente, as toxinas por elas produzidas poderem causar sérios problemas à integridade ambiental e à saúde pública, o objetivo precípua deste trabalho de investigação é fazer uma revisão bibliográfica que permita discutir e expor o assunto em forma de um manual que possa fornecer subsídios para o entendimento da ocorrência em mananciais, de cianobactérias e cianotoxinas, referir as diferentes metodologias utilizadas para a identificação das mesmas e seus efeitos e relatar a ocorrência de casos no Brasil.

Um propósito subjacente é auxiliar a tomada de posição quanto ao atendimento de padrões de potabilização – ou de água potabilizável – no sentido de possibilitar certas facilidades e rapidez para sua adequação aos padrões exigidos para a água destinada ao abastecimento público.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Fitoplâncton

“Se vi mais longe foi porque subi nos ombros de gigantes”

Isaac Newton (1642-1727)

Viktor Hensen, fisiologista alemão, em 1887, utilizou pela primeira vez o termo **plâncton** para definir o conjunto de organismos que não dispõem de movimentos próprios capazes de se oporem aos movimentos da água (REYNOLDS, 1984).

A existência desses organismos, que se deslocam ao sabor das ondas, já havia sido demonstrada, em 1880, pelo pesquisador Johannes von Müller (1752-1889) que, com uma fina rede, conseguiu concentrar uma comunidade de plantas e animais até então desconhecida; no entanto, essa comunidade não representava a grande diversidade do plâncton. Müller havia dado a essa comunidade o nome de *Auftrieb* e Hensen denominou-a *plâncton*, palavra oriunda do grego *plagktós*, que significa errante; denominação adotada pelos pesquisadores (REYNOLDS, op.cit.).

Tanto os oceanos quanto os sistemas de água doce contêm extenso agrupamento de organismos microscópicos que nadam ou vivem suspensos na água. Esses organismos compreendem o plâncton e incluem bacterioplâncton; zooplâncton ou plâncton animal e fitoplâncton ou plâncton vegetal (BARNES e RUPPERT, 1996).

O fitoplâncton é constituído por um conjunto de diversificados grupos taxonômicos que têm diferentes necessidades fisiológicas e respondem, de modo distinto, a parâmetros físicos e químicos como luz, temperatura e regime de nutrientes (WETZEL, 1993). Basicamente, ele é composto por organismos que apresentam características de plantas; é o caso das algas unicelulares, filamentosas ou coloniais, pertencentes a vários grupos e capazes de realizar fotossíntese.

O Reino Monera – também chamado *Prokaryontae* (Figura 1) por sugestão do biólogo da marinha francesa, Edouard Chatton, em 1937 – é formado por todos os organismos procariontes, incluídas as eubactérias, ditas “bactérias verdadeiras”, as cianobactérias e as arqueobactérias.

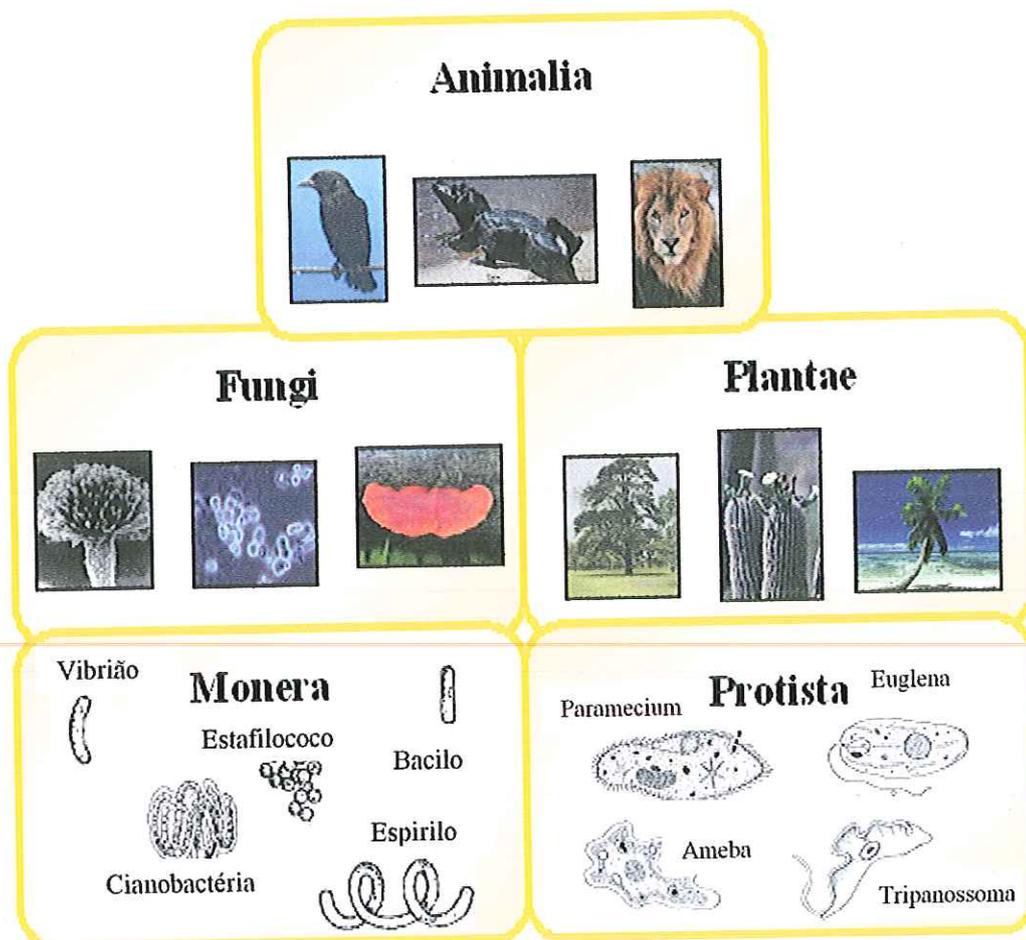


Figura 1: Representação dos cinco Reinos dos seres vivos. Reino Monera representado por bactérias e cianobactérias. Reino Protista é composto por protistas. Reino Fungi representado pelos fungos. Reino Plantae compreende os vegetais superiores. Reino Animalia inclui todos os animais.

Alguns grupos representantes do fitoplâncton incluem organismos do Reino Monera, como as Cianobactérias; e organismos do Reino Protista, como as Clorofíceas, Diatomáceas, Dinoflagelados, Flagelados, Rodofíceas e Feofíceas.

As cianobactérias têm especial importância na manutenção do equilíbrio ecológico. Por outro lado, como existem espécies produtoras de cianotoxinas, elas são

apontadas também como possíveis causadoras de danos à integridade ambiental, agravos à saúde dos indivíduos e à saúde pública.

Segundo Bicudo e Bicudo (1970), o termo alga, proposto em 1753 por Lineu, tem sido aplicado à ampla variedade de organismos. São classificadas como algas todos os talófitos e protistas clorofilados, incluídos os não pigmentados.

Embora fotoautotróficas, algumas algas crescem heterotroficamente. Quando crescem fotossinteticamente, produzem oxigênio e utilizam dióxido de carbono como única fonte de carbono; entretanto, ao contrário das plantas vasculares superiores fotossintetizantes, as algas não necessitam de sistema vascular para transportar nutrientes, uma vez que toda a célula algácea é autotrófica e pode absorver, diretamente, nutrientes dissolvidos (PELCZAR *et al.*, 1996).

As algas são organismos caracterizados, em parte, por grande simplicidade de estrutura; geralmente, nelas não se distinguem órgãos típicos, pois não possuem flores, folhas, raízes ou caule verdadeiro; o corpo, geralmente desprovido de partes diferenciadas, denominado talo, pode ser constituído de uma célula ou de filamentos simples ou ramificados. Muitas algas são organismos unicelulares microscópios, mas algumas algas marinhas são organismos grandes, multicelulares e relativamente complexos (YOO, *et al.*, 1995; BLACK, 2002).

Ao contrário das bactérias e das cianobactérias, as algas têm núcleo celular claramente definido e numerosas estruturas intracelulares envolvidas por membranas; quase todas são fotossintetizantes, embora algumas possam utilizar substâncias de reserva, tal como ocorre com os vegetais clorofilados (BLACK, *op. cit.*).

No ambiente aquático, as populações fitoplânctônicas distribuem-se segundo um gradiente de luminosidade e de profundidade (LARCHER, 2000). Esse autor reportou que, em um ambiente aquático bem iluminado, a maior intensidade de fotossíntese pode não ser imediatamente realizada na superfície da água onde, eventualmente, pode ocorrer radiação em excesso e fotoinibição; a maior produtividade fotossintética pode ocorrer um pouco abaixo da superfície, onde a intensidade luminosa incidente pode ser menor em função da turbidez da água. Segundo Calijuri (1999), sob condições naturais, a taxa de fotossíntese da camada superficial é frequentemente reduzida, e o grau dessa redução depende de condições fisiológicas e ambientais. Sabe-se que a fotoinibição é função da radiação incidente, associada à taxa de extinção vertical. Uma vez que a fotoinibição é um efeito induzido pela luz, a intensidade, a qualidade e a duração da irradiância na superfície da água são variáveis importantes.

Na verdade, as causas precisas da fotoinibição não são claras e, evidentemente, variam para cada caso. Basicamente, a inibição da atividade fotossintética é explicada como sendo causada por saturação luminosa. Mas, apesar das evidências, o mecanismo de fotoinibição permanece ainda obscuro e vários autores têm sugerido que, sob altas intensidades luminosas, ocorre foto-destruição ou oxidação dos pigmentos (CALIJURI, 1999).

Os organismos fitoplanctônicos unicelulares usam o resultado da produção fotossintética para crescimento celular (LARCHER, 2000); ou seja, na constituição de sua matéria orgânica, atuando como produtores primários do ambiente aquático, auxiliando a oxigenação dos corpos hídricos e do ambiente terrestre e contribuindo para manutenção das cadeias alimentares (BRANCO, 1978).

Segundo Zagatto e Aragão (1997), com relação aos aspectos sanitários, os principais grupos fitoplanctônicos são: cianobactérias, clorofíceas, diatomáceas e dinoflagelados. As cianobactérias, devido ao seu potencial tóxico e possíveis riscos à saúde pública, são consideradas as mais problemáticas.

Freqüentemente, as cianobactérias são encontradas em ecossistemas aquáticos continentais, estuarinos e marinhos, vivendo em equilíbrio com as demais espécies existentes (ZAGATTO e ARAGÃO, op. cit.). Elas possuem uma série de estratégias que lhes permite dominar os ambientes lacustres eutróficos, tais como: capacidade de produção de pigmentos acessórios necessários à absorção mais eficiente da luz em qualquer habitat; habilidade para, em seu citoplasma, estocar nutrientes essenciais e metabólitos; capacidade para fixar nitrogênio atmosférico e para acumular gás em vesículas (vacúolos gasosos ou aerótopos) que permitem movimento e ajuste de posição na coluna de água. Segundo Matsuzaki *et al.* (2004), os vacúolos gasosos diminuem a densidade das cianobactérias para um valor inferior ao da água. O sucesso para formação de florações está também relacionado à estabilidade térmica do ambiente (PAERL, 1988b).

Mas, em sua constante busca por conforto e bem estar, o homem interfere intensamente no meio ambiente. O desenvolvimento industrial, o crescimento dos centros urbanos e a expansão de áreas agriculturáveis levam à maior liberação de resíduos nas águas, principalmente fósforo e nitrogênio, fundamentais ao desenvolvimento de todos os organismos e claro, das cianobactérias. Como conseqüências dessa eutrofização, temos:

- mudanças na qualidade da água, provocadas por aumento da biomassa, da produção primária do fitoplâncton, bem como da produção primária de macrófitas aquáticas;
- alteração na diversidade de espécies;
- diminuição na concentração de oxigênio dissolvido na coluna de água;
- diminuição na transparência da água;
- mortandade de peixes;
- aumento nas concentrações iônicas ;
- aumento na condutividade elétrica da água;
- acúmulo de fósforo no sedimento;
- produção de odores desagradáveis nas águas, devido à decomposição por parte de microrganismos, como consequência da diminuição da transparência da água e de eventual desoxigenação;
- mudanças no pH;
- florações de cianobactérias.

Segundo Torgan (1989) e Matthiensen *et al.* (1999), as florações algais são resultado da interação de fatores físicos, químicos e bióticos, caracterizadas por crescimento explosivo, autolimitante e de curta duração dos microrganismos de uma ou de poucas espécies, freqüentemente produzindo visíveis colorações nos corpos de água naturais.

Zagatto e Aragão (1997) e Zagatto (2001) afirmaram, também, que geralmente as florações algais se tornam perceptíveis devido à mudança da coloração da água – de cristalina para esverdeada, verde-azulada ou avermelhada – devido à presença de grandes quantidades de células e filamentos ou colônias de algas.

Florações de cianobactérias têm sido registradas desde o princípio da história e Reynolds e Walsby (1975) e Whitton e Potts (2000) reportaram que, por causarem problemas econômicos e impactos ambientais, elas representam grandes problemas para os responsáveis pela captação, tratamento e distribuição de água.

A grande multiplicação de algas e o enorme número de organismos fazem aumentar a probabilidade estatística da presença, em água, de algas que liberam substâncias tóxicas, as quais conferem odores desagradáveis à água, e que podem causar

danos aos peixes e a outros organismos que a têm como habitat e, também, ao gado que nela se dessedenta (BLACK, 2002).

Ocorrências de persistentes florações têm sido interpretadas como falha no processo de regulação da flutuabilidade das algas, devido à senescência fisiológica (Walsby, 1994), mecanismo pelo qual as cianobactérias podem dominar as águas de superfície (Paerl e Usiach, 1982; Paerl, 1988a e 1988b; Ganf e Walsby, 1989) e, ainda, como resultado de obstrução física, quando as colônias que perderam sua flutuabilidade nas camadas de superfície, têm sua movimentação para o fundo retardada pela presença de colônias flutuantes que estão abaixo delas (IBELINGS e MUR 1992; WALSBY, 1994). Essa restrição física ao movimento vertical foi demonstrada por Ibelings e Mur (op. cit.), quando alta densidade de colônias de *Microcystis* sp., que se encontravam nos milímetros superiores, perdiam sua flutuabilidade, mas moviam-se lentamente para o fundo porque as colônias situadas mais abaixo atuavam como barreira ao seu movimento descendente.

Steinberg e Hatmann (1988), Shapiro (1990) e Blomqvist *et al.* (1994), entre outros pesquisadores, têm procurado explicações para o domínio das cianobactérias. Eles se referiram a esse domínio como resultado de algumas típicas e interessantes características:

- a capacidade de adaptação em águas de temperaturas mornas;
- a possibilidade de assimilar baixa intensidade de luz;
- a necessidade de baixas concentrações de nitrogênio, fósforo e dióxido de carbono dissolvidos na água;
- a capacidade de regular a flutuação, o que protege da herbivoria pelo zooplâncton e
- a capacidade de armazenamento de fósforo.

Ocasionalmente, uma ou outra dessas características tem sido citada como a única ou a principal razão para o domínio das cianobactérias. No entanto, as diferentes características morfológicas, fisiológicas e ecológicas de espécies individuais sugerem que certos fatores que favorecem o domínio de algumas, não necessariamente favorecem o de outras. Por exemplo, embora *Microcystis aeruginosa* possa co-existir com *Anabaena flos-aquae*, não co-existe com *Oscillatoria rubescens*. Entretanto, a

característica mais significativa de todas as espécies formadoras de florações é a presença de vacúolos gasosos (BLOMQUIST *et al.*, 1994).

Amorim (1997) afirmou que, devido à presença de vacúolos gasosos, as cianobactérias conseguem ajustar-se verticalmente na coluna de água. Quando existem condições favoráveis como ambiente calmo, concentram-se na superfície da água, podendo formar camadas com vários centímetros de espessura. Nessas condições, podem tornar-se risco potencial para organismos aquáticos e terrestres, inclusive ao homem, devido à produção de cianotoxinas.

Segundo Carmichael (1989), entre as cianobactérias produtoras de toxinas presentes em florações estão: *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii* e *Nodularia spumigena*. Nos últimos anos, tem se intensificado a ocorrência de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

3.2 Cianobactérias

Nos primeiros períodos geológicos, nos procariontes primitivos, nas arqueobactérias, nas bactérias sulfurosas e nas cianobactérias desenvolveu-se uma membrana com atividade fotossintética. Nessa época o ambiente era fortemente anóxico, a atmosfera primitiva era redutora e também a hidrosfera continha pouco oxigênio livre. Foi essa atividade fotossintética que permitiu a criação das bases material e energética para a evolução da vida na Terra (LARCHER, 2000).

Black (2002) reportou que os procariontes deixaram poucos registros fósseis. Em locais onde, há milhões de anos, o ambiente permitiu a deposição de densas camadas de bactérias, são encontrados tapetes fossilizados de procariontes, denominados estromatólitos, os quais fornecem informações sobre a origem das Archea. (Figura 2a e 2b). No entanto, a maioria dos ancestrais procariontes desapareceram sem deixar rastros.

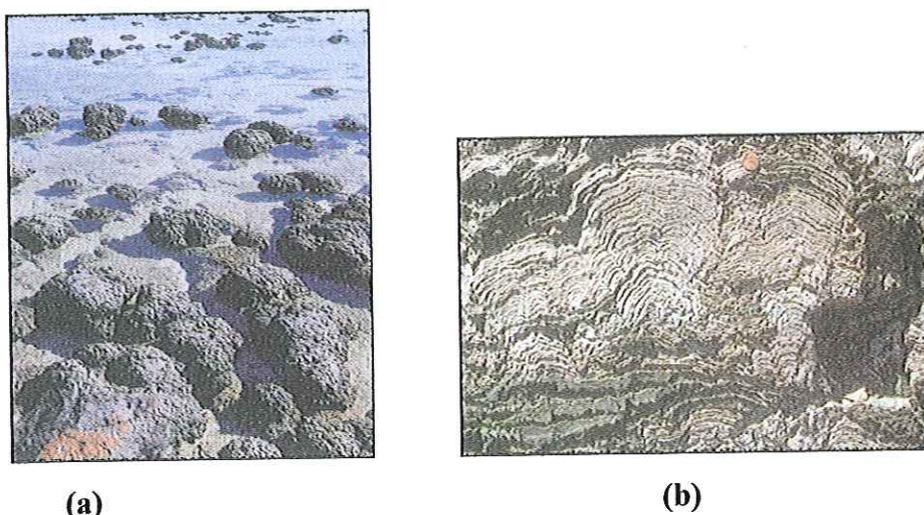


Figura 2: (a) Tapetes de bactérias, crescendo como estromatólitos, na Austrália ocidental. (b) Corte transversal através de estromatólitos fósseis em Montana, mostrando camadas horizontais de crescimento bacteriano.

FONTE: Black (2002)

Os fósseis mais antigos, representados por dois tipos de seres vivos, bactérias e cianobactérias, possuem células simples – são procariontes. Atualmente, existe grande quantidade de procariontes representados por bactérias e cianobactérias, os quais não apresentam diferenças fundamentais em relação aos seus ancestrais fósseis.

A célula bacteriana fóssil difere da célula da alga fóssil; tal como suas parentes modernas, as algas fósseis exibem evidências de terem sido fotossintetizantes. Portanto, teriam sido capazes de sintetizar seu próprio alimento a partir de substâncias simples, dióxido de carbono e água, usando a luz do sol como fonte de energia. Esse tipo de organismo, atualmente, é chamado autótrofo ou auto-alimentador (YOO *et al.*, 1995).

As cianobactérias pertenceram a um antigo grupo de organismos existentes no planeta há 3,5 bilhões de anos, vale dizer, desde o surgimento da vida (Figura 3). Suas estratégias de sobrevivência salvaram-nas de extinção. Foram encontradas, no noroeste da Austrália, cianobactérias fossilizadas em rochas que, por datação, indicam terem sido elas os primeiros produtores a liberar oxigênio – o que alterou, profundamente, toda a atmosfera terrestre e possibilitou a evolução que fez surgir muitos outros organismos (YOO *et al.*, *op. cit.*).

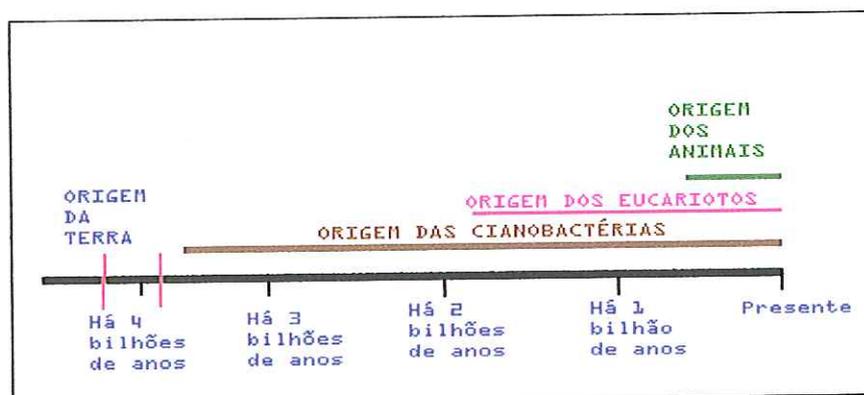


Figura 3: Origem da vida na Terra

FONTE: Adaptado de [www.terravista.pt/bilene/5547/iologia/celula/origem](http://www.terraviva.pt/bilene/5547/iologia/celula/origem)

Evidências paleontológicas nos permitem supor que células mais ou menos esféricas teriam sido os precursores fósseis das cianobactérias (Figura 4).

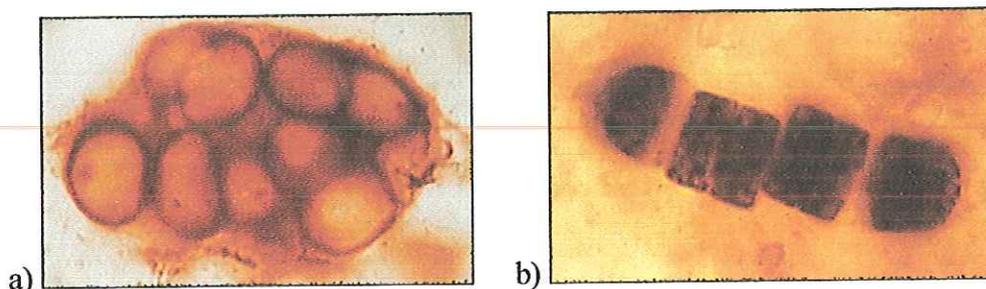


Figura 4: Fósseis de cianobactérias. Sítio arqueológico: Austrália Central, datado da Era Proterozóica (850 milhões de anos). a) Forma colonial *Chroococcales* e b) Forma filamentosa *Palaeolyngbya* sp.

FONTE: www.ucmp/berkeley.edu/bacteria/cynofi.html

Black (2002) relatou que, na literatura, há poucas referências às rochas que contenham fósseis individuais de cianobactérias (Figura 5). Essa situação possivelmente seja explicada pelo fato de serem poucas as características estruturais de procariontes; características essas sujeitas a rápidas mudanças quando da ocorrência de alterações no ambiente. A autora apontou como outro possível motivo, a rápida reprodução dos procariontes, que aumenta a probabilidade de mutações por geração. Sabe-se que organismos de um dado período de tempo, com rápida reprodução, acumularam maior

número de mutações, fato que dificulta encontrar relações entre as formas fossilizadas e os atuais organismos procariontes.

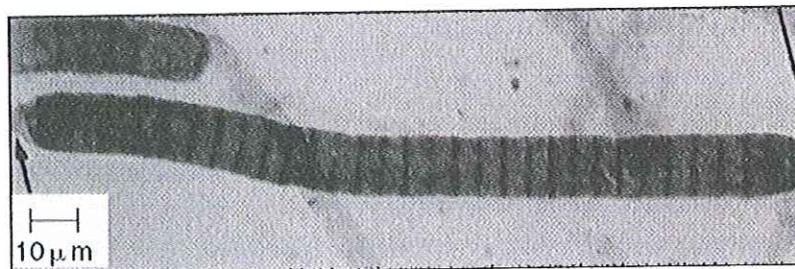


Figura 5: Cianobactérias filamentosas da Formação Lakhanda, no oeste da Sibéria. Esses microfósseis datam da era pré-cambriana tardia e têm aproximadamente 950 milhões de anos.

FONTE: Black (2002)

O Período Pré-Cambriano ou Era Proterozóica (2500 – 570 milhões de anos) foi denominado como a *Era das Cianobactérias*, porque desse período datam seus mais abundantes registros fósseis (SCHOPF e WALTER, 1982¹, *apud* WHITTON e POTTS, 2000).

Não há outras referências às classificações até o século XVIII. A moderna classificação sistemática dos seres vivos teve origem com Carolus Linnaeus (1707-1778), conhecido por Lineu, médico e naturalista sueco que ambicionava descrever todas as espécies de plantas, animais e minerais. Seguramente, ao propor a classificação binominal, Lineu teve um *insight* que possibilitou um avanço muito grande: por isso é cognominado o Pai da Sistemática (RAVEN, 2001).

Até final dos anos 60 do século XIX, os seres vivos estavam reunidos em dois reinos: Animais e Plantas ou Vegetais, como usado em português (Pelczar *et al.*, 1996). Na classificação de Lineu não havia lugar específico para os microrganismos porque alguns deles são predominantemente semelhantes aos animais; outros às plantas; outros ainda possuem características semelhantes às dos animais e das plantas.

Em 1865, Ernest H. Haeckel, zoologista alemão seguidor de Darwin, propôs um terceiro reino para abrigar esses organismos que tinham características tanto de

1. SCHOPF, J. W. & WALTER, M. R., 1982. Origin and Early Evolution of Cyanobacteria: the Geological Evidence. In *The Biology of Cyanobacteria*. Oxford and University of California Press Berkeley. Blackwell Scientific Publications, Chapter 21, p. 543-564.

plantas como de animais, o qual denominou Protista. Nesse reino ele incluiu bactérias, algas e protozoários (RAVEN, 2001).

Os avanços da microscopia eletrônica, na década de 40 do século XX, levaram a uma importante descoberta taxonômica: as células microbianas, conforme a substância nuclear, podem ser divididas em duas categorias: procarióticas e eucarióticas.

As células eucarióticas têm o núcleo separado do citoplasma por uma membrana nuclear; as procarióticas apresentam o material nuclear disperso no citoplasma, não envolto por membrana.

Em 1969, Robert H. Whittaker propôs um sistema de classificação conhecido como Sistema de Classificação dos Cinco Reinos de Whittaker: **Monera, Fungi, Protista, Plantae e Animalia** (Quadro 1). Esse sistema está baseado em três níveis de organização celular que evoluíram em relação aos principais modos de nutrição: fotossíntese, absorção e ingestão (PELCZAR *et al.*, 1996; RAVEN, *op. cit.*).

Quadro 1: Principais esquemas de classificação dos organismos vivos

Esquema de Classificação	Reinos	Organismos
Linnaeus (1753)	Plantae	Bactérias, Fungos, Algas, Plantas,
	Animalia	Protozoários e Animais Superiores
Haeckel (1865)	Plantae	Algas Multicelulares e Plantas
	Animalia	Animais
	Protista	Microorganismos, incluindo Bactérias, Protozoários, Algas, Bolores e Leveduras
Whittaker (1969)	Plantae	Algas Multicelulares e Plantas
	Animalia	Animais
	Protista	Protozoários e Algas Unicelulares
	Fungi	Bolores e Leveduras
	Monera	Todas as Bactérias (procariotos)

FONTE: Pelczar *et al.* (1996)

Até os anos 80 do século XX, quando teve início a aplicação de técnicas moleculares, todas as classificações eram baseadas na morfologia e anatomia comparadas. Entre aquelas técnicas, as mais usadas são as de seqüência geneticamente determinadas: a de aminoácidos em proteínas e a de nucleotídeos em ácidos nucléicos (RAVEN, 2001). O seqüenciamento de ácidos nucléicos, com apenas quatro diferentes nucleotídeos, mostrou-se tecnicamente mais fácil que o seqüenciamento de proteínas, o qual requer a comparação de 20 tipos de aminoácidos.

Em sistemática existe um inegável valor no uso de seqüenciamento de ácidos nucléicos. O seqüenciamento molecular promoveu profundas modificações nas relações

taxonômicas. A análise das seqüências de pequena subunidade do RNA ribossômico forneceu a primeira evidência do mundo vivo estar dividido em três grandes grupos.

Em 1977, Carl Woese e seus colaboradores, da Universidade de Illinois, verificaram que nenhum grupo tinha se desenvolvido a partir de outro; aparentemente todos eles, ainda que por vias completamente diferentes, teriam evoluído de um ancestral comum (PELCZAR *et al.*, 1996) (Figura 6). Propuseram, então, uma nova classificação com os três reinos primários da vida, aos quais denominaram domínios, que são:

- **Archaea** ou **Arqueobactéria**, composto por bactérias metanogênicas, halofílicas extremas, termoacidófilas e dependentes de enxofre;
- **Bacteria** ou **Eubactéria**, composto principalmente por bactérias anaeróbias e gram-negativas;
- **Eukarya** ou **Eucariotos**, composto principalmente por protozoários, fungos, animais e plantas.

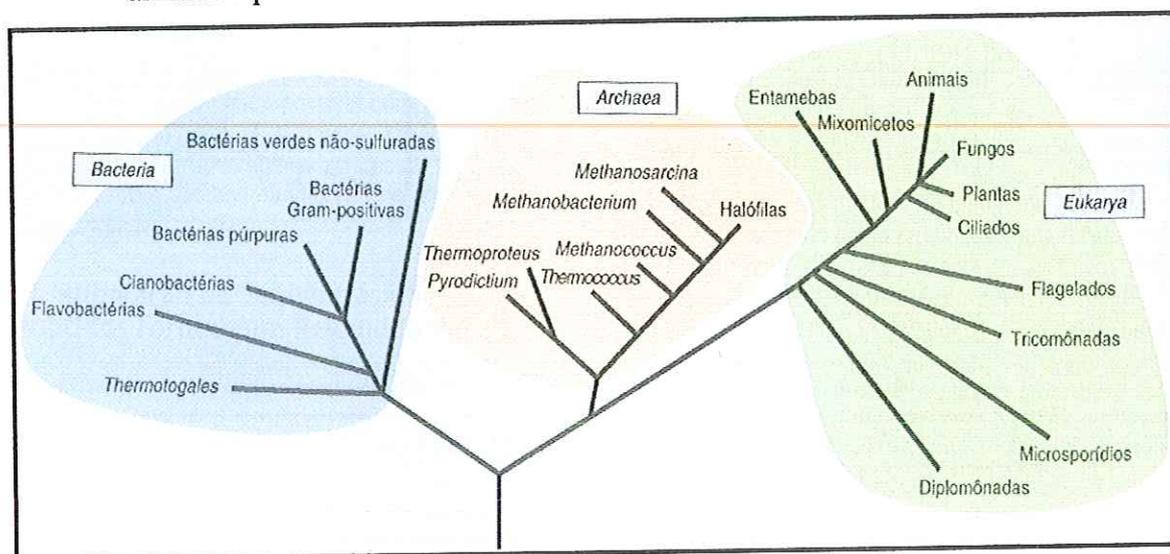


Figura 6: Árvore evolutiva universal determinada pela comparação de seqüências do RNA ribossômico. Os dados apóiam a divisão do mundo vivo em três domínios, os quais consistem em organismos procarióticos (Bactéria e Archaea) e um dos organismos eucarióticos (Eukarya). O ancestral universal dessas células é encontrado na base da árvore. Animais, fungos e plantas formam, cada um, um reino separado no domínio Eukarya. Os grupos remanescentes de Eukarya pertencem ao reino Protista.

FONTE: Raven *et al.* (2001)

Na classificação do Manual Sistemático de Bacteriologia *Bergey*, no Volume III, Seção 19, as Bactérias Fotossintéticas Oxigênicas (Black, 2002) são assim apresentadas:

Grupo I. Cyanobacteria

Cyanobacteria

Subseção I. Ordem Chroococcales

Gênero I.	<i>Chamaesiphon</i>
Gênero II.	<i>Gloeobacter</i> grupo <i>Synechococcus</i>
Gênero III.	<i>Gloeotheca</i> grupo <i>Cyanotheca</i> grupo <i>Gloeocapsa</i> grupo <i>Synechocystis</i>

Subseção II. Ordem Pleurocapsales

Gênero I.	<i>Dermocarpa</i>
Gênero II.	<i>Xenococcus</i>
Gênero III.	<i>Dermocarpella</i>
Gênero IV.	<i>Myxosarcina</i>
Gênero V.	<i>Chroococciopsis</i> grupo <i>Pleurocapsa</i>

Subseção III. Ordem Oscillatoriales

Gênero I.	<i>Spirulina</i>
Gênero II.	<i>Arthrospira</i>
Gênero III.	<i>Oscillatoria</i>
Gênero IV.	<i>Lyngbya</i>
Gênero V.	<i>Pseudanabaena</i>
Gênero VI.	<i>Starria</i>
Gênero VII.	<i>Crinalium</i>
Gênero VIII.	<i>Microcoleus</i>

Subseção IV. Ordem Nostocales

Família I.		<i>Nostocaceae</i>
	Gênero I.	<i>Anabaena</i>
	Gênero II.	<i>Aphanizomenon</i>
	Gênero III.	<i>Nodularia</i>
	Gênero IV.	<i>Cylindrospermum</i>
	Gênero V.	<i>Nostoc</i>
Família II.		<i>Scytonemataceae</i>
	Gênero I.	<i>Scytonema</i>
Família III.		<i>Rivulariaceae</i>
	Gênero I.	<i>Calothrix</i>

Subseção V. Ordem Stigonematales

Gênero I.	<i>Chlorogloeopsis</i>
Gênero II.	<i>Fischerella</i>
Gênero III.	<i>Stigonema</i>
Gênero IV.	<i>Geitleria</i>

Grupo II. Ordem Prochlorales

Família I.		<i>Prochloraceae</i>
	Gênero I	<i>Prochloron</i>

Outros taxa

Gênero I	<i>"Prochlorothrix"</i>
----------	-------------------------

O **Grupo I** das Cianobactérias e o **Grupo II** das Proclorófitas, embora apresentem similaridades, formam grupos diferentes, pois os organismos do Grupo II apresentam duas clorofilas muito semelhantes às das plantas superiores, encontradas em estruturas similares a dos cloroplastos. As cianobactérias, provavelmente, representam um passo importante na evolução dos mecanismos fotossintéticos e, segundo alguns cientistas, *Prochloron* (Figura 7) representa o elo faltante entre os procariontes fotossintéticos e os vegetais eucariótos (BLACK, 2002).

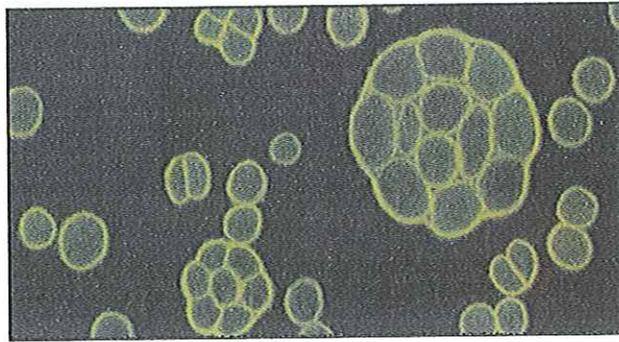


Figura 7: *Prochloron* sp., um procarionte fotossintético semelhante aos vegetais. Cada célula, no aglomerado, contém clorofila distribuída em camadas membranosas.

FONTE : Black (2002)

As cianobactérias são encontradas no mundo todo; seus habitats vão desde fontes termais com pH maior que 5 e temperaturas de 85°C, a oceanos gelados da Antártida; algumas espécies são encontradas no ambiente terrestre, no solo sob rochas e desempenham importante papel nos processos de ciclagem de nutrientes (SMITH, 1955; PAERL *et al.*, 2001).

Os ecossistemas de água doce são os ambientes mais apropriados para o desenvolvimento de cianobactérias, pois a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutro alcalinas, com pH de 6 a 9, temperaturas entre 15°C e 30°C, e com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (AZEVEDO, 1998).

As cianobactérias são capazes de realizar fotossíntese em ambientes pouco adequados às células eucarióticas; elas são adaptadas à vida em ambientes aquáticos de grandes profundidades, devido à presença de ficocianina e ficoeritrina como seus pigmentos fotossintetizantes (YOO *et al.*, 1995). A água é o doador de elétrons para a fotossíntese, com produção de oxigênio (WHITTON e POTTS, 2000).

As sinonímias usadas para denominar um mesmo grupo de organismos que apresentam combinação de propriedades encontradas em algas e bactérias são:

- *blue-green algae* = alga azul;
- mixofíceas;
- cianoprocariontes;
- cianobactérias;
- cianofíceas.

As cianobactérias têm a estrutura de bactéria (Figura 8). Exibem cápsula ou bainha mucilaginosa, parede celular (desprovida de celulose, constituída de polissacarídeos ligados a polipeptídios), membrana plasmática, nucleóide, ribossomos, inclusões de fosfato, proteínas e lipídios (não possuem amido, possuem grânulos de cianoficina- composto de reserva que forma grânulos de poliglucanos, semelhante ao glicogênio - Joly, 2002), citoplasma e lamelas fotossintéticas (tilacóides), nas quais são encontrados os pigmentos fotossintetizantes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

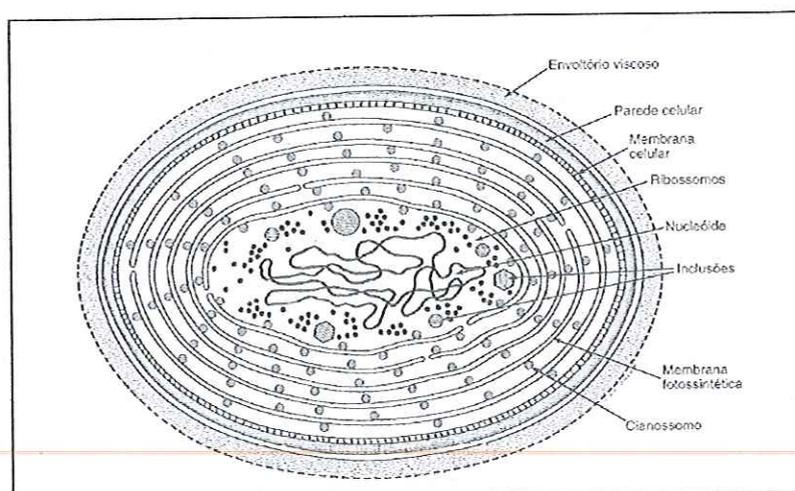


Figura 8: Desenho esquemático da estrutura de uma cianobactéria

FONTE: Junqueira e Carneiro (2000)

As células das cianobactérias não apresentam núcleo delimitado por carioteca; o material nuclear, o ácido desoxirribonucléico – DNA, localiza-se no centro do protoplasma, em uma região denominada nucleoplasma. Não possuem organelas celulares como complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias e vacúolos, características estas comum às bactérias, nas quais toda a água está uniformemente associada à matriz orgânica: esta parece ser a razão de ser mais fácil a adaptação desses organismos a meios com pressão osmótica (Tabela 1). Algumas cianobactérias como: *Microcystis* sp., *Gomphosphaeria* sp., *Gloetrichia* sp., *Anabaena* sp. e *Oscillatoria* sp. apresentam vacúolos gasosos (pseudovacúolos) associados à capacidade de controlar a flutuação da célula, o que lhes permite manterem-se em profundidade ótima em nutrientes, concentração de oxigênio e disponibilidade de luz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, op. cit.).

Tabela 1 - Principais diferenças entre Células Procarióticas e Eucarióticas.

Características	Célula procariótica	Célula eucariótica
Tamanho	média de 1 a 2 μm por 1 a 4 μm	acima de 5 μm de largura ou diâmetro
Número de cromossomos	1 circular	Mais de 1, lineares
Membrana nuclear	Ausente	Presente
Aparelho mitótico	Ausente	Presente
Mitocôndrias	Ausentes	Presentes
Cloroplastos	Ausentes	Presentes em plantas
Aparelho de Golgi	Ausente	Presente
Reticulo endoplasmático	Ausente	Presente
Lisossomos	Ausentes	Presentes
Ribossomos	70s, distribuídos no citoplasma	80s, ligados a membranas
Membrana citoplasmática	Sem esteróides	Com esteróides
Peptidoglicano	Presente*	Ausente

*Ausente em *Mycoplasma* e *Arqueobactérias*.

FONTE: Trabulsi *et al.* (1999)

As cianobactérias mostram considerável diversidade morfológica. Elas podem ser **unicelulares**, ex: *Chroococcus* sp. ou **filamentosas**, ex: *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Planktothrix* sp., *Nostoc* sp., *Cylindrospermopsis* sp.; podem ocorrer **individualmente**, ex: *Synechococcus* sp. e *Aphanothece* sp., ou agrupadas em **colônias**, ex: *Microcystis* sp., *Gomphospheria* sp., *Merismopedia* sp. (Whitton e Potts, 2000) - a maior parte delas envolvidas em mucilagem.

As espécies filamentosas têm grau de diferenciação maior que as espécies globulares; a diferenciação mais comum e ecologicamente mais importante é a dos

heterocistos que, de maneira uniforme, aparecem espaçados ao longo do tricoma (MARGALEF, 1983).

Os heterocistos, células que diferem das vegetativas e dos esporos por apresentarem paredes espessas e carecerem do fotossistema 2 (Figura 9), são responsáveis pela fixação do nitrogênio molecular (N_2) (PELCZAR *et al.*, 1996). Eles podem aparecer em todas as espécies filamentosas, exceto em membros da família *Oscillatoriaceae* (WETZEL, 1993). Em certos gêneros, o heterocisto ocupa uma posição intercalar; em outros, é terminal (JOLY, 2002).

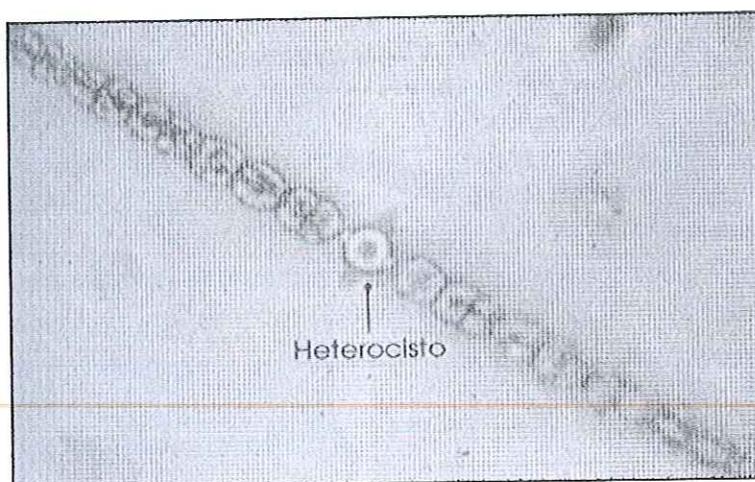


Figura 9: *Anabaena planktonica*. As células têm de 10 a 15 μm de largura e possuem vacúolos de gás. Possuem heterocisto.

FONTE: Pelczar *et al.* (1996)

Os heterocistos são originados de células vegetativas, nas quais se forma um invólucro espesso sobre a parede celular, exceto nos pólos, local em que se liga às células vegetativas adjacentes por um poro ou canal, possibilitando, assim, a troca de produtos metabólicos (WETZEL, *op. cit.*).

Nos heterocistos pode ocorrer a fixação do nitrogênio porque, ao contrário de outras células do filamento, eles não produzem oxigênio (Pelczar *et al.*, *op. cit.*), por não possuírem ficobilinas, que são pigmentos para a absorção de luz. Vale ressaltar que a enzima nitrogenase é inativada na presença de oxigênio (WETZEL, *op. cit.*).

A fixação do nitrogênio ocorre por meio de um processo que utiliza carbono como fonte de energia. O carbono orgânico é levado, através das formas vegetativas, para o interior do heterocisto e o nitrogênio fixado é transferido para o interior das

células vegetativas. Algumas cianobactérias como *Gloeocapsa* sp., que não produzem heterocistos, também podem fixar o nitrogênio. Acredita-se que, nestes casos, a separação entre a fotossíntese e a fixação do nitrogênio, além de temporal, não deve ocorrer em estruturas separadas (WETZEL, 1993).

Algumas espécies produzem estruturas denominadas acinetos, que são células de repouso de grandes dimensões, com paredes espessas, que acumulam reservas de proteínas sob a forma de grânulos de cianoficina (STAINER e COHEN-BAZIRE, 1977², *apud* WETZEL, *op. cit.*). Os acinetos são altamente resistentes ao dessecação (PELCZAR *et al.*, 1996) (Figuras 10 e 11). Por poderem resistir a condições ambientais adversas, as cianobactérias conseguem sobreviver nos sedimentos, por muitos anos (SZE, 1993).

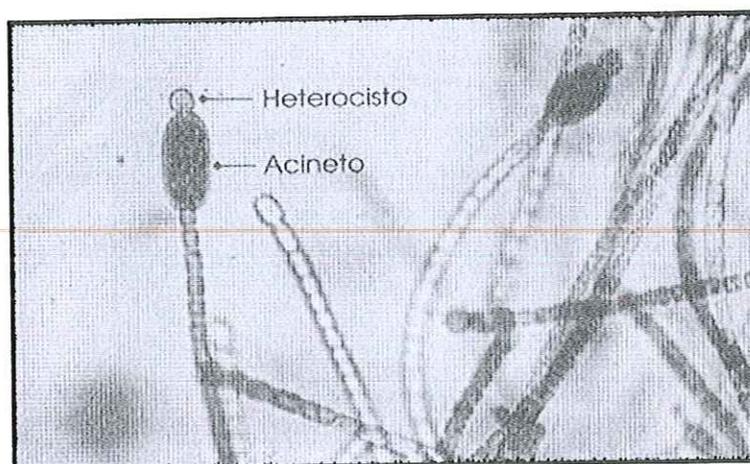


Figura 10: *Cylindrospermum majus*. As células possuem de 3 a 5 μm de largura; os heterocistos, que têm localização terminal, são levemente maiores que as células vegetativas, enquanto os acinetos são muito maiores.

FONTE: Pelczar *et al.* (1996)

² STAINER, R. Y., COHEN-BAZIRE, G., 1977. Fototrofic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Ver. Microbiol.* (31) 225-274.

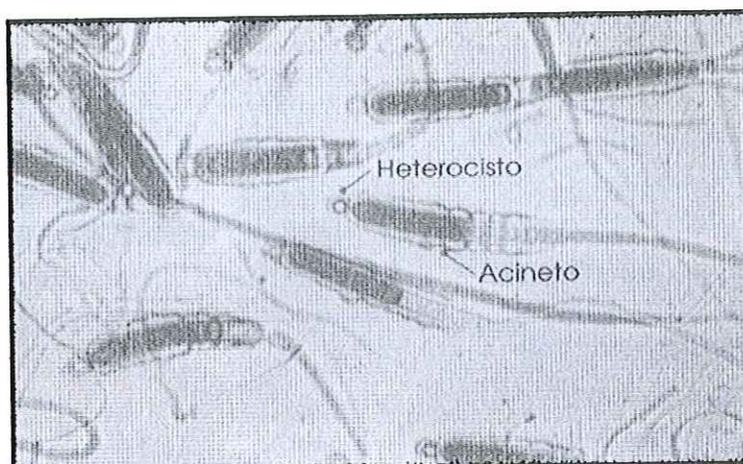


Figura 11: *Gloeotrichia echinulata*, mostrando filamentos longos e afilados. Os heterocistos terminais possuem cerca de 8 a 10 μ m de largura e os acinetos têm de 10 a 20 μ m de largura por 45 a 50 μ m de comprimento.

FONTE: Pelczar *et al* (1996)

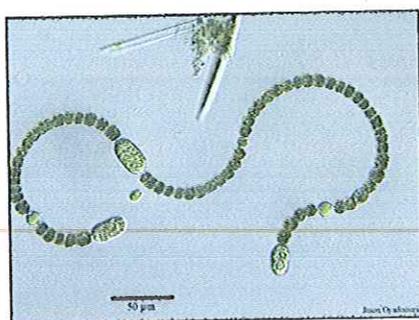
Em condições desfavoráveis elas podem formar esporos resistentes, os acinetos, que ao se destacarem do filamento germinam e dão origem a novos indivíduos. O mesmo acontece em ambiente favorável; os acinetos germinam e podem produzir tricomas, filamentos de seção circular; ou produzir hormogônios, pequenas porções de tricomas, ligeiramente modificados, que se separam do tricoma parietal para formar novos filamentos; esse processo é considerado um tipo de reprodução assexuada (WETZEL, 1993).

A maior parte das cianobactérias filamentosas são bentônicas; especialmente aquelas cujos tricomas estão diferenciados em base e ápice (MARGALEF, 1983).

Segundo Reynolds e Walsby (1975), as formas filamentosas aparecem em espirais ou trançadas e, às vezes, assumem morfologia secundária como resultado da agregação ou embaraço. Essas formas filamentosas diferem, significativamente, quanto ao tamanho de filamentos individuais. No grupo das filamentosas bentônicas, são encontradas as Nostocales ou Oscillatoriales, com ramificações verdadeiras, que se propagam por hormogônios; entre as rivularáceas, destaca-se o gênero *Gloeotrichia* sp. que, quando jovem, pode ser bentônico e fixo; seus filamentos, porém, logo se dispõem radialmente em uma esfera de mucilagem e as colônias flutuam; podem fixar nitrogênio e desenvolver pseudovacúolos gasosos.

Na família das Nostocáceas são mais comumente encontrados os gêneros: *Anabaena* sp., *Nodularia* sp., *Anabaenopsis* sp. e *Aphanizomenon* sp.

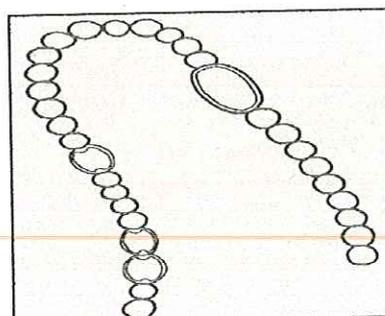
- *Anabaena* sp: organismos filamentosos (tricomatas), formados por células azuladas, arredondadas, ovóides, esféricas ou com constrição mediana; possui heterocistos esféricos intercalares; os acinetos podem estar junto aos heterocistos ou separados; os tricomas mais velhos podem apresentar pseudovacúolos responsáveis pela flutuação, originando as florações (PARRA *et al.*, 1982); apresentam cerca de 4 μm de largura e até 125 μm de comprimento (WALSBY *et al.*, 1989). Quando formam colônias, não possuem forma definida dada à inconsistência da mucilagem BICUDO e BICUDO (1970) (Figura 12 a e b). Produzem, na água, odor de capim, rabanete (Zagatto e Aragão, 1997), mofo; quando se decompõem, o odor é séptico e, dependendo da espécie, de Benzene Hexacloride – BHC (BRANCO, 1978).



(a)

Figura 12: (a) *Anabaena* sp.

FONTE: www.bio.mtu.edu



(b)

(b) *Anabaena circinalis*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

- O gênero *Anabaenopsis* sp. apresenta tendência para assimetria ou diferenciação longitudinal de seus curtos tricomas; possui heterocistos terminais e intercalares e acinetos intercalares (Figura 13a e b), (PARRA *et al.*, op. cit.);

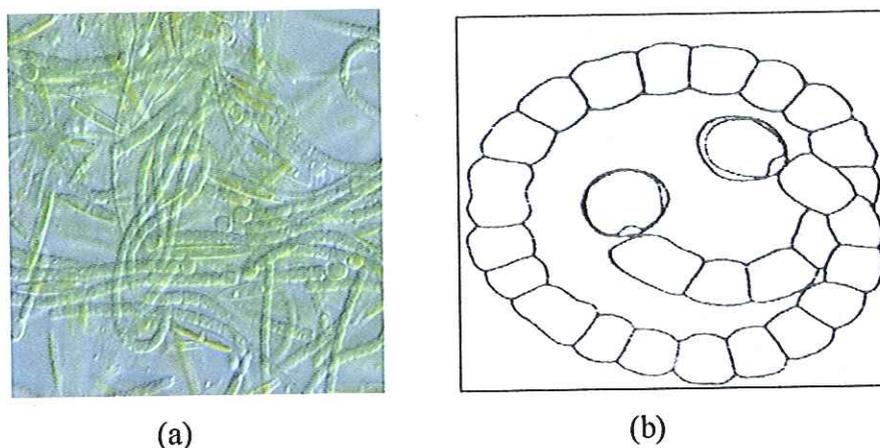


Figura 13: (a) *Anabaenopsis* sp. (b) *Anabaenopsis circularis*
 FONTE: www.protist.i.hosei.ac.jp FONTE: Parra *et al.* (1982)

- O gênero *Nodularia* sp. caracteriza-se por apresentar células cilíndricas, que preferivelmente se desenvolvem principalmente em águas mais ou menos salobras. Apresentam filamentos livres, envolvidos por matriz gelatinosa e formados por uma fileira de células arranjadas como contas de colar. Os heterocistos são intercalares, largos, às vezes pouco maiores que as células vegetativas e os acinetos são largos, reunidos em fileiras entre dois heterocistos (Figura 14 a e b), (PARRA *et al.*, op. cit.).

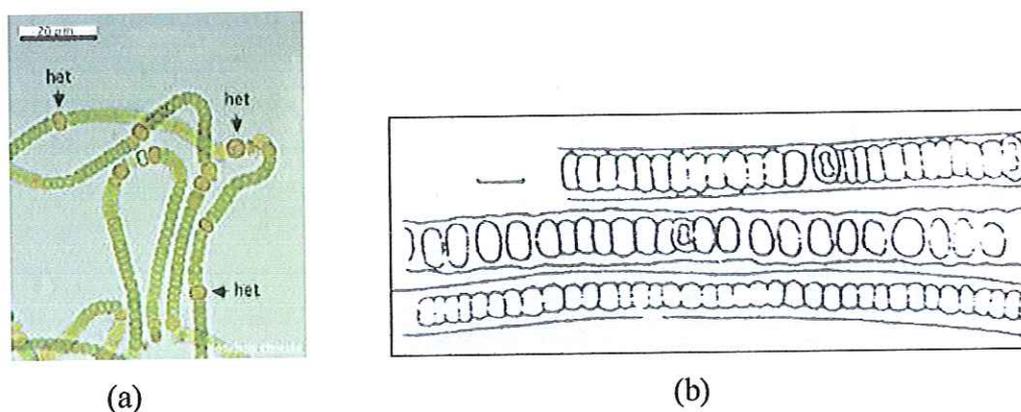


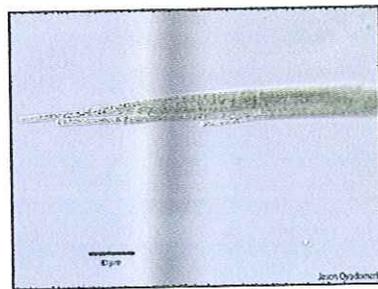
Figura 14: (a) *Nodularia* sp. (b) *Nodularia spumigena*

FONTE: www.ibvf.cartuja.csic.esc. FONTE: Parra *et al.* (1982)

- *Aphanizomenon* sp.: os filamentos agregam-se em *patches**; esses filamentos podem ser retos ou encurvados, não ramificados, formados por

* *patches*: não tem, ainda, tradução para português; têm sido usados, tanto *patches* em inglês, como *balsas* em espanhol. Sugestão de neologismo – *manchas*.

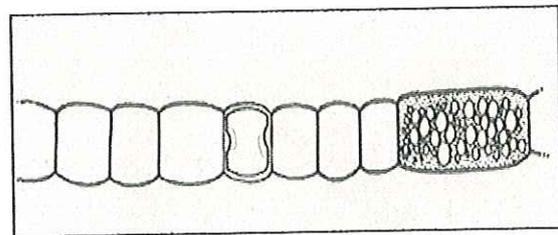
células cilíndricas; em algumas espécies são arredondadas; não se observam bainhas revestindo os filamentos que podem ser dotados de movimentos; os heterocistos são cilíndricos e intercalares; os acinetos são cilíndricos, solitários, alongados (Figura 15a e b) (PARRA *et al.*, 1982). As células possuem pseudovacúolos (BICUDO e BICUDO, 1970). Em grande quantidade, conferem à água odor de BHC (BRANCO, 1978).



(a)

Figura 15: (a) *Aphanizomenon* sp.

FONTE: www.bio.mtu.edu



(b)

(b) *Aphanizomenon flos-aquae*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

- O gênero *Nostoc* sp. apresenta filamentos semelhantes aos de *Anabaena* sp., porém contorcidos, envolvidos por massa gelatinosa comum, que formam uma colônia que, quando nova, é microscópica e geralmente esférica; torna-se visível mais tarde. Os filamentos possuem células esféricas ou elipsoidais, com heterocistos intercalares, geralmente solitários, de mesmo tamanho e forma que as outras células (Figura 16a e b). É comum a formação de hormogônios pela ruptura do filamento, junto a um heterocisto (PARRA *et al.*, op.cit.; MARGALEF, 1983). Podem produzir odor de capim ou séptico (BRANCO, op. cit.). A cianobactéria heterocística *Nostoc muscorum* pertence à ordem Nostocales. Organismos dessa ordem possuem restrição à enzima nitrogenase (responsável pela fixação do gás nitrogênio). Para manter a atividade nitrogenase nos heterocistos, essas cianobactérias utilizam-se de compostos redutores de ATP provenientes, principalmente, da fotossíntese que ocorre nas células vegetativas ou de outros processos metabólicos (YUNES *et al.*, 1990).

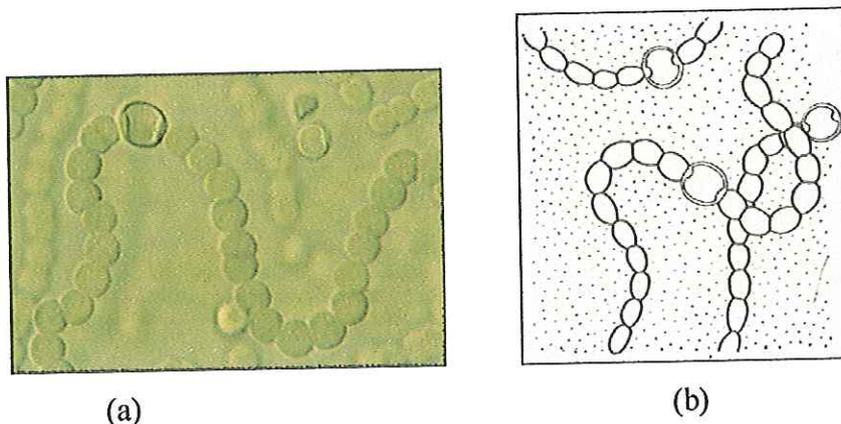


Figura 16: (a) *Nostoc* sp.

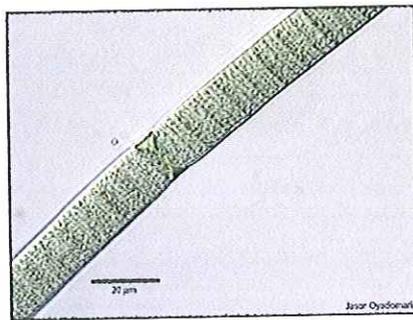
FONTE: www.biol.tsukuba.ac.jp

(b) *Nostoc* sp.

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

No plâncton, as Oscilatoriáceas estão representadas principalmente por espécies desnudas, de estado hormogonal persistente. Nas genuinamente planctônicas, é possível que o mecanismo de mobilidade seja atrofiado. As espécies mais importantes: *Oscillatoria rubescens* e *Oscillatoria agardhii* diferem das demais *Oscillatoria* sp. pelo aspecto reticulado da superfície das células; às vezes têm pseudovacúolos gasosos, porém não fixam nitrogênio; podem acumular-se em estratos definidos, preferencialmente na termoclina, outras vezes no fundo. As mudanças na termoclina podem levá-las à superfície, local em que elas se apresentam como manchas avermelhadas. Talvez deveriam ser classificadas como um gênero distinto (MARGALEF, 1983). O mesmo autor mencionou, também, que algumas Oscilatoriáceas possuem tricomas muito delgados ($1,2 \mu\text{m}$ a $2,5 \mu\text{m}$), que apresentam bainha fina e pertencem aos gêneros:

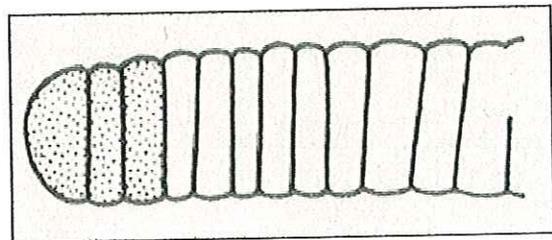
- *Oscillatoria* sp.: os filamentos são cilíndricos, não ramificados, sem bainha ou envoltório gelatinoso (BICUDO e BICUDO, op. cit.). A extremidade do fio pode ser afilada ou possuir pequena dilatação. Possuem movimentos oscilatórios. Não formam heterocistos e acinetos (PARRA *et al.*, 1982) (Figura 17a e b). Apresentam $3,5 \mu\text{m}$ de largura e até $125 \mu\text{m}$ de comprimento; (REYNOLDS, 1984). Segundo Zagatto e Aragão (1997), possuem odor característico de capim ou grama.



(a)

Figura 17: (a) *Oscillatoria* sp.

FONTE: www.bio.mtu.edu

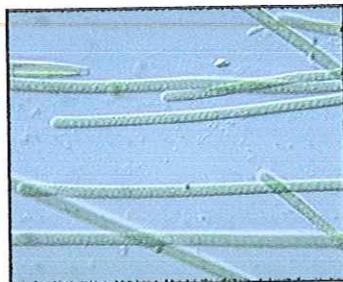


(b)

(b) *Oscillatoria ornata*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

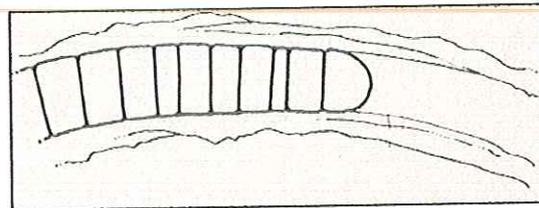
- *Lyngbya* sp.: apresenta filamentos solitários ou agregados. Tricomas simples, circundados por rígida bainha transparente, ocasionalmente ramificados, retos, curvos ou espiralados (Figura 18a e b). As células podem deslocar-se deslizando por dentro da bainha; nunca formam heterocistos nem acinetos (BICUDO e BICUDO, op.cit.; PARRA *et al.*, 1982).



(a)

Figura 18: (a) *Lyngbya* sp.

FONTE: www.protist.i.hosei.ac.jp



(b)

(b) *Lyngbya hieronimusii*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

- *Phormidium* sp.: possuem tricomas semelhantes aos de *Oscillatoria*, sendo difícil a distinção entre ambos; os tricomas são envoltos por uma bainha gelatinosa pouco consistente, podendo ocorrer paralelos uns aos outros (Figura 19a e b), (BICUDO e BICUDO, op. cit.). Algumas espécies: *Ph. mucicola* e *Ph. franquet* crescem na mucilagem de outras algas ou de animais e, algumas vezes, são encontrados já decompostas em elementos celulares, os quais podem ser chamados *Aphanothece* (MARGALEF, 1983). Segundo Parra *et al.*, (op. cit.), *Aphanothece* sp. apresenta-se sem forma

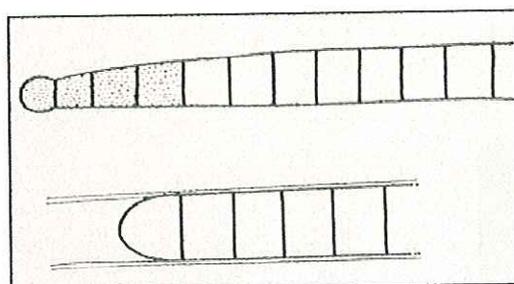
definida (fusiformes, delgadas, elicoidais ou cilíndricas), com bainha homogênea incolor.



(a)

Figura 19: (a) *Phormidium* sp.

FONTE: www.protist.i.hosei.ac.jp

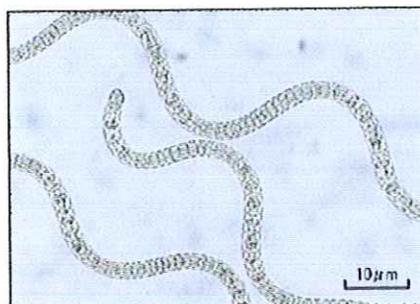


(b)

(b) *Phormidium autumnale*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

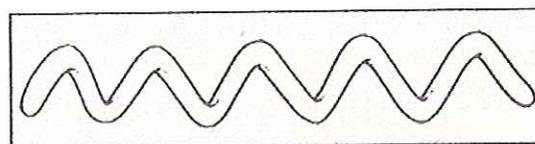
- *Spirulina* sp.: apresenta filamentos regulares e helicoidais, caracteriza-se por não apresentar septos transversais; o material plasmático aparece como uma massa contínua e os tricomas são unicelulares ou multicelulares (Figura 20a e b) (BICUDO e BICUDO, op. cit.; PARRA *et al.*, 1982). O tricoma da *Spirulina* sp. é enrolado em hélice; *S. platensis* é característica de águas carbonatadas sódicas, de alto pH e ricas em fosfato (MARGALEF, 1983).



(a)

Figura 20: (a) *Spirulina* sp.

FONTE: www.locn.ne.jp



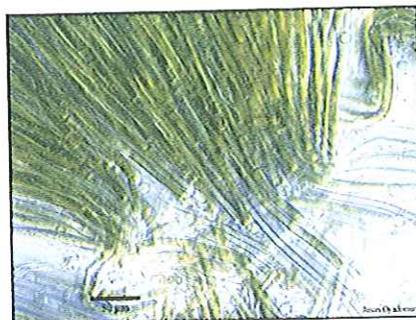
(b)

(b) *Spirulina* sp.

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

- *Gloeotrichia* sp.: os filamentos são agrupados em um nó central, formando grandes estruturas arredondadas (1-2 mm) semelhantes a ouriços (WHITTON e POOTS, 2000). Formam acinetos, que quando isolados podem aparecer próximos ao heterocisto basal (BICUDO e BICUDO, op. cit.). As colônias de filamentos com única célula são envolvidas por uma bainha gelatinosa que é individual na base mas comum a todos os

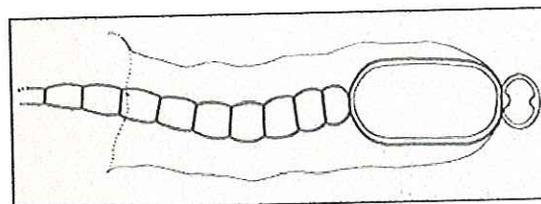
filamentos (Figura 21a e b), (PARRA *et al.*, 1982). Quando presentes em grande número, conferem à água odor de capim ou grama (BRANCO, 1978).



(a)

Figura 21: (a) *Gloeotrichia* sp.

FONTE: www.bio.mtu.edu



(b)

(b) *Gloeotrichia echinulata*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

Normalmente, as colônias globulares alteram seu tamanho como resultado de crescimento, apresentando reduzida desagregação da colônia, embora possam acontecer amontoados isolados ou agregações de colônias separadas (REYNOLDS *et al.*, 1981).

- *Microcystis aeruginosa* é a espécie mais frequentemente encontrada em cultura de colônias globulares ou semi-esféricas; possuem pseudovacúolos gasosos (Bicudo e Bicudo, op. cit.); as células únicas variam em tamanho, de 5-6 μm de diâmetro, podendo encontrar até dezenas de milhares de células por colônia (Reynolds *et al.*, op. cit.), com bainhas mucilaginosas (Figura 22a e b). Quando frescas, produzem odor de capim, grama e rabanete ou odor séptico quando em decomposição; conferem gosto adocicado às águas (ZAGATTO e ARAGÃO, 1997).

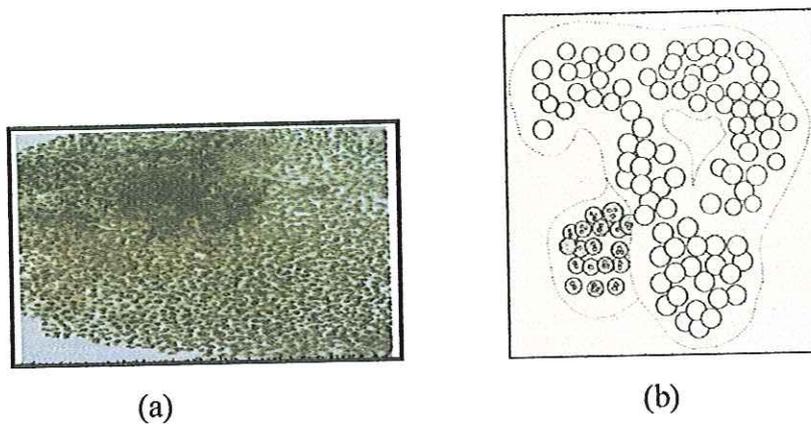
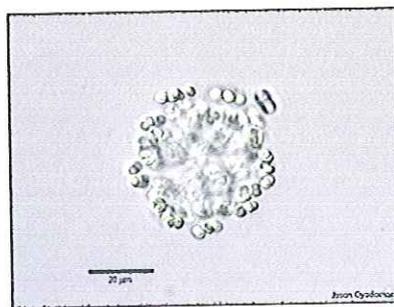


Figura 22: (a) *Microcystis aeruginosa* (b) *Microcystis aeruginosa*

FONTE: Zagato e Aragão (1997)

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

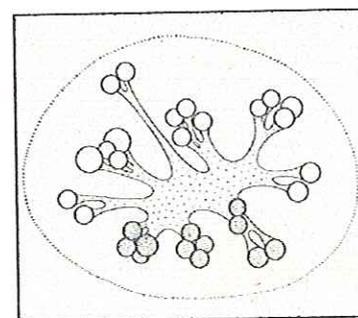
- *Gomphosphaeria* sp. (*Coelosphaerium* sp.): organismos que se apresentam na forma de colônias esféricas ou ovóides; as células encontram-se em uma única camada superficial; o centro da colônia é oco (Figura 23a e b). Quando as colônias não são esféricas, as células se apresentam em disposição radial (PARRA *et al.*, 1982). A gelatina da colônia é transparente. Nas águas, causam gosto adocicado de capim ou grama (BRANCO, 1978).



(a)

Figura 23:(a) *Gomphosphaeria* sp.

FONTE: www.bio.mtu.edu



(b)

(b) *Gomphosphaeria lacustris*

FONTE: Bicudo e Bicudo (1970)

As cianobactérias reproduzem-se de forma assexuada; como nas demais bactérias, a divisão celular ocorre por crescimento e invaginação da parede celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000). A reprodução acontece por um processo denominado fissão binária, no qual as células, individualmente, dividem-se em duas células filhas de tamanho aproximadamente igual; anteriormente à divisão celular, os conteúdos celulares se duplicam e o nucleóide também é duplicado (Trabulsi *et al.*,

1999), não se dividindo por mitose tal como ocorre nas algas e nos organismos superiores.

As cianobactérias não possuem cílios, nem flagelos como as bactérias; por esse motivo toda a sua mobilidade está relacionada à expulsão de material orgânico produzido pelas células (MARGALEF, 1983). Segundo Drum e Hopkins (1965), as cianobactérias ejetam materiais extracelulares, processo que resulta em locomoção sem cílios ou flagelos ou, no caso de espécies filamentosas, por movimentos deslizantes e de rotação (PELCZAR *et al.*, 1996; JUNQUEIRA e CANEIRO, 2000).

Além de clorofila-a, as cianobactérias possuem outros pigmentos protéicos solúveis em água, genericamente denominados ficobilinas (PELCZAR *et al.*, op. cit.). As ficobilinas são comumente responsáveis pela variabilidade de cores das cianobactérias: ficocianina (azul), ficoeritrina (vermelha) (Junqueira e Carneiro, op. cit.) e as xantofilas, pigmentos acessórios que são carotenóides amarelados (CURTIS, 1977).

Segundo Yoo *et al.* (1995), uma das ficobilinas, a ficocianina, parece ser azul porque absorve comprimentos de onda de luz na banda vermelha do espectro, e reflete na banda azul. A ficocianina atua como pigmento acessório durante a fotossíntese, pela fixação da energia luminosa principalmente na banda vermelha, especialmente entre 625 a 630nm. A combinação do efeito visual verde-azulado da ficocianina e o verde da clorofila-a criam a aparência azul-esverdeada dos microrganismos, motivo pelo qual os fototróficos oxigênicos freqüentemente são denominados cianobactérias, que significa bactérias azuis (PELCZAR *et al.*, op. cit.).

De forma diferente da ficocianina, a clorofila-a fixa luz principalmente no comprimento de onda do azul; assim a cianobactéria tem vantagem ecológica no ambiente aquático, porque pode utilizar luz em ambos os extremos do espectro visível, inclusive no comprimento de onda vermelho, que penetra até o fundo da coluna de água e também no comprimento do azul que, geralmente, extingue-se em menor profundidade (YOO *et al.*, op. cit.; PAERL, 1988a).

O sistema fotossintético das cianobactérias é formado por sacos membranosos, achatados e concêntricos, entre os quais encontram-se grânulos de 40nm de diâmetro, presos à suas paredes externas. Esses grânulos, denominados cianossomos, contêm a ficocianina e a ficoeritrina, e a estrutura membranosa contém a clorofila e outros compostos do sistema fotossintético. A energia solar, absorvida pela ficocianina e pela ficoeritrina, posteriormente é transferida para as membranas que contêm clorofila, onde ocorre a fotossíntese (JUNQUEIRA e CARNEIRO op. cit.; PELCZAR *et al.*, op. cit.).

Devido às características fisio-morfológicas, as cianobactérias são organismos que apresentam extraordinária capacidade adaptativa aos mais diversos ambientes, por isso são consideradas excelentes colonizadores ambientais, o que propiciou grande vantagem ao processo evolutivo em relação aos demais organismos fitoplanctônicos.

3.3 Cianotoxinas

“Nada é veneno, tudo é veneno. A diferença está na dose”.

Paracelsus (1493-1451)

Toxina, palavra traduzida do inglês para o português em 1835 (Houaiss, 2001), etimologicamente significa proteína sintetizada por um organismo, a qual é tóxica para seres vivos de outras espécies. Com o tempo, o termo toxina adquiriu novas conotações como veneno e substância venenosa segregada por seres vivos, que podem provocar danos a seres de outras espécies.

Vários autores referem que, em situações de estresse, as cianobactérias produzem toxinas chamadas cianotoxinas. As causas para essa produção ainda não estão bem esclarecidas, mas alguns pesquisadores acreditam que as cianotoxinas desempenham funções protetoras contra espécies zooplanctônicas, seus predadores primários – tal como fazem algumas plantas vasculares ao produzirem taninos, fenóis, alcalóides ou esteróides – para poderem se proteger contra predadores e não apenas como repostas às condições físico-químicas do ambiente.

Segundo Magalhães *et.al.* (2001), geralmente a exposição humana às cianotoxinas pode acontecer por diferentes maneiras, como: contato com águas por inalação, ingestão oral e intravenosa (em caso de tratamento de hemodiálise) e ingestão de peixes e moluscos, que se alimentaram de cianobactérias, acumulando suas toxinas.

Proença e Villac (2003) e Yunes *et al.* (2003) relataram que as cianotoxinas detectadas em águas epicontinentais incluem as hepatotoxinas e neurotoxinas: microcistinas (LR, YR, AR, Dleu1-LR, anatoxina-a, anatoxina a (s)) e diversas congêneres das saxitoxinas (STX, NeoSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4).

As cianobactérias são consideradas rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos, isto é, de compostos não utilizados por esses organismos em seu

metabolismo primário, muitos dos quais com possível potencial farmacológico (CARMICHAEL, 1992).

Segundo Nobre (1997) e Paerl *et al.* (2001), as cianotoxinas podem ser agrupadas em duas categorias: endotoxinas e exotoxinas.

As endotoxinas são constituintes da parede celular das cianobactérias, armazenadas no seu interior e liberadas para a água quando as células morrem, quando estão no estágio de senescência ou sob estresse celular.

As exotoxinas são proteínas bacterianas com ação tóxica poderosa, secretadas em baixas concentrações. São produzidas por quase todos os organismos gram-positivos e gram-negativos. Algumas exotoxinas são enzimas (Black, 2002) formadas em todos os estágios de crescimento da célula. Segundo Trabulsi *et al.* (1999), de acordo com seu lugar de ação, as exotoxinas podem ser divididas em três grupos:

- Toxinas que atuam na membrana citoplasmática, interferindo em mecanismos de sinalização da célula; pertence a este grupo a toxina termoestável de *Escherichia coli*.
- Toxinas que alteram a permeabilidade da membrana celular, como as toxinas que formam poros (estreptolisina, listeriolisina, hemolisina de *Escherichia coli*) ou que dissolvem a membrana, como a fosfolipase C das riquetsias.
- Toxinas que atuam no interior da célula, modificando enzimaticamente alvos citosólicos e que podem ser divididas em seis grupos, de acordo com o tipo de atividade enzimática.

Segundo suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser reunidas em três grupos:

- **Alcalóides**

Grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, que têm como similaridade molecular mais significativa a presença de nitrogênio na forma de amina e, raramente, na forma de amida (LARCHER, 2000). Há várias classes de alcalóides e todas elas apresentam alguma ação fisiológica, geralmente sobre o sistema nervoso central. O homem, para produção de drogas medicinais como morfina, estriçnina e atropina, tem utilizado alcalóides que podem causar alucinações (AZEVEDO, 1998; LARCHER, op.cit.). Os alcalóides podem ser neurotóxicos (anatoxinas e saxitoxinas); citotóxicos

(cylindrospermopsinas) ou dermatotóxicos (aplysiatoxinas e lyngbyatoxina). Eles são produzidos por espécies dos gêneros: *Anabaena* sp., *Planktothrix* sp. / *Oscillatoria* sp., *Aphanizomenon* sp., *Lyngbya* sp., *Schizothrix* sp., *Cylindrospermopsis* sp. e *Umezakia* sp. (SIVONEN e JONES, 1999).

● Peptídeos Cíclicos Hepatotóxicos

São biomoléculas que podem conter desde dois a dezenas de fragmentos de aminoácidos (SALOMON *et al.*, 1996). Esses aminoácidos são unidos, entre si, por meio de ligações peptídicas (PELCZAR *et al.*, 1996). São produzidos pelos gêneros *Microcystis* sp., *Nodularia* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Cylindrospermopsis* sp. (CARMICHAEL, 1992).

● Lipopolissacarídeos (LPS)

São compostos por polissacarídeos e por lipídio A (endotoxina); presentes na composição da parede das células de organismos procariontes, bactérias gram-negativas (KELETI *et al.*, 1981). Esses compostos são encontrados em todas as cianobactérias, pois são constituintes de sua parede celular.

O lipídeo A é um glicofosfolipídeo, cujo papel biológico consiste em participar dos mecanismos de patogenicidade de células bacterianas gram-negativas. Essa endotoxina é um antígeno fraco, a não ser quando presente em doses elevadas. Esse antígeno não utiliza mecanismos enzimáticos para danificar as células (BLACK, 2002).

Os antígenos, livremente formados no interior da célula, ficam dispersos no citoplasma; como não existem estruturas secretoras, atingem o meio aquático através da membrana celular formada por substância dialisável, sem passar por qualquer canal excretor (PÁDUA, 2002). Uma possível explicação para a multiplicidade de existência das endotoxinas é a variabilidade genética dos LPS de diferentes microrganismos, uma vez que eles são componentes estruturais das membranas das bactérias gram-negativas (BLACK, *op. cit.*). Os LPS apresentam grande número de atividades biológicas, desempenhando importante papel em manifestações clínicas como inflamação, febre, coagulação intravascular e choque (TRABULSI *et al.*, 1999).

Em função da ação farmacológica, as cianotoxinas são classificadas em: Neurotoxinas; Hepatotoxinas; Endotoxinas (Lipopolissacarídeos – LPS).

3.3.1 Neurotoxinas

Neurotoxina, palavra originária do grego *neûrom*, de início teve o sentido denotado de **neura**, palavra que refere-se ao sistema nervoso; etimologicamente, em bioquímica, refere-se à cada uma das várias toxinas existentes em bactérias e em outros microrganismos, as quais atuam especificamente no sistema nervoso (HOUAISS, 2001). Segundo Ferreira (1997), tem a conotação de “cada uma das várias toxinas, de alto poder agressivo, que mesmo em baixa concentração, lesam o sistema nervoso”.

Ao menos cerca de cinco neurotoxinas foram classificadas como alcalóides ou organofosforados que atuam na transmissão dos impulsos nervosos, provocando morte por paradas respiratórias (PEREIRA *et al.*, 1998; ROSET *et al.*, 2001).

As Neurotoxinas são produzidas, principalmente, pelos gêneros: *Anabaena* sp.; *Aphanizomenon* sp.; *Oscillatoria* sp.; *Trichodesmium* sp.; *Lyngbya* sp. e *Cylindrospermopsis* sp. Os três tipos de neurotoxinas produzidas a partir de espécies desses gêneros são: Anatoxina-a, Anatoxina-a (s), Saxitoxinas (SXT), Neosaxitoxinas (Neo-STX) e Homoanatoxina-a (AZEVEDO, 1998).

3.3.1.1 Anatoxina-a

Anatoxina é uma palavra que veio para o português, oriunda do inglês, derivada de *Anabaena flos-aquae*, primeira cianobactéria na qual foi verificada a produção dessa toxina (HOUAISS, op. cit.). A anatoxina pode ser encontrada em *Anabaena* sp. (*flos-aquae-lemmermannii*), *Anabaena planktonica*, *Oscillatoria* sp., *Aphanizomenon* sp. e *Cylindrospermum* sp. (SIVONEN e JONES, 1999).

A anatoxina-a foi a primeira cianotoxina a ser química e funcionalmente definida (Figura 24); trata-se de uma amina secundária (Devlin *et al.*, 1977, Azevedo, 1998; Roset *et al.*, op. cit.), com estrutura semelhante à da cocaína e à do neurotransmissor acetilcolina (WHITTON e POTTS, 2000).

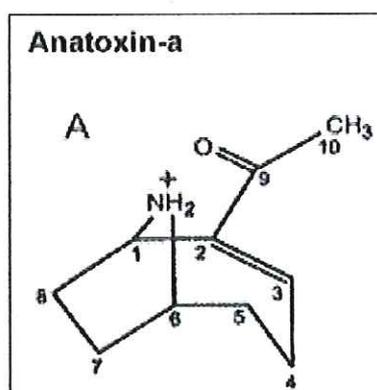


Figura 24- Estrutura química da anatoxina-a

FONTE: Azevedo (1998)

Segundo Azevedo (op. cit.), a anatoxina-a é um potente alcalóide neurotóxico, bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos que se liga, irreversivelmente, a receptores de acetilcolina, pois em células eucariontes não é degradada pela acetilcolinesterase ou por qualquer outra enzima.

Em animais selvagens e domésticos, os sinais de envenenamento por anatoxina-a incluem: desequilíbrio, fasciculação muscular, respiração ofegante, convulsões e cianose. A morte é devida à parada respiratória e ocorre em um período de poucos minutos a horas, dependendo da dosagem e do consumo prévio de alimento (AZEVEDO, op. cit.). Essa autora fez referência a um experimento com camundongos, no qual, para a toxina purificada, a DL_{50} intraperitoneal (i.p.), (dose de um agente tóxico que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos testes, em 24 horas de exposição, segundo NORMA TÉCNICA CETESB L5.025, 1993) foi de 200mg/Kg de peso corpóreo, com tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos. Os líquidos injetados por esta via são rapidamente absorvidos, pelo fato de a cavidade peritoneal oferecer grande superfície de absorção e permitir que as substâncias entrem rapidamente na circulação sanguínea (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Pereira *et al.* (1998) e Whitton e Potts (2000) reportaram que, em condições fisiológicas normais, a acetilcolina liga-se aos seus receptores provocando abertura dos canais de sódio, o que leva ao movimento iônico que induz à contração muscular. A acetilcolinesterase degrada a acetilcolina, impedindo uma super-estimulação das células musculares.

A acetilcolina é o mediador químico necessário à transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré-ganglionares do sistema nervoso antagônico (SNA), em

todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares e em algumas fibras simpáticas pós-ganglionares. É o transmissor neuro-humoral do nervo motor do músculo estriado (placa mioneural) e de algumas sinapses interneurais do sistema nervoso central (SNC). Para haver a transmissão sináptica, é necessário que a acetilcolina seja liberada na fenda sináptica e se ligue a um receptor pós-sináptico. A seguir a acetilcolina (Ach) disponível é hidrolizada pela acetilcolinesterase (AChE) (CALDAS *et al.*, 2000).

Segundo Junqueira e Carneiro (2000), a reposta da transmissão sináptica é extremamente rápida; esse fato é, principalmente, devido à pequena distância que o neurotransmissor atravessa, à riqueza de receptores e à afinidade entre os neurotransmissores e seus receptores. Entretanto, é preciso que o neurotransmissor imediatamente seja inativado, para diminuir o tempo das conexões, ou seja, para “destruir” as sinapses a fim de que não seja afetada a capacidade da transmissão sináptica de graduar sua atividade com precisão.

3.3.1.2 Anatoxina-a (s)

A neurotoxina que recebeu o nome de Anatoxina-a (s) no qual s é denotador da salivação em vertebrados, provoca a mesma sintomatologia da neurotoxina anatoxina-a, acrescida de intensa salivação. Essa neurotoxina é produzida pela espécie *Anabaena flos-aquae* (MAHMOOD e CARMICHAEL, 1986; MATSUNAGA *et al.*, 1989; WHITTON e POTTS, 2000).

A Anatoxina-a (s), éster organofosforado natural, apresenta mecanismo de ação semelhante ao da Anatoxina-a, pois inibe a ação da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina ligada aos receptores. Estruturalmente e fisiologicamente, ela difere da anotoxina-a e apresenta toxicologia semelhante à dos inseticidas malation e paration (NOBRE, 1997); é caracterizada como N-hidroxi guanidina fosfato de metila (MATSUNAGA *et al.*, op. cit.; AZEVEDO, 1998) (Figura 25); porém, apresenta sintomas semelhantes aos da anatoxina-a, acrescidos da falta de coordenação motora, diarreia, hipersalivação e tremores (WHITTON e POTTS, op. cit.).

Azevedo (op. cit.), em experimento feito com anatoxina-a (s), em camundongos, verificou que a DL₅₀ (i.p) foi de 20 mg/Kg de peso corpóreo, o que evidenciou ser a

toxicidade da anatoxina-a (s) dez vezes mais potente que a da anatoxina-a. Não têm sido detectadas estruturas variantes de anatoxina-a (s) (SIVONEN e JONES 1999).

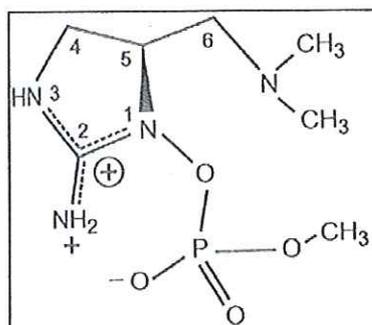


Figura 25- Estrutura química: anatoxina-a (s)

FONTE: Sivonen e Jones (1999)

Os modos de ação da anatoxina-a e da anatoxina-a (s) são muito semelhantes e se dão nas células nervosas, os neurônios, que são unidades sinalizadoras elementares do sistema nervoso (KANDEL *et al.*, 2000). Quando a extremidade de uma célula nervosa é estimulada, ela sofre modificações eletroquímicas, chamadas impulsos nervosos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000); os músculos são os principais alvos dessa estimulação.

Em um neurônio em repouso, não estimulado, há acúmulo de íons negativos na face interna da membrana celular e, conseqüentemente, igual acúmulo de íons positivos na parte externa da membrana. Essa situação é denominada polarização (KANDEL *et al.*, *op. cit.*).

Se a membrana do neurônio não for estimulada, não haverá alteração do potencial de repouso; mas qualquer estímulo aplicado sobre a membrana provoca imediata alteração: seu lado interno torna-se positivo e o lado externo, negativo.

Os íons positivos (Na^+) atravessam a membrana e, em um caminho unidirecional, permitem a passagem do impulso nervoso de uma célula à outra por meio de uma substância chamada neurotransmissor, que estabelece conexões nervosas entre as células – as sinapses. Esse neurotransmissor ou mediador químico, geralmente, é a acetilcolina. Neste caso, a desconexão das células nervosas, ou seja, a destruição das sinapses é feita pela acetilcolinesterase (KANDEL *et al.*, *op. cit.*). Segundo Caldas *et al.* (2000), a acetilcolina é sintetizada a partir de acetilcoenzima A e de colina. Sob a ação

de acetilcolinesterase, ela é inativada por hidrólise com formação de colina e ácido acético que são reutilizados para a formação de acetilcolina.

Junqueira e Carneiro (2000) afirmaram que é muito grande a variedade de moléculas neurotransmissoras: adrenalina, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico ou GABA (gama-amino-butiric acid).

A ação da anatoxina-a e da anatoxina-a (s); conforme mostra a Figura 26(b) e (c), tem semelhanças com a acetilcolina e ocupa seu lugar, com conseqüente contração muscular, porque a acetilcolinesterase não tem o poder de degradar a anatoxina-a e a anatoxina-a (s). As células permanecem, então, super-estimuladas, fato que acarreta muitos problemas e pode, até mesmo, levar a vítima a óbito.

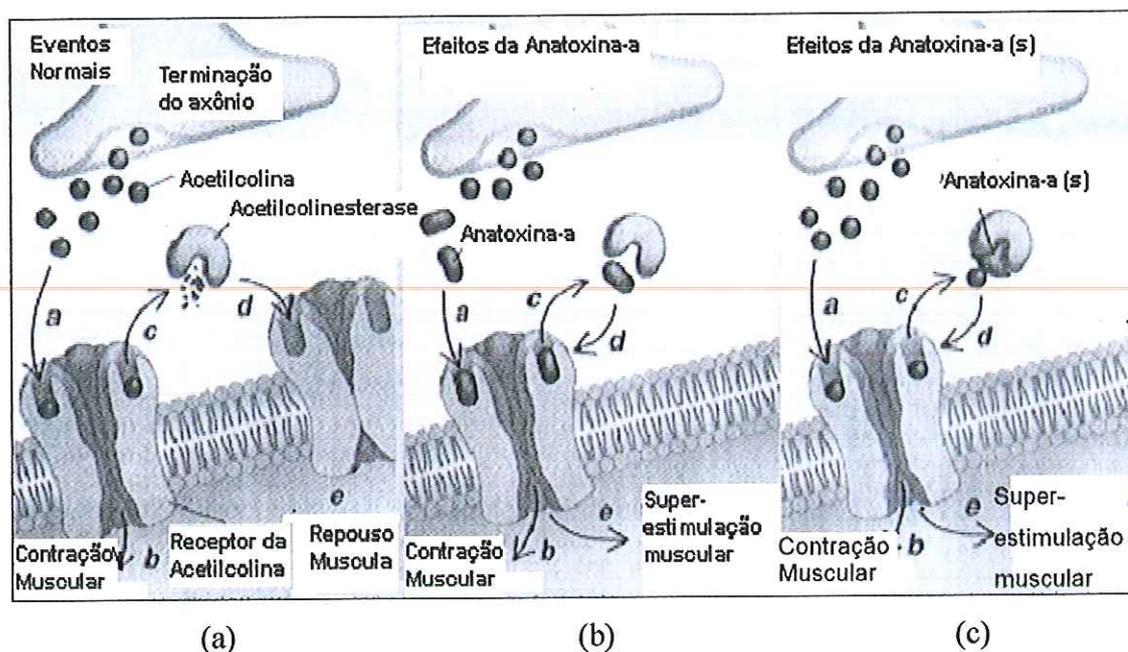


Figura 26: (a) Estimulação normal na contração muscular. (b) Efeitos da anatoxina-a na contração muscular (c) Efeitos da anatoxina-a (s) na contração muscular.

FONTE: Pereira *et al.*, 1998

3.3.1.3 Saxitoxina e Neosaxitoxina

Outras neurotoxinas também nocivas – as toxinas **PSP** - *Paralytic Selfish Poison* - em português significa veneno paralisante de mariscos, são a saxitoxina e a

neosaxitoxina – alcalóides carbamatos (Figura 27) que impedem a interrupção da comunicação entre neurônios e células musculares, pelo do bloqueamento dos canais de sódio (PEREIRA *et al.*, 1998; ROSET, *et al.*, 2001).

Segundo Carmichael (1994a), essas toxinas inicialmente foram encontradas em dinoflagelados marinhos, responsáveis por florações chamadas marés vermelhas; posteriormente, foram encontradas nos gêneros de cianobactérias: *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Lyngbia* sp. e *Cylindrospermopsis* sp.

As PSPs são alcalóides neurotóxicos, primeiramente encontrados na cianobactéria *Aphanizomenon flos-aquae*. Por isso, de forma geral, são chamadas Afanotoxinas (saxitoxinas - STX e neosaxitoxinas) (WHITTON e POTTS, 2000).

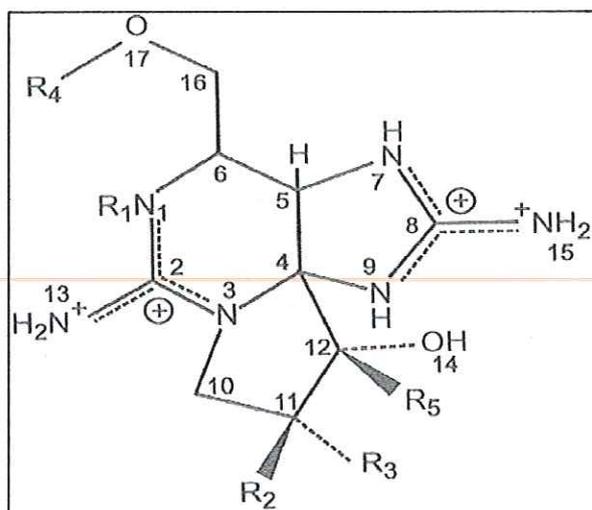


Figura 27: Estrutura geral: saxitoxinas

FONTE: Azevedo (1998)

A ingestão dessas toxinas impede a ação dos neurônios nas células musculares, com a seguinte sintomatologia: tontura, adormecimento da boca e extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia (AZEVEDO, *op. cit.*). Segundo Carmichael (1994b), em intoxicações com doses letais, os primeiros sintomas podem aparecer 5 minutos após a ingestão, e a morte acontece de 2 a 12 horas; em casos de intoxicação com dose não letal, os sintomas desaparecem entre 1 e 6 dias.

Em experimentos feitos em camundongos, a DL_{50} (i.p.) para saxitoxina purificada foi de 10 mg/kg de peso corpóreo (AZEVEDO, *op.cit.*). Em consumo oral, a DL_{50} é de aproximadamente 263,0 μ m/kg de peso corpóreo (SIVONEN e JONES

1999). A saxitoxina purificada apresenta toxicidade maior que a de anatoxina-a e a anatoxina-a (s).

Sivonen e Jones (1999) referiram que ainda não existiam dados suficientes para estabelecer-se um limite máximo de concentração aceitável para as saxitoxinas em água potável. A Portaria nº518, de 25 de Março de 2004 do Ministério da Saúde, recomenda que as análises para saxitoxinas devem observar os valores limites de 3,0 µg/L.

A Figura 28a mostra a ação da saxitoxina e da neosaxitoxina bloqueando os canais, chamados canais de sódio. O bloqueio do canal de sódio impede a propagação do impulso nervoso. Na figura 28b é possível observar eventos normais da propagação do impulso nervoso.

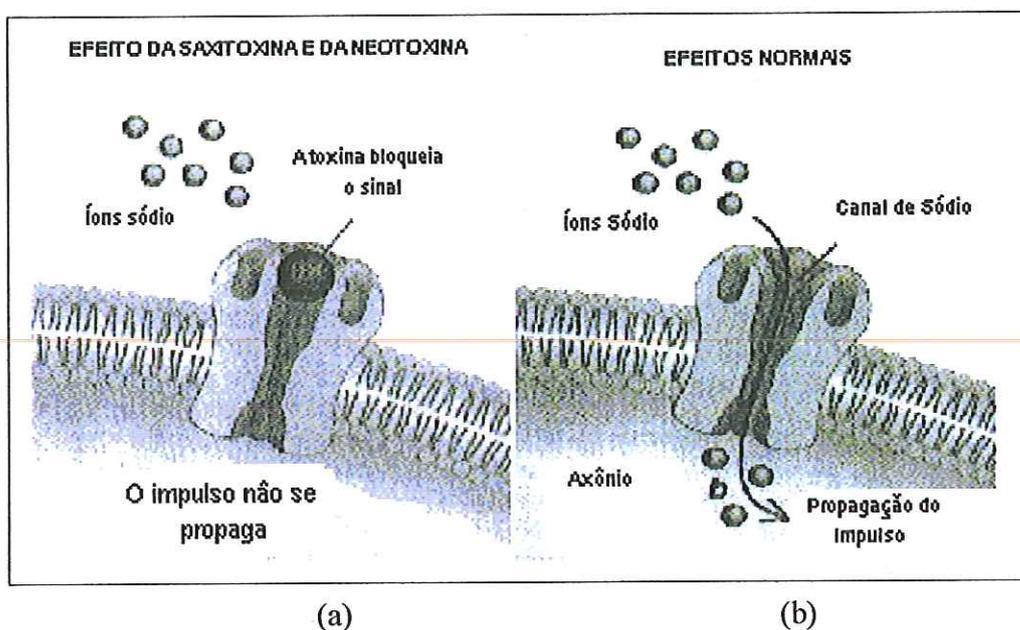


Figura 28: (a) Efeitos da saxitoxina e da neosaxitoxina na propagação do impulso nervoso. (b) Eventos normais da propagação do impulso nervoso

FONTE: Pereira *et al.* (1998)

3.3.1.4 Homoanatoxina-a

Whitton e Potts (2000) reportaram que a homoanatoxina-a (Figura 29), encontrada na espécie *Oscillatoria formosa*, caracteriza-se como amina secundária. É um alcalóide similar à anatoxina-a, que age como potente bloqueador neuromuscular; em doses letais conduz à paralisia corporal, convulsões e morte por parada respiratória.

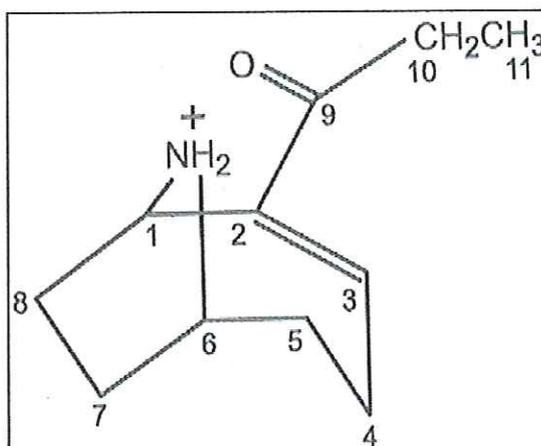


Figura 29: Estrutura química: homoanatoxina-a

FONTE: Sivonen e Jones (1999)

3.3.2 Hepatotoxinas

Hepatotoxinas, do grego *hépatos* que significa fígado + toxina, etimologicamente, significa substância que intoxica o fígado (HOUAISS, 2001).

As mais comuns intoxicações por cianobactérias, segundo Carmichael (1991), Pereira *et al.* (1998) e Roset *et al.* (2001), são provocadas por hepatotoxinas – peptídeos cíclicos hepatotóxicos.

De acordo com Whitton e Potts (2000) e Sivonen e Jones (1999), as microcistinas que foram isoladas de *Microcystis* sp. e dos gêneros *Anabaena flos-aquae*, *Nostoc rivulare* e *Oscillatoria agradhii* são classificadas como heptapeptídeos (formadas por 7 aminoácidos) (Figura 30) e as nodularinas, isoladas de *Nodularia spumigena*, como pentapeptídeos cíclicos (5 aminoácidos) (Figura 31).

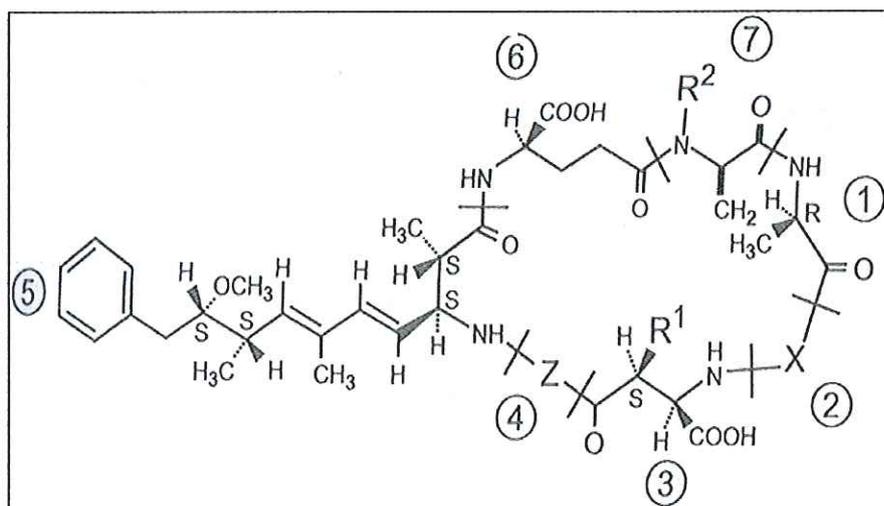


Figura 30- Estrutura química da hepatotoxina: Microscistina

FONTE: Sivonen e Jones (1999)

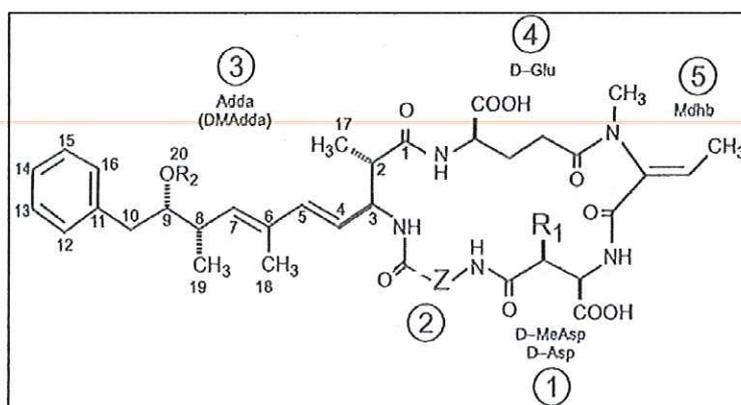


Figura 31: Estrutura química geral das Nodularinas

FONTE: Sivonen e Jones (1999)

Com relação à estrutura geral das nodularinas, -D-eritro- β -metilAsp-L-Arg-ADDA-D-Glu_n-metildihidrobutorino, e das microcistinas, D-Ala-X-D-MeAps-Z-Adda-D-Glu-Mdha, X e Z são dois L aminoácidos variáveis; D-MeAsp é D-eritro ácido metilaspártico; Mdha é N-metildeidroalanina e ADDA é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico (CARMICHAEL, 1992). Atualmente são conhecidas mais de 8 nodularinas, classificadas de acordo com a variação do grau de metilação, da composição e da isomeração de seus aminoácidos (ROSET *et al.*2001).

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael *et al.*, (1988a e b). Inicialmente, foram usadas apenas as variações qualitativas observadas em seus dois

L-aminoácidos para designar as diferentes microcistinas; por exemplo microcistina-LR (leucina-arginina); -RR (arginina-arginina); -YA (tirosina-alanina) (AZEVEDO, 1998).

O primeiro relato de envenenamento por hepatotoxinas refere-se a *Microcystis aeruginosa*; por isso, mais tarde essa toxina foi denominada microcistina (CARMICHAEL, 1991). Nobre (1997) relatou que as microcistinas são mais tóxicas do que o inseticida sintético malation e 12 vezes mais tóxica do que 2,3,7,8-TCDD para camundongos, com DL₅₀ menor que 5 mg/Kg – supertóxicos.

Whitton e Potts (2000) relataram que de *Oscillatoria agardhii* foram isoladas mais de 60 variedades de microcistinas; as diferenças foram verificadas no grau de metilação dos aminoácidos. Estudos feitos em laboratório afirmaram que a DL₅₀ (i.p.) ficou entre 25 e 150 µg/Kg de peso corpóreo (SIVONEN e JONES, 1999). A microcistina- LR – Mcist- LR é a hepatotoxina mais tóxica e mais comumente encontrada em água doce (CARMICHAEL, 1992; PINHO *et al.*, 2003).

As cilindrospermopsinas, também peptídicas, são classificadas como alcalóides guanídicos cíclicos (BRASIL, 2004) (Figura 32). Foram isoladas das espécies *Cylindrospermopsis raciborskii*, na Austrália, *Umezakia natans*, no Japão, *Aphanizomenon ovalisporum*, em Israel e na Austrália e apresentam sintomatologias semelhantes às demais hepatotoxinas (WHITTON e POTTS, 2000).

Tem se observado, nos últimos anos, maior frequência de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii* em regiões tropicais eutrofizadas (principalmente em reservatórios brasileiros). Essas cianobactérias são produtoras das toxinas: cilindrospermopsinas, alcalóides com ações no fígado e rins e PSPs, potente toxina paralisante que age no sistema neuromuscular (TUCCI e SANT'ANNA, 2003).

O sucesso ecológico de *Cylindrospermopsis raciborskii*, segundo Padisák (1997), está relacionado à capacidade de migração na coluna de água, tolerância à baixa luminosidade, habilidade em utilizar fontes internas de fósforo, afinidade com fósforo e amônia, capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, resistência à herbivoria pelo zooplâncton, grande capacidade de dispersão por meio de acinetos e adaptação em condições de baixa salinidade.

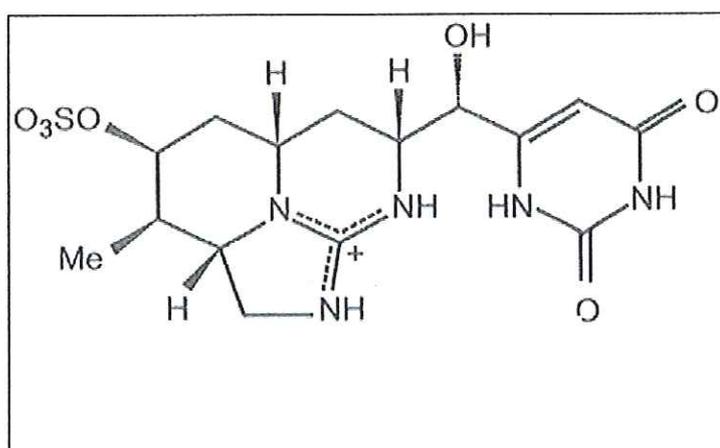


Figura 32- Estrutura química da hepatotoxina: Cilindrospermopsina

FONTE: Sivonen e Jones (1999)

Segundo Carmichael (1994a), as hepatotoxinas, que chegam por meio de receptores dos ácidos biliares, promovem desorganização do citoesqueleto dos hepatócitos, com conseqüente perda da estrutura do fígado, provocando sua retração e aumento dos espaços intercelulares. Como as células dos capilares sinusoidais se retraem, o sangue passa a fluir destes para esses espaços intercelulares formados, provocando lesões tecidulares e, muitas vezes, choque hipovolêmico (Figura 33b).

Estudos recentes demonstraram que as microcistinas são potentes inibidores das fosfatases protéicas do fígado – enzimas que, em conjunto com as cinases protéicas, regulam o mecanismo de fosforilação e desfosforilação das proteínas, desempenhando importante papel na divisão celular. A inibição das fosfatases afeta o equilíbrio de fosforilação-desfosforilação, o que induz à proliferação celular. Em caso de exposição a doses não letais, o risco é devido à possibilidade das hepatotoxinas serem causadoras de tumores hepáticos.

Em laboratório, os sintomas de envenenamento em camundongos, ratos e coelhos incluem: anorexia, diarreia, palidez das mucosas, vômitos, fraqueza e morte - entre 5 minutos a 2 horas, dependendo da dose (BROOKS e CODD, 1986)- devidas a hemorragias intra-hepáticas, necrose e desintegração da estrutura do fígado (WHITTON e POTTS, 2000)

Em estudos laboratoriais realizados por Salomon *et al.* (1996), com o intuito de verificar a toxicidade de *Microcystis aeruginosa*, foram aplicados intraperitonealmente extratos dessa cianobactéria em camundongos. Cortes histológicos de tecidos do fígado permitiram observar o aumento do volume e da massa hepática dos animais que

receberam maiores doses. Em indivíduos controle, a proporção do peso do fígado ficou em torno de 5 – 6% e em indivíduos que receberam as maiores doses, essa proporção subiu para 8 – 9%. Nos cortes histológicos do fígado de animais expostos houve visível diferença em relação à estrutura do parênquima hepático, que apresentou aspecto congestivo e hemorrágico. A luz dos vasos, inclusive dos sinusóides, ficou repleta de glóbulos sanguíneos e houve intensa vesiculação no citoplasma dos hepatócitos. Tal alteração pode ser vista na Figura 33b.

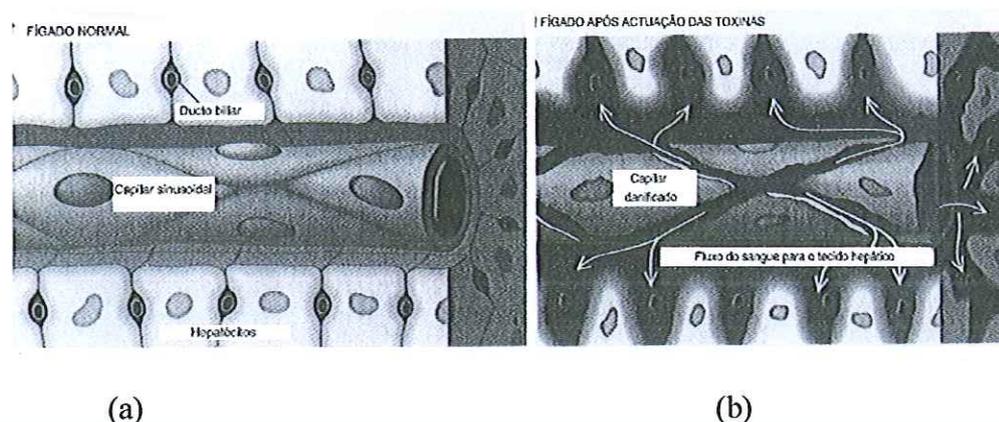


Figura 33 (a) Fígado Normal. (b) Fígado após atuação de hepatotoxinas.

FONTE: Pereira *et al.* (1998)

3.3.3 Dermatotoxinas

Dermatotoxina, palavra oriunda do grego *derma*, que significa derme ou pele + toxina, foi dicionarizada em português, em 1813, praticamente com o mesmo significado que hoje a ciência lhe dá (HOUAISS, 2001).

As dermatotoxinas, toxinas irritantes ao contato, são compostos tóxicos produzidos por cianobactérias, porém causadoras de danos menores que os causados por hepatotoxinas e neurotoxinas (PEREIRA *et al.*, 1998). São produzidas por todos os gêneros de cianobactérias. Os LPS são integrantes da parede celular de cianobactérias e de outras bactérias, como *Salmonella* sp. (SIVONEN e JONES, 1999). No entanto segundo Kuiper-Goodman *et al.* (1999) os LPS das cianobactérias são menos tóxicos que os LPS de outras bactérias como *Salmonella*.

O contato direto com a dermatotoxina produzida por cianobactérias pode ocorrer acidentalmente ou quando da prática de esportes aquáticos. Desses contatos surgem as sintomatologias: vermelhidão e lesões na pele; irritação nos olhos, conjuntivite; urticária, obstrução nasal e asma. São citados casos de dermatites de contato em humanos, associados ao uso de água de recreação (CARMICHAEL, 1981). Segundo Amorim (1997), as estruturas dessas toxinas ainda são pouco conhecidas. Na tabela 2 constam as possibilidades de exposições do homem às cianotoxinas.

Tabela 2 : Algumas possíveis rotas de exposição às toxinas de cianobactérias, presentes em águas continentais (C), águas de transição (T) ou marinhas (M).

Rota de exposição	Melo	Atividade
Contato com pele	C, T, M	1- Atividades recreativas, contato direto com água superficial ou florações de cianobactérias tóxicas.
	C, T, M	2- Atividades recreativas ou laboratoriais com contato direto com águas com florações tóxicas.
	C	3- Banho, com água tratada contendo cianotoxinas.
Ingestão de água	C, T, M	1- Ingestão acidental de cianobactéria tóxica.
	C	2- Ingestão de água natural com florações tóxicas e ou cianotoxinas livres.
	C	3- Ingestão de água tratada que contenha cianotoxinas.
Inalação	C, T, M	1- Ducha, práticas laboratoriais, esportes aquáticos.
Consumo de alimentos	C, T, M	1- Moluscos ou outros produtos de maricultura contendo cianotoxinas.
	C, T	2- Consumo de produtos vegetais com acúmulo de cianotoxinas por regação.
Hemodiálise	C	1- Utilização de água contendo cianotoxinas na hemodiálise.

Fonte: Adaptado ROSET *et al.*, (2001)

Segundo Sivonen e Jones (1999), os principais gêneros de cianobactérias, suas cianotoxinas e seus alvos primários em mamífero, encontram-se a seguir na Tabela 3.

Tabela 3: Cianotoxinas, alvo primário em mamíferos e gêneros responsáveis pela produção.

GRUPO DA TOXINA	ALVO PRIMÁRIO EM MAMÍFEROS	GÊNEROS DE CIANOBACTÉRIA
Peptídeos cíclicos		
Microcistina	Fígado	<i>Microcystis</i> sp., <i>Anabaena</i> sp.,
		<i>Planktothrix</i> sp. (<i>Oscillatoria</i> sp.),
		<i>Nostoc</i> sp.,
		<i>Hapalosiphon</i> sp., <i>Anabaenopsis</i> sp.
Nodularina	Fígado	<i>Nodularia</i> sp.
Alcalóides		
Anatoxina-a	Nervo sináptico	<i>Anabena</i> sp., <i>Planktothrix</i> sp.
		(<i>Oscillatoria</i> sp.), <i>Aphanizomenon</i> sp.
Anatoxina-a (s)	Nervo sináptico	<i>Anabena</i> sp.
Aplisiotoxina	Pele	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Schizothrix</i> sp.,
		<i>Planktothrix</i> sp.
		(<i>Oscillatoria</i> sp.)
Cylindrospermopsina	Fígado	<i>Cylindrospermopsis</i> sp.,
		<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Umezakia</i> sp.
Lyngbyatoxina-a	Pele, trato	<i>Lyngbya</i> sp.
	gastrointestinal	
Saxitoxina	Nervo axônico	<i>Anabaena</i> sp., <i>Aphanizomenon</i> sp.,
		<i>Lyngbya</i> sp., <i>Cylindrospermopsis</i> sp.
Lipopolissacarídeos		
(LPS)	Qualquer contato	Todos

Fonte: SIVONEN e JONES (1999).

A toxicidade das cianobactérias varia de espécie para espécie; dentro dos gêneros pode haver cepas produtoras e não produtoras de toxinas (ZAGATTO e ARAGÃO, 1997; ZAGATTO 2001). As cianobactérias produtoras de toxinas são constante fonte de preocupação para os operadores de estações de tratamento de água, não somente pela biomassa, mas também pela produção de toxinas que parece estar intimamente relacionada a fatores ambientais.

As espécies associadas às florações de algas tóxicas, no mundo todo, aparentemente são influenciadas por diferenças regionais climáticas, diferenças químicas da água, morfologia da bacia e, particularmente, pela profundidade e transparência da água (YOO *et al.*, 1995).

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

No Brasil são relatados alguns casos, dos quais o mais grave foi o episódio de Caruaru, em 1996, quando 123 pacientes de uma clínica de hemodiálise tiveram quadro clínico indicativo de síndrome de intoxicação hepática; 60 desses pacientes foram a óbito. A investigação revelou que a intoxicação foi devida à contaminação da água da hemodiálise por cianotoxinas (AZEVEDO, 1998).

Segundo Freitas (1998) e Proença (2000), a exposição de cianotoxinas aos seres humanos estaria também associada ao seu acúmulo ao longo da cadeia trófica. Magalhães *et al* (1999) relataram que estudos realizados em um ecossistema do litoral do Rio de Janeiro demonstraram que as hepatotoxinas acumuladas ao longo da cadeia trófica, por peixes, pode chegar aos consumidores em níveis preocupantes. Segundo Soares *et. al.* (1999), relataram que o acúmulo de microcistinas em tecidos de peixes pode ser rápido, com maior acumulação na musculatura. Entretanto, os mesmos autores relataram que os estudos indicam que o peixe ao parar de ingerir essas toxinas, é capaz de depurá-las. Eles concluíram que a taxa e a velocidade do acúmulo das cianotoxinas variam dependendo da maneira que ela é oferecida; dessa forma, os valores podem ser potencializados com o aumento das florações de cianobactérias potencialmente tóxicas. Mas, geralmente, os peixes parecem ser pouco sensíveis à ação de cianotoxinas e freqüentemente tornam-se veículos da toxina para outros animais.

Odebrecht *et al* (2002) relataram haver relação direta entre condições nutritivas e produção de cianotoxinas, isto é, com o aumento da concentração de nutrientes, há

aumento significativo na produção de cianotoxinas, por unidade de volume de água, devido ao aumento da biomassa de cianobactérias.

Vários fatores promovem a liberação das cianotoxinas pelas cianobactérias: algicidas como sulfato de cobre e sulfato de cloro, o estresse celular devido a condições ambientais desfavoráveis e a senescência, que é causa natural. A liberação das toxinas, que sempre ocorre após a lise celular, pode causar sérios riscos à integridade ambiental (YOO *et al.*, 1995 e PÁDUA, 2002).

Dados sobre conteúdos protéicos e de carboidratos de algumas cianobactérias sugerem que elas podem representar uma fonte de alimento de considerável valor nutritivo para o zooplâncton; no entanto, investigações limnológicas realizadas em ambientes eutróficos, nos quais são freqüentes as florações de *Microcystis aeruginosa*, registraram mudanças na composição do zooplâncton (FULTON e PAERL, 1987a). Isto foi corroborado por Ribeiro *et al.* (1997), em experimentos feitos em tanques de piscicultura, onde a população zooplânctônica reduziu-se após o aparecimento de florações de *Microcystis* sp. e *Anabaena* sp..

Em interações fito-zooplânctônicas, além do papel dos organismos fitoplânctônicos na nutrição do zooplâncton – no que diz respeito à concentração e qualidade nutricional do alimento – devem, também, ser considerados os efeitos associados à possível toxicidade, pois os organismos do fitoplâncton que se mostram tóxicos aos vertebrados nem sempre são nocivos, também, aos invertebrados planctônicos (HAWKINS e LAMPERT, 1989). Segundo estudos feitos por Faintuch (1989), a utilização de cianobactérias como fonte de proteínas e vitaminas é muito antiga (século XVI); algumas espécies, como *Spirulina maxima*, são bastante aproveitadas como complemento na alimentação humana e animal, por apresentar alto teor de aminoácidos essenciais. Segundo a mesma autora, o gênero *Oscillatoria* sp. apresenta também elevados níveis protéicos, entretanto seu uso na alimentação humana ou na ração animal é restrito, por possuir sabor e odor pouco atraentes e a capacidade de produção de hepatotoxinas. Conseqüentemente, os efeitos das florações estão diretamente relacionados às características da espécie fitoplânctônica, às taxas de ingestão destas e à digestibilidade do alimento (PORTER, 1973; TALAMONI, 1995).

Efeitos tóxicos podem incluir letalidade, mortalidade e efeitos subletais como mudanças no crescimento, desenvolvimento, reprodução, patologia e comportamento – efeitos que podem ser expressos por meio de critérios quantitativos como número de organismos mortos, mudanças no peso, inibição enzimática e outros (TALAMONI,

1995). A mesma autora reportou que, freqüentemente, as concentrações de cianobactérias são suficientes para provocar efeitos danosos aos organismos, efeitos tais que possam afetar seu desenvolvimento; com maior freqüência isso pode ocorrer em ocasiões nas quais os fatores ambientais favoreçam o desenvolvimento de espécies cujas toxicidades, eventualmente comprovadas, representam o mais abundante alimento do ambiente, o que faz da herbivoria um dos principais fatores que alteram a biomassa fitoplanctônica.

Há indicações da herbivoria do zooplâncton poder reduzir a biomassa de populações de cianobactérias, desde que os organismos zooplanctônicos estejam presentes antes das cianobactérias atingirem tamanho tal que possam servir de alimento a outros animais que também sejam seus predadores (WHITTON e POTTS, 2000).

Há espécies zooplanctônicas que predam cianobactérias produtoras de toxinas, mas somente o fazem quando da falta de outras fontes de alimento. Acontece que os organismos zooplanctônicos também ingerem toxinas em doses subletais, por isso, ainda que haja descréscimo de suas capacidades reprodutivas, esses indivíduos sobrevivem a essa ingestão, o que é motivo de interesse para o controle das cianobactérias (PEREIRA *et al.*, 1998).

3.4 Fatores que Determinam a Degradação de Cianotoxinas

Os vários grupos de cianotoxinas: microcistinas – anatoxinas (anatoxina-a e anatoxina-a (s); PSPs (saxitoxinas) e cilindrospermopsinas – exibem diferentes estabilidade química e degradação biológica, nos diversos ecossistemas aquáticos (SIVONEN e JONES, 1999).

3.4.1 Microcistinas

Em pH próximo à neutralidade, as microcistinas são extremamente estáveis, resistentes à hidrólise química e à oxidação; as microcistinas e as nodularinas mantêm sua toxicidade mesmo após fervura.

No escuro, em condições naturais, as microcistinas resistem por meses ou anos (SIVONEN e JONES, 1999). Em pH alto ou baixo e em temperatura elevada (superior à 40°C) têm sido observadas lentas hidrólises, sendo necessário, em pH 1, aproximadamente 10 semanas e em pH 9, aproximadamente 12 semanas, para a degradação de aproximadamente 90% da concentração total das microcistinas (HARADA *et al.*, 1996³ *apud* SIVONEN e JONES, *op. cit.*).

Tsuji *et al.* (1993) relataram ser lenta a degradação fotoquímica das microcistinas expostas à luz solar, com aumento da taxa da reação em presença de pigmentos fotossintéticos hidrossolúveis, presumidamente ficobiliproteínas. Em presença desses pigmentos, a degradação fotoquímica de 90% da concentração total de microcistinas pode variar de 6 a 20 semanas, em função da concentração de pigmentos e proteínas. A presença de substâncias húmicas parece acelerar a degradação das microcistinas sob a luz solar (SIVONEN e JONES, *op. cit.*).

Embora as microcistinas sejam resistentes a muitas peptidases de eucariontes e bactérias, elas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias encontradas em ecossistemas aquáticos e efluentes de esgoto. Esse processo de decomposição bacteriana pode levar à degradação de 90% das microcistinas entre 10 a 20 dias, o que depende da concentração inicial dessas toxinas e da temperatura da água (SIVONEN e JONES, *op. cit.*).

Estudos feitos por Salomon *et al.* (2001) mostraram que o aumento da salinidade das águas diminui as concentrações intracelulares de microcistinas e que em condições de estresse salina, esses organismos podem retardar seus processos metabólicos secundários.

3.4.2 Anatoxina-a

A anatoxina-a é relativamente estável no escuro, mas em solução pura e em presença de luz solar sofre rápida degradação fotoquímica, degradação que é acelerada, também, em condições alcalinas (STEVENS e KRIEGER, 1991). Na degradação fotoquímica a meia vida é de 1 a 2 horas. Em condições normais de luz, com pH 8-10 e

³ HARADA, K.-I.; TSUJI, K. E WATANABE, M. F. (1996). Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of the pH and Temperature. *Phycologia*. 35(6), pp.83-88.

baixas concentrações iniciais (10 µg/L), a metade do total de anatoxina-a é degradada em 14 dias (SMITH e SUTTON, 1993⁴ *apud* SIVONEN e JONES, 1999).

A anatoxina-a pode, ainda, ser degradada por bactérias associadas a seus filamentos; é o caso de uma cepa isolada de *Pseudomonas* sp. capaz de degradar anatoxina-a a uma taxa de 6 a 10 µg/mL, a cada 3 dias (KIVIRANTA *et al.*, 1991).

3.4.3 Anatoxina-a (s)

A anatoxina-a(s) decompõe-se rapidamente em condições alcalinas, mas é estável em condições ácidas. Elas são instáveis a temperaturas acima de 4°C (MATSUNAGA *et al.*, 1989).

3.4.4 Saxitoxinas

No escuro e à temperatura ambiente, as saxitoxinas sofrem lentas reações de hidrólise química. As C-toxinas (toxinas possuídas de dois grupamentos sulfatos) perdem seu grupamento N-carbamoilsulfato e se transformam em decarbamoil goniautoxinas (dc-GTX-decarbamoilgoniautoxinas). As decarbamoilsaxitoxinas (dc-GTXs), goniautoxinas (GTXs) e saxitoxinas (STXs) são lentamente degradadas para produtos não tóxicos. O tempo necessário para degradar metade dessas toxinas varia de 1 a 10 semanas; e para degradar 90% mais de três meses (JONES e NEGRI, 1997⁵ *apud* SIVONEN e JONES, *op. cit.*).

As dc-GTX são mais tóxicas que as C-toxinas (10-100 vezes); em função disso pode haver aumento da toxicidade da água durante as três primeiras semanas após ocorrer floração de cianobactérias tóxicas. Ademais, processos de acidificação e fervura aumentam a toxicidade.

⁴ SMITH, C.; SUTTON, A. (1993). The persistence of anatoxin-a in reservoir water. *Foundation for Water Research*, UK Report No. FR0427.

⁵ JONES, G. J.; NEGRI, A.P. (1997). Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research*, v. 31, p. 525-533 .

3.4.5 Cilindropermopsinas

A cilindropermopsina é relativamente estável no escuro, com lenta degradação à altas temperaturas (50°C). A degradação ocorre rapidamente em presença de luz solar e de pigmentos fotossintetizantes; 90% dessa toxina é degradada entre 2 e 3 dias (CHISWELL et al., 1999⁶, *apud* SIVONEN e JONES, 1999).

⁶ CHISWELL, R. K.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K.; SMITH, M.; J.; NORRIS, R.L.; SEAWRIGHT, A. A.; MOORE, M. R. (1999). Stability of cilindropermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindropermopsis raciborskii*. Effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol. Water Qual.* (In Press).

4 Materiais e Métodos

“Faça em sua pesquisa somente aquelas perguntas que você possa responder com técnicas que pode usar. Se não for capaz de aprender a ignorar, questões que não está preparado a responder definitivamente, você jamais responderá pergunta alguma”.

Kurt Lewin (1890-1947)

4.1 Amostragem e Preservação

Segundo Wetzel e Likens (1991), a amostragem de organismos fitoplanctônicos em rios ou lagos e em profundidades conhecidas, devem ser feitas com a garrafa de “Van Dorn”. Redes de plâncton não são recomendadas para análises quantitativas e qualitativas do fitoplâncton, pois uma grande porcentagem das espécies são menores que as dimensões das malhas mais finas.

As espécies fitoplanctônicas devem ser examinadas, preferencialmente enquanto vivas, principalmente as espécies delicadas, como é o caso das algas flageladas. Os organismos podem ser mantidos por várias horas, sem deterioração, quando resfriados. Podendo ser preservados em solução tampão de formol. De acordo com Wetzel e Likens (op. cit.), as amostras podem também ser preservadas em solução de 0,5 a 2% de formalina, embora o formaldeído tenda a causar ruptura, deformação e encolhimento de algumas espécies. Essa solução é conhecida como *Transeau* ou “6-3-1” (seis partes de água, três partes de álcool etílico 95% e uma parte de formalina). A preparação da solução foi descrita por BICUDO e BICUDO (1970). De acordo com Minillo *et al.* (2000), a proporção deverá ser feita na razão 1:1 (1 parte da solução para 1 parte de plâncton). A Norma Técnica da Cetesb L5.303 (1991) recomenda que amostras, para

serem estocadas por mais de um ano, devem ser preservadas com formaldeído 40% neutralizado com NaHCO_3 ; 50 mL/L; a uma concentração final de 4%.

Entretanto a solução mais indicada para preservação é o lugol acético (1:100). A absorção do iodo da solução de lugol pelas células promove a fixação. Costuma-se adicionar à solução de lugol, uma pequena quantia de glicerol, que tem por função prevenir o dessecamento dos organismos (WETZEL e LIKENS, 1991).

4.2 Análises Quantitativa e Qualitativa do Fitoplâncton

Para o exame da composição do fitoplâncton, amostras de água são coletadas com garrafas de “Van Dorn”, em profundidades pré-determinadas, acondicionadas em frascos âmbar e fixadas em lugol acético (10g de iodo, 20g de KI (iodeto de potássio), 200mL de água destilada com 20g de ácido acético). As amostras são guardadas no escuro até o momento da identificação e contagem (CALIJURI, 1985; 1988; 1999).

A identificação do fitoplâncton é feita utilizando-se microscópio com câmara clara e substâncias acessórias para evidenciar determinadas estruturas características do gênero ou espécie. Os organismos são identificados analisando-se as características citomorfológicas, estruturais e morfométricas, tendo como base bibliografia especializada. Normalmente, recomenda-se o sistema de classificação de Komárek e Anagnostidis (1999). Nas espécies coloniais, por exemplo *Microcystis* sp., utiliza-se o diâmetro das células, arranjo das colônias, grau de agregação das células, margem e textura da mucilagem.

A densidade fitoplanctônica é estimada em câmaras ou células de sedimentação. As mais usadas são: Sedwick-Rafter (S-R), Palmer Maloney (P-M), Petroff-Hausser (P-H) e Utermöhl.

Sedwick-Rafter (S-R) é uma lâmina capaz de conter 1 mL de amostra, com a forma de pequena cuba de vidro, com 5 cm de comprimento, 2 cm de largura e 1mm de altura. Ela é usada para a contagem do plâncton por ser facilmente manipulada e permite a obtenção de dados razoavelmente reproduzíveis, quando usada com um microscópio calibrado, equipado com um visor de dispositivo de medida (STANDARD METHODS, 1998).

Wetzel e Likens (1991) reportaram que os organismos fitoplanctônicos, quando preservados em solução de lugol, sedimentam rapidamente (15 minutos) na câmara S-R.

A câmara de S-R não permite alto poder de alcance ao microscópio, em função do que a identificação de organismos menores que 10 a 15 μm , é difícil. Dessa forma o uso da S-R, para células planctônicas, é limitado ao exame de formas maiores de populações densas, podendo ser usada para enumeração e avaliação de tamanho em formas fitoplanctônicas maiores.

Palmer-Maloney (P-M) é uma câmara de método intermediário de ampliação (abaixo de 500x); sendo especificamente indicada para enumeração de fitoplâncton (STANDARD METHODS, 1998). Possui pouca profundidade, permitindo o uso de objetivas de 40 a 45x; a principal desvantagem da lâmina P-M é que essas ampliações, freqüentemente, são insuficientes para identificação e enumeração do nanoplâncton (WETZEL e LIKENS, op. cit.).

Petroff-Hausser (P-H), câmara de método de alta ampliação: o exame de fitoplâncton de alta ampliação requer o uso de óleo de imersão (WETZEL e LIKENS, op. cit.).

Utermöhl, câmara em que se utiliza o método de sedimentação e observação em microscópio invertido, desenvolvido por Utermöhl (1958); é o método mais amplamente aceito. A contagem das espécies é realizada em microscópio invertido, em aumento de 400x. A enumeração dos organismos em campos aleatórios produz estimativas mais próximas à população estatística, minimizando os efeitos da distribuição não aleatória dos organismos no fundo da câmara, decorrente de sua forma cilíndrica (UEHLINGER, 1964; HUSZAR e GIANI, 2004).

A escolha dos campos a serem contados baseia-se em transectos horizontais e verticais e o limite da contagem, ou seja, o número mínimo de campos contados por câmara de sedimentação é determinado por dois critérios:

- gráfico de estabilização do número de espécies, que é obtido a partir de espécies novas adicionadas ao número de campos contados.
- gráfico de espécies mais abundantes, obtido pela contagem de até 100 indivíduos da espécie mais comum.

Recomenda-se, sempre que possível, a enumeração de 400 indivíduos da espécie mais freqüente a fim de obter precisão de mais ou menos 10% para um intervalo de confiança de 95% (LUND *et al.*, 1958). As condições em que isto é possível, no

entanto, limitam-se aos períodos de altas densidades populacionais como, por exemplo, os períodos de florações. Por isso, segundo Huszar e Giane (2004), tem sido amplamente utilizada, sobretudo em sistemas rasos e túrbidos, a enumeração de 100 indivíduos da espécie dominante, o que significa precisão de mais ou menos 20% ($p < 0,05$; LUND *et al.*, 1958).

Para cianobactérias, Wetzel e Likens (1991) afirmaram que, quando pequena concentração de lugol é adicionada os pseudovacúolos gasosos podem não ser esvaziados, podendo a sedimentação ter um resultado incompleto. Assim, para assegurar a completa sedimentação dos organismos, o tempo da sedimentação deve ser pelo menos 3 vezes a altura da câmara de sedimentação, em centímetros, e a câmara deve ser colocada em superfície plana, livre de vibrações.

Os volumes das câmaras de sedimentação utilizadas no Método de Utermöhl (1958) são: 1, 5, 10, 25, 50 e 100 mL; variando com a densidade dos organismos da amostra. Os resultados são expressos em densidade (cel.mL^{-1}) e calculados de acordo com a fórmula descrita em Weber (1973):

Equação 1:

$$\text{org.mL}^{-1} = (n/sc).(1/h).(F)$$

Na qual:

n= número de indivíduos efetivamente contados;

s= área do campo em mm^2 no aumento de 40X;

c= número de campos contados;

h= altura da câmara de sedimentação em mm

F= fator de correção para mililitro ($10^3 \text{ mm}^3/1\text{mL}$)

O microscópio invertido é muito utilizado na observação de organismos fitoplancctônicos. Ele permite a observação através do fundo da câmara; com uso de campo claro, escuro, contraste de fase ou fluorescência (WETZEL e LIKENS, *op.cit.*). Segundo os mesmos autores, ele pode apresentar limitação na resolução, em lâminas muito espessas.

4.3 Determinações através de Biomassa

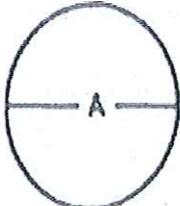
4.3.1 Tamanho e Volume Celular

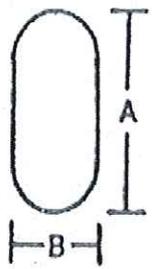
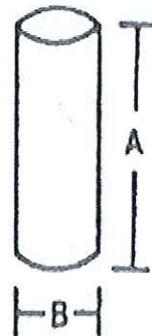
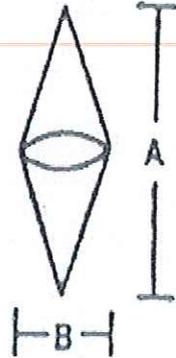
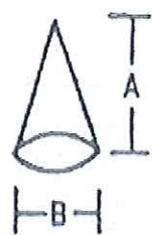
Análises detalhadas de populações fitoplanctônicas requerem estimativa de números e volume de cada espécie. Costuma-se contar as células, entretanto, esse procedimento é impraticável no caso de muitas colônias pluricelulares; dessa forma, quando colônias são contadas, é necessário determinar-se um número médio de células por colônia. Em espécies filamentosas, o comprimento médio do filamento deve ser determinado (WETZEL e LIKENS, 1991).

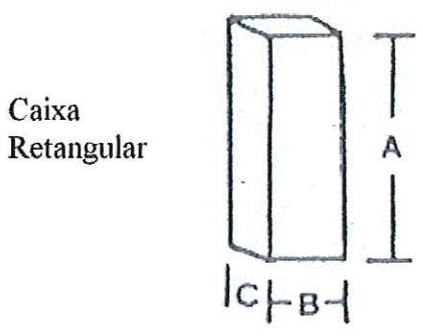
O número de células freqüentemente não representa a verdadeira biomassa, por causa da considerável variação de tamanho entre as espécies; essa diferença pode ser avaliada multiplicando-se o número de células de dada espécie pelo volume médio das células ou pela soma dos volumes sobre todas as espécies. O volume celular é estimado pelo conhecimento das dimensões celulares, aplicando-as correspondentes às suas formas geométricas (Figura 34) (WETZEL e LIKENS, op. cit.). Sempre que possível, recomenda-se considerar as dimensões médias de, pelo menos, 30 indivíduos.

O volume celular ou biovolume fornece uma avaliação mais acurada da biomassa celular devido às grandes diferenças nas dimensões das espécies e, muitas vezes sazonalmente, entre as mesmas espécies sob condições diferentes de crescimento.

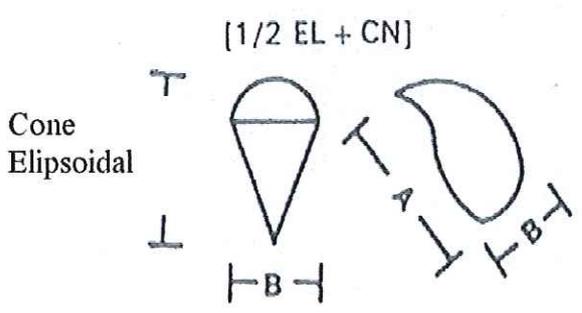
O biovolume também pode ser obtido através de um microscópio trinocular acoplado a um computador que contenha um software que captura e analisa a imagem. Esse programa mede as células, mas a área tem que ser convertida em volume por meio das equações matemáticas das fórmulas geométricas, como exemplo, as de Wetzel e Likens (1991).

Forma	Diagrama	Fórmula	Espécies Representativas
Esfera		$\pi A^3/6$	<i>Sphaerocystis schroeteri</i>

Elipsoidal		$\pi AB^2/6$	<i>Scenedesmus bijuga</i> <i>Cryptomonas</i> <i>Euglena</i>
Bastão		$\pi AB^2/4$	<i>Melosira granulata</i> <i>Cyclotella</i> <i>Asterionella</i>
Dois cones		$\pi AB^2/12$	<i>Ankistrodesmus</i> <i>falcatus</i>
Cone único		$\pi AB^2/12$	(Horn of <i>Ceratium</i>)



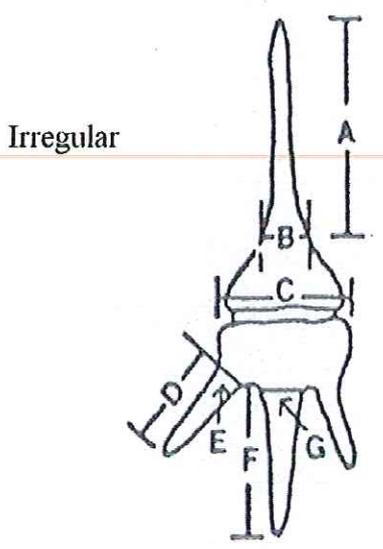
ABC



$(1/2 EL + CN)$

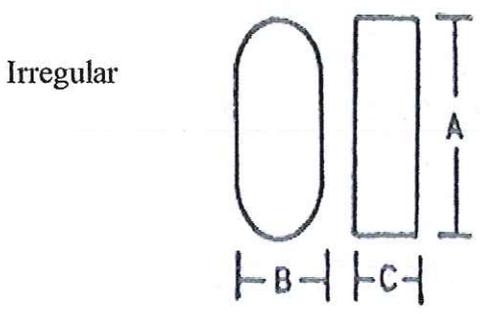
$$\frac{\pi B^2(A + B/2)}{12}$$

Rhodomonas minuta
Gymnodinium helveticum
Mallomonas
Synura



$$\frac{\pi}{12} [AB^2 + C^2 + 2ED^2 + FG^2]$$

Ceratium hirundinella



$$\frac{BC(A - B + \frac{\pi}{4} B)}{4}$$

Achnanthes
B: Valve view
C: girdle view



$$A^2/4$$

Crucigenia tetrapedia

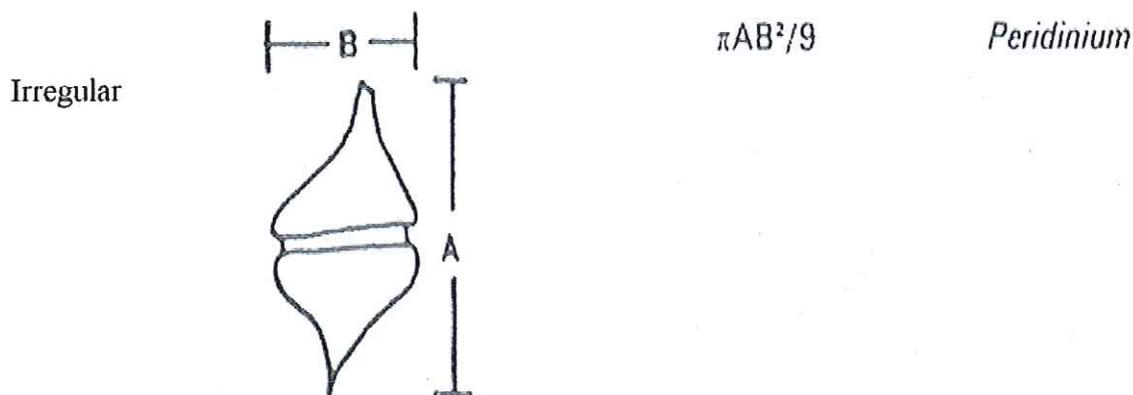


Figura 34: Fórmulas geométricas para estimativa de biovolume.

FONTE: Wetzel e Likens (1991)

4.3.2 Peso Fresco

As densidades de indivíduos de populações de espécies fitoplanctônicas, multiplicadas pelos seus respectivos volumes, fornecem o peso; e a contribuição de espécies individuais é obtida pelo tamanho das mesmas. Os valores podem ser convertidos a peso de biomassa fresca, multiplicando-se o número de células da população pelo volume celular (WETZEL e LIKENS, op. cit).

A medida de peso seco de populações fitoplanctônicas não é prática, pois nenhum método razoável existe para separar organismos de detritos particulados na água. Além disso, secagem por calor resulta em perda de constituintes orgânicos voláteis particulados, relataram os mesmos autores.

4.3.3 Carbono Orgânico

A estimativa do conteúdo de carbono orgânico dos organismos fitoplanctônicos pode ser determinada pela relação do carbono celular com o volume da célula. Uma relação do carbono orgânico por volume celular (em $\mu\text{m}^3/\text{L}$) de 0,10 tem sido constante

em numerosos organismos (WETZEL e LIKENS, 1991). O resultado do conteúdo de carbono costuma ser expresso em picogramas ($\text{pg/C } \mu\text{m}^3$).

O cálculo do conteúdo de carbono fitoplanctônico (mgC/mL) pode ser feito utilizando-se a equação (abaixo) proposta por Rocha e Duncan (1985):

Equação: 2

$$C = a x V^b$$

Na qual:

C = carbono celular

V = volume celular

a (cte) = 0,1204

b (cte) = 1,051

4.3.4 Clorofila a

Para determinação das concentrações de clorofila a e feofitina, as amostras são filtradas a vácuo, com pressão inferior a 0,3 atm, em membranas com 0,45 μm de porosidade (Millipore HÁ) ou em filtros de fibra de vidro Wathmann GF/C (com tamanho de poro que varie de 0,5 a 0,7 μm) que, posteriormente, podem ser conservados no freezer (-20° a -60°C), por um período máximo de 20 dias, até o momento da extração. O volume filtrado dependerá da concentração de fitoplâncton e, portanto, do grau de trofia do ambiente.

No laboratório, a extração pode ser feita utilizando-se três solventes:

Acetona: a extração é feita por maceração em almofariz, utilizando-se como solvente acetona 90% a frio, sob baixa iluminação e a temperatura ambiente, seguida de centrifugação, durante 5 minutos, à velocidade de 4000 rpm (WETZEL e LIKENS, op. cit.). Se disponível, utilizar centrifuga refrigerada (a 5°C). A leitura das absorvâncias dos extratos a 665 e 750 nm, em espectrofotômetro, deve seguir a metodologia descrita em APHA (1995). Para acidificação do extrato e determinação da feofitina, adiciona-se

0,05 mL de HCL 0,1N para 1 mL de extrato. Após 2 minutos, faz-se leituras no espectrofotômetro, nos mesmos comprimentos de onda utilizados na determinação da clorofila a.

Para o cálculo das concentrações de clorofila a e de feofitina são utilizadas as fórmulas descritas em Arar (1997), com modificações no coeficiente de absorção específico da clorofila a baseadas em Lorenzen (1967), representadas a seguir:

Equação: 3

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 26,7 \times [(Eu665 - Eu750) - (Ea665 - Ea750)] \times \frac{v}{V \times s}$$

Equação: 4

$$\text{Feofitina } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 26,7 \times [1,7 \times (Ea665 - Ea750)] - (Eu665 - Eu750)] \times \frac{v}{V \times s}$$

Na qual:

Eu – absorbância da amostra não acidificada;

Ea – absorbância da amostra acidificada;

v - volume do extrato (mL);

V – volume da amostra filtrada (L);

s – espessura da cubeta (cm);

26,7 – coeficiente de absorção específico da clorofila a em solução aquosa de acetona 90%;

1,7 – razão de rendimento da clorofila a não acidificada para acidificada.

Embora a utilização da acetona como solvente subestime as concentrações de clorofila, tem sido recomendada quando há predomínio de diatomáceas no sistema e em programas de monitoramento, principalmente quando a comunidade fitoplanctônica não é conhecida, pois apresenta a mesma eficiência de extração para todos os grupos fitoplanctônicos. Outra vantagem da utilização da acetona como solvente é a menor turvação dos extratos, após acidificação. A eficiência da extração com acetona diminui quando predominam no ambiente clorofíceas e cianobactérias.

Etanol: a técnica de extração com etanol 80% a quente está descrita em uma norma holandesa (Nederlandse Norm, 1981), baseada em Nush e Palme (1975), Moed e Hallegraef (1978) e Nush (1980). Após 5 minutos em banho maria a 75 °C, os tubos de ensaio, contendo os filtros e o etanol, são resfriados e deixados em repouso por aproximadamente 15 horas no escuro. Posteriormente, o extrato é quantificado nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm. Para acidificação do extrato e determinação da feofitina, adiciona-se 0,05 mL de HCl 0,4 N para 8-10 mL de extrato, estabelecendo o pH em torno de 2,6 a 2,8. Após 5 minutos é feita nova leitura no espectrofotômetro, nos mesmos comprimentos de onda descritos acima.

As fórmulas utilizadas para o cálculo das concentrações de clorofila a e de feofitina são descritas em Nush (op. cit.), com modificações no coeficiente de absorção específica da clorofila a, baseado em MARKER *et al.* (1980).

Equação: 5

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 27,9 \times [(Eu665 - Eu750) - (Ea665 - Ea750)] \times \frac{v}{V \times s}$$

Equação: 6

$$\text{Feofitina } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 27,9 \times [(1,7 \times (Ea665 - Ea750) - (Eu665 - Eu750))] \times \frac{v}{V \times s}$$

Na qual:

Eu – absorbância da amostra não acidificada;

Ea – absorbância da amostra acidificada;

V – volume da amostra filtrada (L);

v – volume do extrato (mL);

s – espessura da cubeta (cm);

27,9 – coeficiente de absorção específico da clorofila a em solução aquosa de etanol 80%;

1,7 – razão de rendimento da clorofila a não acidificada para acidificada.

A eficiência da extração com álcool é superior à da acetona para clorofíceas e cianobactérias e é a mesma para diatomáceas. Essa técnica é a mais demorada e tem a desvantagem da turvação do extrato acidificado, quando não executada com o rigor necessário.

Metanol: nessa técnica a extração é feita utilizando-se como solvente 7 mL de metanol 100%, sob baixa iluminação. Após 3 horas, a 4 °C e no escuro, as amostras são centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, a absorvância do extrato é lida a 665 e 750 nm. A acidificação é feita com 7 µL de HCl 0,3M para obter pH em torno de 2,6 a 2,8. Os cálculos das concentrações seguem as recomendações descritas para o etanol, com o coeficiente de absorção específico da clorofila a em metanol absoluto de 31,2 (MARKER *et al.*, 1980).

Em relação ao etanol, um grande número de amostras pode ser determinado com metanol num período de tempo menor, sem qualquer risco de mudanças espectrais ou químicas na clorofila-a. Embora a clorofila seja facilmente oxidada em metanol, as vantagens adicionais não são relevantes para os procedimentos de extração rotineiros. Além do metanol ser tóxico, ele aumenta os produtos da degradação da clorofila, e a turvação do extrato após a acidificação é freqüente.

Considerando que a eficiência de extração varia com a concentração celular, conteúdo de clorofila e composição de espécies, parece não existir consenso a respeito do melhor solvente a ser utilizado. Mas, vale ressaltar que etanol e metanol são igualmente eficientes e superam a eficiência de extração pela acetona. Devido à freqüente turvação do extrato quando o álcool é usado como solvente, dependendo dos objetivos da pesquisa, recomenda-se que os resultados sejam apresentados em concentrações de pigmentos totais, colocando-se à parte a necessidade da acidificação.

As concentrações de clorofila podem ser, também, estimadas por fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A escolha do método mais apropriado leva em consideração diversos fatores: a) a exatidão da análise; b) as facilidades de aplicação (infra-estrutura e aspectos financeiros), c) comparação com resultados de outros trabalhos e d) adequação aos objetivos da pesquisa.

O melhor método para determinação da clorofila a é o da cromatografia (HPLC), porém o custo e o tempo de análise dificultam a adoção dessa metodologia em análises rotineiras. Através dele é possível a obtenção de concentrações reais dos diferentes pigmentos existentes na amostra. É o método recomendável em estudos fisiológicos da comunidade fitoplanctônica.

A determinação de clorofila por fluorimetria é indicada em duas situações: a) quando o tempo de análise é limitante para o cumprimento dos objetivos da pesquisa, como no caso de monitoramento de efluentes ou estudos simultâneos em larga escala, e em estudos hidrodinâmicos; b) quando a medida da clorofila é um dado comparativo em

amostras unialgais, como por exemplo, medidas de crescimento algal para testes ecotoxicológicos.

4.4 Métodos de Determinação de Toxinas

Não é possível determinar, simplesmente pela aparência, se em florações de cianobactérias estão presentes espécies tóxicas, e a maior dificuldade no estudo de cianotoxinas encontra-se nos métodos disponíveis para detecção e avaliação de toxicidade.

O monitoramento dos mananciais e reservatórios de água deve incluir a identificação das espécies potencialmente tóxicas e o acompanhamento de suas densidades, através de contagem. A identificação desses microrganismos, baseada em características morfológicas, apesar de amplamente utilizada e recomendada (SIVONEN e JONES, 1999 e BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al*, 2001), tem mostrado ser insuficiente para fornecer subsídios ao monitoramento, devido a extensa plasticidade fenotípica de algumas espécies; e pelo fato de ser uma característica intra-populacional.

Assim, outras técnicas podem ser empregadas; algumas mais, precisas e mais elaboradas, podem ser recomendadas como padrões: bioensaios com camundongos, detecção de toxinas por HPLC ou análises imunoenzimáticas específicas; porém nenhuma destas análises são preditivas – elas são feitas depois que a floração tóxica já se estabeleceu.

Sivonen e Jones (op. cit.) sugeriram, também, como alternativa buscar marcadores moleculares capazes de identificar a presença de cepas de cianobactérias potencialmente tóxicas, antes de ocorrer a floração. De acordo com Lorenzi (2004), as técnicas moleculares aplicadas na identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas têm oferecido uma abordagem inovadora, sensível e específica, com potencial de aplicação em ambientes naturais. Segundo Oliveira (1998), a eficiência dos marcadores moleculares é devida à sua especificidade às seqüências de DNA, RNA e proteínas, minimizando os efeitos do meio e fornecendo uma rica fonte independente de dados e com a necessidade de uma pequena biomassa (de fragmentos ou células vivas).

De acordo com Yoo *et al.* (1995), em função dos objetivos do monitoramento são exigidos diferentes níveis de especificidade, sensibilidade, precisão e acurácia como:

- **Especificidade:** indica o potencial de um método em identificar a presença de toxinas conhecidas.
- **Sensibilidade:** indica o potencial de um método para quantificar valores específicos das diferentes toxinas.
- **Precisão:** indica o potencial de um método para quantificar valores absolutos de determinadas toxinas.
- **Acurácia:** indica o potencial de um método para estimar quão próximo do valor teórico está o valor da medida realizada.

Os métodos de detecção de toxinas de algas, de água doce e marinha, tiveram origem com os bioensaios em camundongos, utilizados desde o início do século XX. Já no início da década de 80, métodos de detecção mais sofisticados foram desenvolvidos, como ensaios enzimáticos e métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e a espectroscopia de massa.

De acordo com Boucaïna *et al.* (1998), comumente são usados três tipos de métodos para a detecção e quantificação de toxinas: Biológicos, Químicos e Físico-Químicos.

4.4.1 Métodos Biológicos

4.4.1.1 Bioensaios com Camundongos

Os bioensaios com camundongos consistem na injeção intraperitoneal de extrato algáceo, em diferentes doses, nos organismos-teste (são utilizados camundongos machos de 25-30 gramas). Este método pode ser utilizado para a detecção da presença de microcistinas, nodularinas, anatoxina-a, anatoxina-a (s), C-toxinas e saxitoxinas, salientando-se que se trata de um método mais qualitativo do que quantitativo.

A amostra de biomassa da floração é centrifugada, lavada e liofilizada ou com as células é preparado um extrato com solução fisiológica que é ultrasonizado para que ocorra a lise celular.

Após a injeção intraperitoneal, os camundongos são observados a cada 15 minutos, para identificação de sintomas tóxicos como contrações abdominais, piloereção, vaso-constricção auricular, esfriamento das extremidades, brilho nos olhos, movimentação desordenada, seguida de prostração, diarreia e sangue nas fezes, aceleração da respiração, convulsão e olhos dilatados. De acordo com Whitton e Potts (2000), embora esses sintomas variem com a composição (qualidade) e concentração do material, geralmente eles são distintos para as diferentes toxinas.

As vantagens e desvantagens do método são:

Vantagens:

- ser realizado facilmente em laboratório, sem a necessidade de equipamentos sofisticados e caros;
- em poucas horas fornece respostas quanto à presença de toxinas conhecidas aos sinais de envenenamento e CL_{50} (Concentração Letal Média – concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos-teste, em um período de exposição determinado (AZEVEDO e CHASSIN, 2003)).

Desvantagens:

- apresentar pouca sensibilidade para detectar baixas concentrações de cianotoxinas,
- limitações do método na rotina de laboratório e em estudos ambientais, se as companhias responsáveis pela captação, tratamento e distribuição de água tiverem dificuldades para obter e manter os animais testes (PEREIRA *et al.*, 1998);
- crescentes oposições em muitos países ao uso de animais para testes de toxicidade.

Lawton *et al.* (1994) estabeleceram faixas de toxicidade referentes a cianobactérias, podendo ser observadas no quadro 2, abaixo:

Quadro 2: Faixas de toxicidade das cianobactérias para camundongos (mg de peso seco de células por kg de peso corpóreo).

mg ps de céls./kg pe do camundongo	Toxicidade
> 1.000	não tóxico
1.000-500	baixa toxicidade
500-100	média toxicidade
< 100	alta toxicidade

FONTE: Modificado Lawton et al. (1994).

Outros bioensaios, **bioensaios alternativos**, já foram testados na detecção de cianotoxinas em *Artemia salina*, *Daphnia* sp., *Daphnia pulex*, *Aedes aegyptii* e *Drosophila melanogaster*. Entretanto, nenhum deles mostrou-se tão eficiente quanto os testes realizados com camundongos.

Ensaio de laboratório mostraram que a toxicidade das neurotoxinas são diferentes na fase larval e na fase adulta de camarões. A anatoxina-a pura não é tóxica para as larvas; mas se colocadas em contato com a biomassa de cianobactérias não tóxicas, a morte percentual de larvas cresce significativamente. Provavelmente, isso acontece como consequência de sinergismo com outros compostos ou pelo fato da toxina pura não ser absorvida pela larva. É possível que alguns compostos possibilitem a assimilação da toxina pela larva e afete a bioquímica do crustáceo (WHITTON e POTTS, 2000).

As vantagens e as desvantagens do método são:

Vantagens:

- detecção de neurotoxinas e hepatotoxinas em concentrações de moderadas a altas;
- não utilização de camundongos vivos para testes de toxicidade.

Desvantagens:

- não distinção entre hepatotoxicidade e neurotoxicidade;
- serem necessárias, pelo menos, 48 horas para a obtenção dos resultados.

Foram também realizados **bioensaios de citotoxicidade *in vitro***, com hepatócitos de roedores e de peixes e com fibroblastos, células cancerosas e eritrócitos

de mamíferos (PEREIRA *et al.*, 1998). Whitton e Potts (2000) propuseram o uso de hepatócitos frescos de camundongos para avaliar a toxicidade de florações de cianobactérias, e mostraram que a toxicidade *in vitro*, para as células, pode ser correlacionada a de bioensaios *in vivo*. Quando usada biomassa algal bruta, as hepatotoxinas causaram deformação e mudanças estruturais nas células do fígado de camundongos, principalmente por inibir a atividade da fosfatase. Têm sido observados efeitos similares com eritrócitos. Desde os primeiros estudos intuiu-se que extratos de cianobactérias tóxicas rompiam os eritrócitos. Estudos posteriores, feitos com microcistinas purificadas, não demonstraram o mesmo efeito em fibroblastos nem em eritrócitos.

O método apresenta como vantagem e desvantagens:

Vantagem:

- não utilização de animais vivos para testes de toxicidade em laboratórios.

Desvantagens (segundo Nicholson e Burch (2001):

- resposta tóxica não específica a cianotoxinas;
- dificuldades dos laboratórios na preparação de suspensão celular, para os testes de toxicidade.

4.4.2 Métodos Bioquímicos

❖ ELISA – Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima

O teste conhecido por ELISA é uma técnica analítica baseada em ensaios imunoadsorventes ligados à enzima. O ensaio do imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA–*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) é uma modificação do RIA–(*radioimmunoassay*), em português radioimunoensaio. Por meio desta metodologia, o anticorpo, ao invés de ser radioativo, possui uma enzima marcada a ele aderida (BLACK, 2002).

Segundo Trabulsi *et al.* (1999), o ELISA é um método imunológico de grande sensibilidade para a pesquisa de antígenos bacterianos. Esse método baseia-se na propriedade de que antígenos e anticorpos, mono e policlonais, podem ser ligados a

vários tipos de superfície, como polivinil ou poliestireno, por exemplo, de modo que tanto a especificidade dos anticorpos ligados quanto os sítios antigênicos sejam fielmente preservados.

Esse método foi desenvolvido para determinação de poluentes no meio ambiente, incluindo toxinas. Entretanto, Yoo *et al.* (1995) afirmaram que o ELISA foi desenvolvido para detecção de microcistinas, para corroborar resultados quantitativos em corpos de água e em extratos de biomassa com limite de detecção de 0,2 µg/L e 0,25 µg/L. Esse método responde por determinada variedade de microcistinas. Segundo Amorim (1997), o teste Elisa baseia-se na alta especificidade que os anticorpos possuem para os antígenos contra os quais são produzidos.

An e Carmichael (1994) afirmaram que para realização do teste Elisa, utilizam-se anticorpos policlonais desenvolvidos contra microcistina-LR –MCYST-LR. Entretanto, esses anticorpos possuem boa reação cruzada com outros tipos de microcistina (MCYST –RR, MCYST –YR, MCYST –FR e MCYST –WR) e também com a nodularina –NODLN. Algumas investigações têm demonstrado que os anticorpos são mais eficientes contra algumas microcistinas, como Microcistina-RR, enquanto que sua resposta é pequena frente a outras (NICHOLSON e BURCH, 2001).

As microcistinas e nodularinas que possuem a forma E (ligação dupla no C6 do ADDA- ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, responsável pela atividade das hepatotoxinas) são reconhecidas mais facilmente pelos anticorpos. A desmetilização do ADDA, tanto nas microcistinas quanto nas nodularinas, causa alteração estrutural nessas moléculas, tornando-as não reconhecidas pelos anticorpos, apesar de permanecerem tóxicas para mamíferos. Entretanto, a modificação no grupo –COO do ácido glutâmico das microcistinas não altera a especificidade com os anticorpos, no entanto não são tóxicas para camundongos (AN e CARMICHAEL, *op. cit.*).

As microcistinas da amostra, adicionadas à placa de reação, competem com o conjugado microcistina-enzima, pelos anticorpos imobilizados nas paredes do tubo ou na placa de reação, que são em número limitado. Na Figura 35A temos os antígenos e a toxina (microcistina) submetidos à reação enzimática. Durante o período de incubação as microcistinas se ligam aos anticorpos, depois adiciona-se o conjugado de microcistina-enzima que se liga aos anticorpos que ainda se encontram disponíveis. A lavagem remove todas as moléculas não ligadas, e o substrato cromático adicionado é degradado na presença dos conjugados microcistina-enzima ligados aos anticorpos,

produzindo uma cor azul, que vai ficando mais clara, em função da quantidade crescente de microcistina existente na amostra. Isso ocorre porque quanto mais microcistinas presentes, maior é a quantidade de anticorpos preenchidos, ficando, assim, indisponíveis para o conjugado microcistina-enzima. Com isso uma menor quantidade de substrato acaba reagindo, originando a cor azul mais clara. No controle (Figura 35B), no qual não existem microcistinas ativas, todos os anticorpos vão estar disponíveis para o conjugado microcistina-enzima, formando uma cor azul escura (AMORIM, 1997).

A descrição do método ELISA, feita por Sivonen e Jones (1999), para detecção de microcistinas é a seguinte:

► **Materiais:**

- Equipamento de filtração para amostras;
- Pipeta automática 100 µL;
- Relógio (Timer);
- Pipeta para lavar a microplaca;
- Leitor ELISA com filtro até 450 nm.

► **Reagentes:**

- Kit ELISA (diluyente, conjugado toxina-enzima, substrato, toxina, tubos de microplacas ou placas de reação);
- Destilador de água.

► **Procedimento do Ensaio:**

- Para serem analisadas, amostras de água são tratadas duas vezes por congelamento-descongelamento, depois são filtradas em membranas ou filtros de fibra de vidro;
- Amostras ou padrões, primeiramente são misturados à solução de anticorpos e adicionados em reservas de microplacas pré-cobertas com microcistina-LR, conjugada com soro de albumina bovina;
- Depois de lavado, o anticorpo monoclonal ligado é detectado com peroxidase;
- A densidade ótica é lida até 450 nm e a concentração de microcistina é determinada por curva padronizada de microcistina-LR.

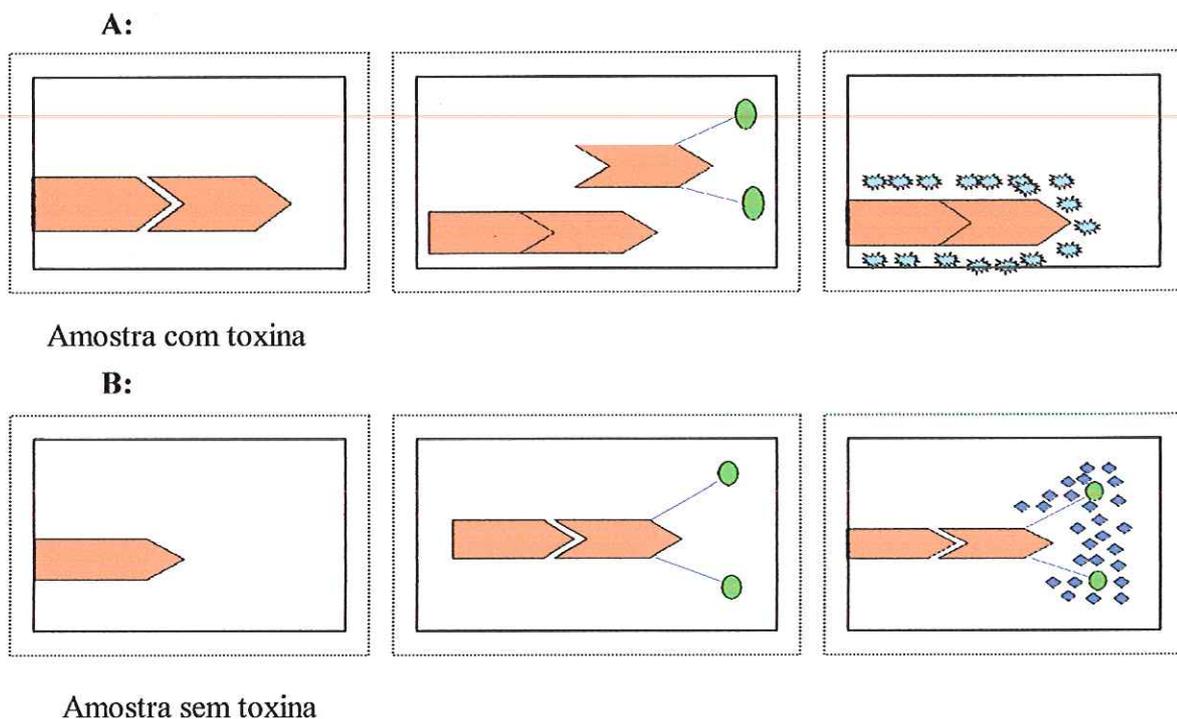
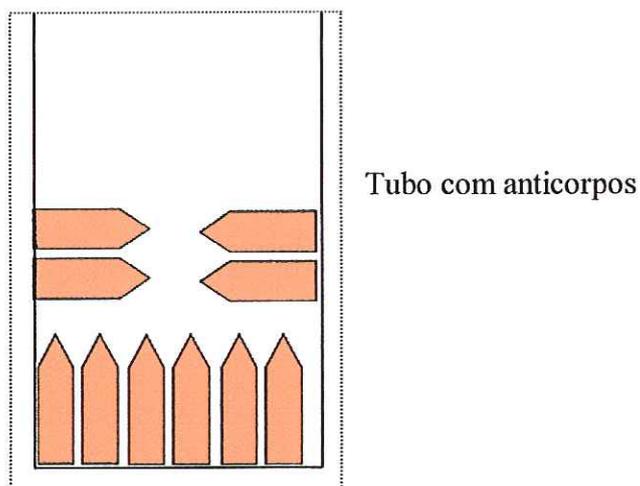
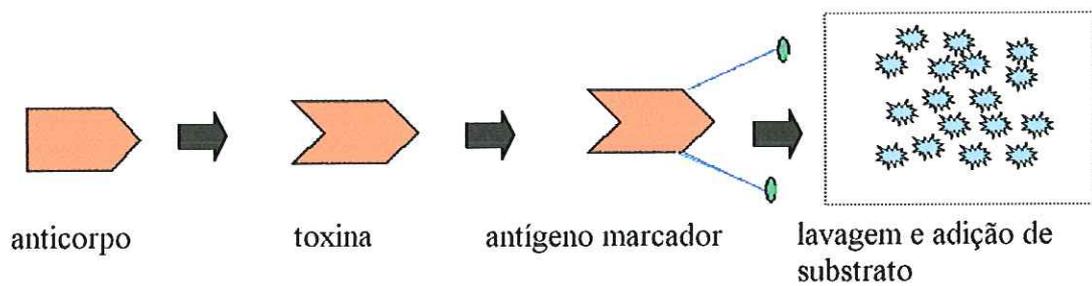


Figura 35: Esquema do método ELISA. (A- Amostra com toxina; B- Amostra controle (sem toxina))

O teste Elisa apresenta como vantagens:

- alta sensibilidade,
- grande quantidade de amostras podem ser manipuladas num dia, reduzindo o custo por análise,
- necessidade de pequenas quantidades de anticorpos diluídos.

Apresenta como desvantagens:

- dificuldade de obter-se anticorpos específicos para microcistinas,
- interferências de outros componentes da amostra.

Os testes de Elisa são lidos por meio de uma leitora de microplacas, por absorbância, como pode ser visto na figura 36.

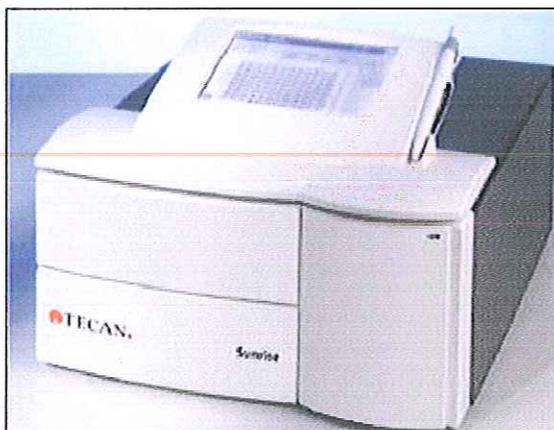


Figura 36: Leitora de microplacas por absorbância.

FONTE: www.micronal.com.br/Produtosnovosite/processamento_amostras

A possibilidade de uma microcistina altamente tóxica apresentar uma reatividade muito baixa com os anticorpos significa que um falso resultado pode ser obtido. Isto poderia levar a uma conclusão errada de que uma floração é não tóxica e que o corpo de água está seguro, quando ele pode não estar (NICHOLSON e BURCH, 2001).

Os “kits” de teste Elisa estão sendo comercializados. A precisão desse teste depende da microcistina presente, sendo que sua reatividade é relativa a um padrão de quantificação e é suscetível a interferências. Se somente a microcistina-LR, ou

microcistinas com equivalentes reatividades estiverem presentes, então um resultado preciso em termos de microcistina-LR equivalente poderá ser obtido. Entretanto, um resultado preciso de toxicidade, equivalente em termos de microcistina-LR, somente será obtido se as toxicidades também forem equivalentes (NICHOLSON e BURCH, 2001).

❖ Ensaio de Inibição de Fosfatase

As hepatotoxinas peptídicas, microcistinas e nodularinas inibem as enzimas responsáveis pela desfosforilação de fosfoproteínas intracelulares. Essas enzimas são as proteínas fosfatases e os tipos mais inibidos por hepatotoxinas peptídicas cíclicas são do Tipo 1 e de um subgrupo do Tipo 2, chamada proteína fosfatase 2A. A inibição dessa proteína parece estar relacionada à hepatotoxicidade desses compostos e, provavelmente, está relacionada ao desenvolvimento de tumores (AN e CARMICHAEL, 1994).

O método consiste em quantificar o fosfato liberado das proteínas fosforiladas. Como as microcistinas são potentes inibidoras das proteínas 1 e 2, elas podem ser detectadas por medidas da inibição da liberação do fosfato. Para quantificar as microcistinas detectadas, compara-se a taxa de inibição das fosfatases proteicas a uma curva padrão de concentração conhecida (PEREIRA *et al.*, 1998). A inibição de fosfatase pode ser determinada usando-se substratos radiomarcados de P^{32} , medindo o fosfato radiomarcado produzido e liberado em um tempo fixado (AN e CARMICHAEL, *op. cit.*; NICHOLSON e BURCH, *op. cit.*).

A reação é finalizada adicionando-se ácido tricloroacético, para inativar a proteína fosfatase e precipitar a proteína radiomarcada P^{32} . A fração do ácido solúvel é extraída pelo ácido molibdato e os extratos de fosfato inorgânico e o fosfato P^{32} são contados em um cintilômetro (MACKINTOSH e MACKINTOSH, 1994).

Segundo Nicholson e Burch (*op. cit.*), o método tem sido usado para determinação de microcistinas em amostras ambientais aplicado para o monitoramento de amostras de água, com limite de detecção, de até 0,1 $\mu\text{g/L}$, aproximadamente.

An e Carmichael (1994) reportaram terem usado um ensaio de inibição de proteína fosfatase colorimétrico, que não necessita de materiais radioativos. O ensaio de inibição de proteína fosfatase é extremamente útil para a confirmação da atividade

biológica e, conseqüentemente, para determinar a toxicidade de microcistinas presentes nos ecossistemas.

Segundo Mackintosh e Mackintosh (1994), o método apresenta como vantagens:

- sensibilidade em concentrações baixas de microcistinas;
- simplicidade e rapidez. Um técnico pode realizar 100 ensaios em um dia;
- possibilidade de várias curvas de calibração;
- versatilidade: o ensaio pode ser usado para detectar ácido okadaíco em extratos de moluscos. O ácido okadaíco e microcistinas podem ser facilmente distinguidas nas amostras, pois essas toxinas têm diferenças relativas a PP1 e PP2A.

O método apresenta como desvantagens, segundo Nicholson e Burch (2001):

- inibição da fosfatase protéica; no entanto, não é específico para microcistinas, porque outras toxinas que não são produzidas por cianobactérias provocam as mesmas respostas (PEREIRA *et al.*, 1998);
- o método é sensível, mas está sujeito ao principal inconveniente de que o isótopo P^{32} tem um curto período de meia vida de aproximadamente 14 dias;
- as proteínas não são comercialmente disponíveis e requerem procedimentos sofisticados para sua preparação;
- usa-se na preparação do método, ATP radioativo e enzimas comerciais, ambos muito caros;
- muitos laboratórios não estão preparados para executar determinações radioativas.

❖ Ensaio de Inibição da Acetilcolinesterase

Dentre os bioensaios rápidos e sensíveis, a utilização da enzima acetilcolinesterase é uma alternativa para a detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterase (TREVISAN e MACEDO, 2003).

Segundo Mahmood e Carmichael (1986), é possível determinar a atividade bioquímica da anatoxina-a (s) por um ensaio baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), o qual indica a presença da toxina. Esse ensaio não é

seletivo; ele detecta, também, outros inibidores da acetilcolinesterase, como organofosforados de praguicidas.

Segundo Pereira *et al.* (1998), a inibição de acetilcolinesterase pode ser determinada através de uma reação colorimétrica, que consiste na reação de um grupo acetil, liberado enzimaticamente da acetilcolina por ação da acetilcolinesterase, com o ácido ditiobisnitrobenzóico, na qual a toxina é detectada por uma redução na absorbância a 410 nm.

O método da inibição da acetilcolinesterase baseia-se na determinação do I_{50} , – concentração molar do inibidor necessária para produzir 50% de inibição enzimática – o valor depende da fonte de enzima, da concentração do substrato e da temperatura de incubação; entretanto, independe do tempo de incubação. Experimentalmente, o valor do I_{50} pode ser determinado por métodos potenciométricos (LANNA, 2002).

De acordo com Yunes *et al.* (2003), anatoxin-a (s) é estruturalmente análoga a praguicidas organofosforados, que são inibidores específicos da acetilcolinesterase (AchE), uma enzima conhecida por hidrolizar o neurotransmissor acetilcolina, um importante regulador. Devido à especificidade dos organofosforados contra AchE, freqüentemente ela é empregada como um biofabricante para a detecção de organofosforados presentes em ambientes marinhos ou dulcícolas. Segundo os mesmos autores, é considerado o método legal adotado pela legislação brasileira (BRASIL, 2004). Toxinas como anatoxina-a (s) assemelham-se estruturalmente à molécula dos organofosforados, permitindo sua detecção em sistemas enzimáticos *in vitro*, desde que anatoxina-a (s) seja uma molécula ativa e possa inibir a atividade da AchE sem sua posterior metabolização.

Os pesticidas organofosforados atuam inibindo as colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase e, dessa forma, aumentam o nível de acetilcolina nas sinapses nervosas, fato conhecido como síndrome colinérgica. Em mamíferos, os efeitos caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios, depressão do sistema nervoso central e insuficiência respiratória (HERRICKS *et al.*, 1994). Sintomatologia semelhante aos efeitos causados pela ingestão de anatoxina-a (s) foi verificada em bioensaios de laboratórios, confirmando a analogia estrutural dos organofosforados e anatoxina-a (s) (CAVALIERE *et al.*, 1996; LANNA, *op. cit.*).

Segundo Lanna (*op.cit.*), a avaliação do nível de atividade desta enzima é um indicador indireto de eventual exposição/intoxicação e contaminação das águas.

O método apresenta como vantagens:

- sensibilidade alta;
- rapidez.

O método apresenta como desvantagem:

- detectar outros inibidores da acetilcolinesterase.

4.4.3 Métodos Físico-Químicos

❖ Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC/CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico para a separação de componentes de uma mesma mistura. O nome cromatografia gasosa denota que a fase que se move é um gás (De SÁ, 1994).

Cienfuegos e Vaitsman (2000) relataram que a cromatografia gasosa é uma técnica analítica que permite separações, identificações e medidas quantitativas de componentes de uma mistura praticamente impossíveis de serem efetuadas por meios convencionais.

O objetivo da cromatografia gasosa é a separação dos componentes de uma amostra genérica, visando posterior determinação dos mesmos. A análise qualitativa tem por finalidade identificar os componentes da amostra. O parâmetro utilizado é o tempo de detenção, que é o tempo transcorrido desde a injeção do analito até a obtenção do pico máximo gerado. Na análise quantitativa, a área do pico no cromatograma é proporcional à concentração de uma ou de mais substâncias.

De acordo com esses autores existem três meios para a identificação:

- comparações com padrões puros;
- adição de padrão;
- índice de retenção.

Cienfuegos e Vaitsman (op. cit.) descrevem a técnica de cromatografia gasosa como separações que se fundamentam na distribuição seletiva dos diferentes componentes de uma amostra de duas fases imiscíveis. A fase móvel é um gás e a fixa é constituída por um sólido ou líquido não volátil. Quando a fase móvel flui através da

coluna, transportando a amostra, os componentes são por elas separados e determinados por detectores adequados que geram um sinal para o registrador.

Segundo a fase estacionária, a cromatografia gasosa pode ser classificada em:

- Cromatografia gás-sólido: se a fase estacionária for sólida,
- Cromatografia gás-líquido: se a fase estacionária for líquida,

Basicamente, um sistema cromatográfico é constituído por: cilindro com gás de arraste, controladores de pressão e vazão, injetor, forno com colunas, detector registrador (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa. Através de um sistema de injeção, a amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes, no local da injeção da amostra e na coluna, possibilita a vaporização de substâncias que, de acordo com suas propriedades e da fase estacionária, serão retidas por tempos determinados e chegarão à saída da coluna em tempos diferentes. Um determinado detector, colocado à saída da coluna, torna possível detectar e quantificar as diferentes substâncias (COLLINS e BRAGA, 1987; CIOLA, 1998). Após a separação de fases, a detecção de toxinas é feita por absorvância em UV, fotodíodo (PDA), espectroscopia de massa (MS) e outros indicadores.

A técnica apresenta como vantagens, segundo De SÁ (1994):

- alta resolução- muitos picos são gerados em poucos minutos, devido a diferenças de solubilidade que permitem a separação seletiva;
- velocidade - demora alguns minutos (10 min), mas com altas pressões obtém-se análises em segundos;
- sensibilidade.

As desvantagens da técnica são:

- alto custo do cromatógrafo gasoso;
- necessidade de operador qualificado, o que torna o processo limitado;
- a identificação da amostra pode ser duvidosa, quando vários compostos apresentam o mesmo tempo de retenção.

Segundo Cass e Degani (2001), a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC/CLAE) surgiu como aplicação da cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas inicialmente para a cromatografia gasosa. Surgiu na

década de 60, do século XX. Baseia-se na teoria gasosa, onde a eficiência de uma separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária. Lombardo *et al.* (2003) relataram a HPLC como sendo um método rápido, sensível e reproduzível para as análises qualitativas e quantitativas, purificação e separação de componentes.

A HPLC é o mais comum dos procedimentos instrumentais analíticos utilizados na determinação de microcistinas e nodularinas (NICHOLSON e BURCH, 2001). Segundo Sivonen e Jones (1999), os métodos analíticos foram desenvolvidos para analisar principalmente microcistinas; entretanto as nodularinas podem ser analisadas pelos mesmos métodos.

Segundo Amorim (1997), a amostra injetada no sistema de cromatografia passa por uma coluna que contém gel de sílica-ODS; ao passar por essa coluna, os compostos químicos vão sendo eluídos a velocidades diferentes, dependendo, a sua velocidade, dos solventes utilizados e das suas proporções. Nicholson e Burch (*op. cit.*) reportaram que as cianotoxinas podem ser separadas umas das outras e de outros compostos usando-se: coluna C18 reversa, coluna de amido C16, coluna de troca iônica e uma fase aquosa contendo metanol ou acetonitrila. A detecção depende da concentração e do volume da amostra. A fase móvel pode determinar que tipo de microcistina está presente, sendo distinguidas as microcistinas-LR e YR.

Uma vez separadas as toxinas, a próxima etapa é a detecção. Nessa fase não deve haver restos de matéria orgânica, pois a matéria orgânica extraída juntamente com as toxinas da água pode interferir na análise mascarando as respostas. Nesse caso, alguns procedimentos de purificação das amostras são recomendados (NICHOLSON e BURCH, *op. cit.*).

Segundo Nobre (1997), o Centro Britânico de Pesquisa em Água desenvolveu um método padrão para microcistina, baseado na cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Esse método é capaz de detectar 1 µg/L de microcistina em água; ela se torna mais específica e sensível em UV. A identificação estrutural das toxinas isoladas é feita por análise dos aminoácidos por HPLC dos peptídeos hidrolizados.

Nicholson e Burch, (*op. cit.*) relataram outras técnicas de análise com HPLC, como pode ser visto abaixo:

A **Detecção por UV** é o meio mais comum para a detecção de cianotoxinas, pois tanto a maioria das microcistinas como as nodularinas têm a absorção máxima em 238nm, embora aquelas com aminoácidos aromáticos, como a microcistina-LW, que

contém triptofano, absorvam em comprimentos de onda mais baixos, no caso 222 nm. O objetivo dessa técnica é determinar as toxinas individualmente, estando a concentração sujeita a comparações com padrões; assim, a identificação das microcistinas é baseada nos picos de seus espectros. A precisão da técnica está entre 5 e 10%. O limite de detecção não está definido. A detecção por UV já é bem documentada e padronizada, sendo um método relativamente barato.

Outro modo de análise utilizando a HPLC é a **detecção por fotodiodo**. Esse método grava o espectro de diferentes analitos, promovendo uma melhor evidência da presença da cianotoxina. O espectro típico de uma microcistina, com o máximo de absorvância em 238 nm (ou ocasionalmente 222 nm, no caso da microcistina que contém triptofano), promove um alto grau de confiança à presença da toxina na amostra. Apesar disso, é difícil identificar o pico de absorção em cromatogramas, quando as concentrações são baixas e os espectros não são bem definidos, pois depende da experiência do analista.

A **espectroscopia de massa** como método de detecção promove uma melhor solução do problema de identificação equivocada de algumas cianotoxinas, como por exemplo, a microcistina. As microcistinas apresentam íons característicos no espectro de massa. A espectroscopia de massa funciona como uma impressão digital da microcistina. Assim como qualquer outro método analítico, padrões devem ser utilizados para uma precisa quantificação. A espectroscopia de massa ainda não é uma rotina comum em laboratórios, mas sua aplicação vem aumentando nos últimos anos. Enquanto no detector de fotodiodo diferentes microcistinas parecem ter respostas semelhantes, isso não ocorre na espectroscopia de massa. Como na detecção por UV e fotodiodo, a precisão da espectroscopia de massa é em torno de 5 e 10% e o limite de detecção de 0,02 µg/L para o volume de 5L. O custo do equipamento é alto, sendo os custos de operação baratos.

O método (padrão) apresenta como vantagens, segundo De Sá (1994) e Cass e Degani (2001):

- separação rápida;
- alta resolução (separa um número elevado de componentes com alto grau de pureza);
- versatilidade (permite análises com diferentes pesos moleculares);
- análise quantitativa fácil e exata;

- ampla variedade de detectores disponíveis;
- automação.

O método (padrão) apresenta como desvantagens, segundo De SÁ (1994) e Cass e Degani (2001):

- elevado custo de instrumentação e manutenção;
- não existe um detector universal, para todos os comprimentos de ondas;
- incapacidade de fornecer informações que permitam a identificação dos picos.

❖ Eletroforese Capilar

Segundo Santoro *et al.* (2000), a eletroforese capilar (EC) pode ser definida como o transporte de partículas eletricamente carregadas, em meio líquido, sob a influência de um campo elétrico.

A determinação de microcistinas e anatoxina-a pode ser feita com base em suas cargas e tamanhos moleculares (PEREIRA *et al.*, 1998). A eletroforese capilar deve ser considerada na separação e quantificação das hepatotoxinas peptídicas. A detecção de toxinas feita pela EC ainda não é rotina de monitoramento das águas. Segundo Nicholson e Burch (2001), a sensibilidade do método tem sido aumentada pelo uso de um detector fluorescente de laser induzido. Sua precisão se encontra entre 5 e 10%.

Este método foi denominado solução livre devido à instabilidade do aparelho, bastante limitado, notadamente por efeitos de difusão e aquecimento gerados pelo campo elétrico, efeitos que comprometiam a resolução (a separação) dos compostos. Estes efeitos foram minimizados com a introdução de um suporte (gel ou papel), que ajuda a conter o movimento livre dos analitos, de forma a diminuir o efeito da difusão (GUZMAN, 1993). Entretanto, este sistema oferecia um baixo nível de automação, longos tempos de análise e, após a separação, a detecção era feita visualmente.

A eletroforese capilar é uma técnica aplicável na determinação de grande variedade de amostras, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidro e lipossolúveis, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, fármacos, catecolaminas, substâncias quirais, proteínas, peptídeos e muitos outros. Uma característica que difere a EC das outras técnicas é a sua capacidade única para separar

macromoléculas eletricamente carregadas de interesse tanto para indústrias de biotecnologia quanto para pesquisas biológicas (SANTORO *et al.*, 2000).

Segundo Guzman (1993), a análise qualitativa é feita pela comparação dos tempos de migração dos padrões com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra ou através de espectros de UV/Vis (detector por arranjo de diodos) ou do espectro de massas (detector espectrômetro de massas).

A técnica apresenta como vantagens:

- rapidez (BAKER, 1995);
- versatilidade- segundo Santoro *et al.* (op. cit.), inúmeros compostos podem ser analisados, desde íons a bactérias vivas;
- baixo custo por análise (BAKER, op. cit.);
- alto poder de separação (resolução) (BAKER, op. cit.);
- consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes (TAVARES,1997);
- produz um volume mínimo de resíduos (SANTORO *et al.*, op. cit.).

A técnica apresenta como desvantagens:

- não ser adequada à determinação de compostos voláteis e de pequena massa molar, que são melhor determinados por cromatografia gasosa (BAKER, op. cit.);
- carecer de sensibilidade, quando comparados ao HPLC;
- não é apropriada para rotinas laboratoriais (NICHOLSON e BURCH, 2001).

❖ Método MMPB

Segundo Nicholson e Burch (op. cit.), esse método baseia-se na oxidação da microcistina que rompe a cadeia ADDA e produz o ácido 3-metoxi-2-metil-4-fenilbutírico, que é então determinado por cromatografia gasosa (CG). Na literatura já foi relatado um limite de detecção de 0,43 ng/L de microcistina para essa técnica. O resultado pode ser aproximado para uma concentração total de toxinas, que pode ser expressa em termos de microcistina-LR. Através desse método não é possível identificar toxinas individuais.

O método apresenta como vantagem:

- sensibilidade a baixos níveis de microcistinas.

Apresenta como desvantagem:

- não identifica toxinas individuais.

4.5 Testes de Toxicidade

Os estudos de toxicidade não são realizados para determinar se uma substância é segura. Eles servem, fundamentalmente, para identificar os efeitos tóxicos que tal substância possa produzir. Alguns desses testes são padronizados e recomendados por agências regulamentadoras, como “*Food and Drug Administration (FDA)*”, “*Environmental Protection Agency (EPA)*”, “*Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*”, segundo CÂMARA, 2002. De acordo com a autora, os roedores, ratos e camundongos, são as espécies animais mais utilizadas nos estudos de toxicidade, por serem facilmente manuseados e com custo acessível. A expectativa de vida desses animais é de dois a três anos, o que possibilita observações dos efeitos da exposição ao longo de sua vida, relativamente curta em relação a outros organismos.

4.5.1 Teste de Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso em um curto período, de acordo com procedimentos protocolares: concentração X tempo, nos estudos de ecotoxicidade, ou de exposições múltiplas em 24 horas; geralmente, referem-se à administração de uma única dose e considera-se o aparecimento de efeito em um período de até 14 dias (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

A toxicidade aguda – DL_{50} de um composto químico é expressa pela quantidade necessária desse composto em mg/Kg de peso corpóreo, para provocar a morte de 50% de um lote de animais submetidos à experiência. Para o bioensaio da DL_{50} são selecionadas, pelo menos, quatro doses crescentes do composto químico de maneira tal

que a menor dose não provoque mortalidade nos animais do grupo e que a maior dose não provoque 100% de mortes (LARINI, 1993).

Casos de inalação ou de absorção dérmica no ambiente aquático, freqüentemente, envolvem a DL_{50} ou CL_{50} . Normalmente, as provas baseiam-se na verificação do evento letal nas 24 horas que se seguem à administração e no acompanhamento dos sobreviventes durante 7 dias.

Os estudos de toxicidade aguda têm por objetivo identificar órgãos que possam ser alvos potenciais de determinado tóxico, além de conhecer a variabilidade das respostas das espécies aos diferentes agentes (AZEVEDO e CHASIN 2003).

O principal teste de ecotoxicidade aguda é a determinação de CL_{50} e de uma concentração efetiva média CE_{50} (Concentração Efetiva Média – concentração do agente tóxico que causa efeito agudo a 50% dos organismos-teste, num determinado período de exposição), sob curta duração de exposição (minutos a horas). A curta exposição a concentrações maiores geralmente determina efeito letal.

4.5.2. Teste de Toxicidade Subaguda e Subcrônica

As definições de toxicidade subaguda e subcrônica são controvertidas porque há diferenças nos intervalos de tempo que as caracterizam. Geralmente, as definições envolvem o estudo de efeitos adversos decorrentes da exposição a doses/concentrações múltiplas do agente tóxico, durante períodos que não excedem 10% da vida do animal. Em ratos, estudos durante 14, 21 e 28 dias são referidos como subagudos e com duração de 90 dias são referidos como subcrônicos.

A avaliação do estado de saúde desses animais deve ser realizada por meio de vários parâmetros: pesagem, realização de exames físicos semanais, análises bioquímicas do sangue e da urina, exames hematológicos e provas funcionais que devem ser realizadas em todos os animais doentes; além de necropsia completa em todos os animais, incluída a histologia de todos os órgãos (AZEVEDO e CHASIN, op. cit.).

4.5.3 Teste de Toxicidade Crônica

Estudos de toxicidade crônica são realizados em um período correspondente à vida toda do animal (AZEVEDO e CHASIN, 2003). Para esse estudo, são obtidas informações toxicológicas a partir da administração diária do agente tóxico, durante um período de pelo menos 12 meses (LARINI, 1993); de 2 a 7 anos, dependendo da espécie selecionada, segundo os resultados dos estudos subcrônicos e toxicodinâmicos (AZEVEDO e CHASIN, op. cit.).

Os animais devem ser semanalmente examinados clinicamente; em todos os animais devem ser feitas análises bioquímicas do sangue e da urina, bem como análises hematológicas e provas funcionais, incluída a histologia de todos os órgãos, com o objetivo de serem identificadas anormalidades e doenças que possam ser caracterizadas como causadas por substâncias químicas e, ainda, caracterizar as condições de exposição e doses.

5 Ocorrências de Florações de Cianobactérias no Brasil

“Brasil, único país que começou como epístola e tem nome de árvore. Singulares particularidades”.

(Otto Lara Rezende, 1922-1992)

O Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente – UNEP, 1992 – qualifica o fenômeno de eutrofização no Brasil como problema identificado em lagos e águas costeiras, caracterizado como grave em águas de represas, rios, sistemas de irrigação, estuários e lagos; assim esses corpos de água são potencialmente favoráveis para o desenvolvimento de florações de cianobactérias tóxicas (NOBRE, 1997).

O primeiro registro de florações de *Trichodesmium* sp. em águas brasileiras foi referido em março de 1832, por Charles Darwin, na Bahia, em sua expedição no navio Beagle. Faria (1914), Cunha e Fonseca (1918) e Proença (2000) se referem a mortandade de peixes na Baía de Guanabara, em 1913, devido a florações de *Glenodinium trochoideum*. Muitos anos depois (1963), florações de *T. erythraeum*, em Pernambuco, foram associadas à doença em humanos, com sintomatologia de febre, conhecida como Tamandaré, nome da cidade onde a doença foi primeiro registrada (GARCIA *et al*, 1995)

Branco (1978) relatou que em 1977, na cidade de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, ocorreu um caso de floração tóxica em uma represa da qual era captada água para o abastecimento público. Nessa represa, anualmente, ocorriam florações de cianobactérias do gênero *Anabaena*, mas somente naquela ocasião foi constatada toxicidade na água.

Existem relatos de que no reservatório de Itaparica/BA, em 1988, ocorreu uma floração de cianobactérias, com posterior intoxicação de 200 pessoas, levando a óbito 88 pessoas, entre março e abril do mesmo ano (SCHULZE *et al.*, 2003).

Beyruth *et al* (1992) relataram que uma floração de *Anabaena* cf. *solitária*, no ano de 1991, foi relacionada a distúrbios gastrointestinais e hepáticos na população

abastecida pelas águas do Guarapiranga, sendo o primeiro caso registrado na literatura científica de ocorrência de danos à saúde pública por cianobactérias em águas paulistas. A mesma autora citou que no ano de 1991, patos criados em um tanque do zoológico da cidade de São Paulo apareceram mortos, após florações de *Microcystis aeruginosa*, sendo a toxicidade da floração constatada após bioensaios feitos em camundongos.

Entretanto, o caso mais marcante, talvez pela confirmação da presença de microcistinas, foi o de Caruaru/PE, em 1996, com a morte de 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise (AZEVEDO, 1998).

A tabela 4, a seguir, mostra as ocorrências de florações, identificadas nos últimos 26 anos, no Brasil.

Tabela 4: Ocorrências de florações de cianobactérias no Brasil.

Ano	Local	Organismos	Métodos	Toxicidade	Fonte
1978-1979	Represa do Lobo, São Carlos – SP	<i>Oscillatoria sp, Hapalosiphon sp,</i> <i>Calothrix sp, Anabaena sp</i>		ND*	Soares, 1981
1984	Lagoa do Taquaral-SP	<i>Microcystis aeruginosa, Anabaena</i> <i>spiroides</i>		ND	Matsumara-Tundisi <i>et al.</i> , 1986
1990	Enseada do Flamengo à Baía de Ubatumirim (Ubatuba-Litoral Norte SP)	<i>Oscillatoria erytraea</i>		ND	Gianesella-Galvão <i>et al.</i> , 1995
1988-1989	Lago Paranoá Brasília DF	<i>Aphanothece nidulans, Aphanothece</i> <i>saxicola, Cyndrospermopsis</i> <i>raciborskii, Merismopedia</i> <i>tenuissima, Microcystis aeruginosa,</i> <i>Oscillatoria mongeotii, Oscillatoria</i> <i>pseudogeminata, Oscillatoria</i> <i>quadripunctulata, Oscillatoria</i> <i>simplicissima, Pseudoanabaena</i> <i>articulata</i>		ND	Castelo Branco, 1991
1991-1992	Represa Guarapiranga- SP	<i>Aphanocapsa cf. delicatissima,</i> <i>Aphanocapsa elachista,</i> <i>Aphanothece elabens, Chroococcus</i> <i>cf minor, Chroococcus cf. minutus,</i> <i>Gloeocapsa sp, Synechococcus</i> <i>elongatus, Anabaenopsis sp,</i> <i>Oscillatoria sancta, Oscillatoria</i> <i>subtilissima</i>		ND	Beyruth, 1996
1991-1992	Lago das Garças - SP	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis viridis, Microcystis</i> <i>wesenbergii</i> <i>Microcystis pulvereae, Aphanocapsa</i> <i>elachista, Aphanothece nidulans,</i> <i>Chroococcus minutus,</i> <i>Coelosphaerium confertum,</i> <i>Merismopedia elegans,</i> <i>Anabaenopsis sp, Spirulina sp</i>		ND	Sant' Anna <i>et al.</i> , 1997
1992-1993	Lagoa dos Patos	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaios em camundongos	Alterações hepáticas	Salomon <i>et al.</i> , 1996
1992-1997	Reservatório da Pampulha (MG)	<i>Microcystis flos-aquae, Microcystis</i> <i>viridis, Woronichinia naegeliana</i> <i>Phormidium tenue, Phormidium</i> <i>cf. tenue, Pseudoanabaena mucicola</i>		ND	Giani <i>et al.</i> , 1999
		<i>Pseudoanabaena catenata,</i> <i>Anabaena solitaria</i>			
1992-1997	Mata Atlântica, Cerrado, Regiões de Águas Duras, Região Nordeste, Floresta Subtropical e Floresta Tropical (Estado-SP)	<i>Phormidium retzii, Calothrix fusca,</i> <i>Cyldrospermum minutissimum,</i> <i>Dichothrix baueriana, Geitlerinema</i> <i>splendidum, Gloeotrichia natans,</i> <i>Lyngbya major</i>		ND	Branco <i>et al.</i> , 2001
1993	Lagoa da Barra	<i>Synechocystis aquatilis f. salina</i>		ND	Domingos e Huszar

	Complexo Lagunar de Marica (RJ)				(1993)
1993	Reservatório de Barra Bonita-Médio Tiête-SP	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis flos-aquae</i> , <i>Microcystis wesenbergii</i> , <i>Microcystis</i> sp <i>Protocystis pseudofilamentosa</i>		ND	Sandes, 1998
1993-1994	Reservatório Guarapiranga	<i>Microcystis incerta</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Oscillatoria quadripunctulada</i> , <i>Oscillatoria limnetica</i> , <i>Oscillatoria amphila</i> , <i>Phormidium</i> sp	Bioensaios em camundongos	Distúrbios gastrointestinais	Zagatto <i>et al.</i> , 1998
1993-1994	Reservatório de Barra Bonita-Médio Tiête-SP	<i>Anabaena spiroides</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena granulata</i> , <i>Anabaena angustissima</i> ,		ND	Calijuri <i>et al.</i> , 2002
1993-1994	Rio Baía, Lagoa do Guaraná -MS	<i>Aphanothece</i> sp, <i>Anabaena</i> sp <i>Anabaena solitaria</i> , <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Anabaena circinalis</i> <i>Cylindropermopsis raciborskii</i> <i>Gloeocapsa</i> sp, <i>Gomphospharia</i> sp <i>Lynghya limnetica</i> , <i>Merismopedia glauca</i> , <i>Coelosphaerium confertum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Planktolynghya</i> sp, <i>Pseudoanabaena</i> sp, <i>Raphidiopsis mediterranea</i> , <i>Romeria cf. graciles</i> <i>Oscillatoria sancta</i> , <i>Oscillatoria tennis</i> , <i>Merismopedia tenuissima</i> ,		ND	Train, 1998
1993-1995	Lagoa dos Patos-RS	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis elabens</i>	Bioensaios em camundongos, crustáceos, HPLC	Distúrbios Gastrointestinais, morte	Yunes <i>et al.</i> , 1998
1994	Lagoa dos Patos-RS	<i>Nostoc</i> , <i>Calotrix</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Lynghya</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Spirulina</i>		ND	Yunes <i>et al.</i> , 1994
1994	Lagoa das Garças (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga-SP)	<i>Aphanocapsa delicatissima</i> , <i>Coelosphaerium</i> sp, <i>Merimopedia tenuissima</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Planktrothrix</i> sp		ND	Moura, 1996
1994	Lagoa das Garças (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga-SP)	<i>Microcystis</i> sp		ND	Ramírez e Bicudo 2002
1994-1995	Lagoa dos Patos-RS	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Oscillatoria</i> sp	Bioensaios em camundongos, HPLC	Distúrbios gastrointestinais	Matthiensen <i>et al.</i> , 1999
1994-1995	Lago Jardim Botânico Chico Mendes-GO Goiânia	<i>Gloethece Nägeli</i> , <i>Gloethece coerulea</i> , <i>Gloethece linearis</i> Näg, <i>Synechococcus Nägeli</i> , <i>Synechococcus elongatus</i> Näg <i>Planktolynghya subtilis</i>		ND	Nogueira e Leandro-Rodrigues, 1999
1994-1996	Estuário da Lagoa dos Patos-RS (Feitoria, Nascimento Norte, Coroa dos Patos,	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaios em Camundongos, <i>Artemia salina</i> , HPLC-DAD	Hepatotoxicose, Morte.	Yunes <i>et al.</i> , 1996

	Farolete, Barra Falsa, Marambaia, Torotama, Canal de São Gonçalo, Ilha Pólvora, Rio Grande Yacht Club, Porteiras, Ponta do Retiro)				
1994-1996	Santa Catarina	<i>Trichodesmium</i> ssp	Bioensaios em camundongos, HPLC	ND	Rörig <i>et al.</i> , 1998
1994-1996	Reservatório Taquacetuba Amparo -SP	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bioensaios em camundongos, HPLC	Distúrbios nervosos	Lagos <i>et al.</i> , 1999
1995-1996	Lagos e Reservatórios do Paraná	<i>Microcystis</i> sp, <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis flos-aquae</i>	ELISA	ND	Hirooka <i>et al.</i> , 1999
1996	Caruaru-PE	<i>Microcystis</i> ssp	Ensaio de Citotoxicidade	Hepatotoxicose	Azevedo, 1998
1996	Lagoa dos Patos-RS	<i>Microcystis</i> sp	Bioensaios em camundongos, Ensaio de inibição de fosfatase, HPLC	Distúrbios hepatotóxicos	Matthiensen <i>et al.</i> , 2000
1996-1999	Lagoa Jacarepaguá-RJ	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Oscillatoria</i> sp	Ensaio de citotoxicidade, HPLC, Elisa	Distúrbios gastrointestinais	Magalhães <i>et al.</i> , 2001
1997	Lagoa dos Patos-RS	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaios em camundongos	ND	Garcia, 1997
1997-1998	Reservatório Ingazeira Pernambuco	<i>Cylindrospermopsis cf philippinensis</i>	Bioensaios em camundongos, peixes	Distúrbios nervosos, morte	Bouvy, 1998
1997-1998	Complexo Estuarino Lagunar: Mundaú/ Manguaba-AL	<i>Aphanizomenon</i> sp, <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Anabaena cf. spiroides</i> , <i>Anabaenopsis circularis</i> var. <i>javanica</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis wesenbergii</i> , <i>Oscillatoria princeps</i> , <i>Oscillatoria limosa</i> , <i>Pseudoanabaena mucicola</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		ND	Magalhães <i>et al.</i> , 1998
1997-1998	Açude Tabocas-PE	<i>Microcystis incerta</i> , <i>Cylindrospermopsis cf. raciborskii</i> , <i>Planktolynghya subtilis</i>	Bioensaios em camundongos, HPLC	ND	Nascimento <i>et al.</i> , 1998
1991-1998	Lago das Garças - Zona Sul - SP	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		ND	Tucci e Sant' Anna, 2003
1997-1998	Estuário Lagoa dos Patos RS	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis</i> sp	Bioensaios em náuplios de <i>Artemia</i> sp	Imobilização, morte	Minillo <i>et al.</i> , 2000
1997-1999	Estações de Tratamento De água - MG	<i>Microcystis viridis</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis pseudofilamentosa</i> , <i>Microcystis flos-aquae</i> , <i>Microcystis wesenbergii</i> ,	Bioensaios em camundongos, HPLC Elisa	Distúrbios nervosos, gastrointestinais	Jardim <i>et al.</i> , 2000

		<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon manguimii</i> , <i>Oscillatoria splendida</i> , <i>Oscillatoria</i> sp <i>Nodularia cf. implexa</i> <i>Anabaena</i> spp, <i>Anabaena planctonica</i> ,			
1997-2003	Região Alto Tiête - SP Reservatório Atibainha Lago garças Reservatório Taiapuê Reservatório Billings Reservatório Americana e Guarapiranga Rio Corumbatai-SP	<i>Aphothoece conglomerata</i> ; <i>Coelosphaerium evidenter-</i> <i>marginatum</i> , <i>Merismopedia</i> <i>tenuissima</i> , <i>Microcystis panniformis</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis</i> <i>botrys</i> ; <i>Microcystis novacekii</i> , <i>Sphaerocavum brasiliense</i> ; <i>Microcystis protocystis</i> <i>Radiocystis fernandoi</i>		ND	Sant' Anna <i>et al.</i> , 2004
1998	Lagoa Jacarepaguá RJ	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaios em zooplâncton	Redução de crescimento e fecundidade	Ferrão-Filho <i>et al.</i> , 1998
1998	Açudes Custódia, Bonsucesso, Ingazeira-PE	<i>Cylindrospermopsis</i> sp	Bioensaios em camundongos Bioensaios em tilápias adultas	Tremores, convulsões, dificuldades res- piratórias, saliva- ção Distúrbios nervosas	Molica <i>et al.</i> , 1998
1998	Lagoa dos Patos-RS	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaios em camundongos e zooplâncton, HPLC	ND	Monteiro <i>et al.</i> , 1998
1998	Reservatórios: PR, SP, RJ, MG, PE, DF	<i>Microcystis</i> sp <i>Cylindrospermopsis</i> sp	Bioensaios em camundongos e peixes, HPLC	ND	Oliveira <i>et al.</i> , 1998
1998	Lagoa dos Patos-RS	<i>Microcystis aeruginosa</i>		ND	Salomon <i>et al.</i> , 1998
1998	Amparo-SP Reservatório Billings, (Taquacetuba)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bioensaios em camundongos, microcrustáceos e peixes.	Distúrbios nervosos	Zagatto <i>et al.</i> , 1998b
1998	Reservatório de Salto Grande-SP	<i>Pseudoanabaena mucicola</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis</i> <i>paniformis</i> , <i>Anabaena crassa</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> sp	HPLC	ND	Deberdt, 2002
1998-1999	Parque Nacional da Serra da Canastra - MG Bacia de Drenagem do Alto Rio São Francisco	<i>Capsosira</i> sp, <i>Hapalosiphon</i> sp, <i>Seytonema</i> sp, <i>Rivularia</i> sp			Necchi-Júnior, <i>et al.</i> 2003
1999-2003	Represa de Salto (RS)- Bacia Rios Cai e Sinos	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bioensaios em camundongos	Distúrbios nervosos	Yunes <i>et al.</i> , 2003

	Represa do Duro (RS)- Rio Duro Represa de Alagados (PR)- Rio Alagados e Pitangui Reservatório de Taiapuêba (SP)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Pseudoanabaena limnetica</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Microcystis</i> sp, <i>Anabaena</i> sp, <i>Cylindrospermopsis</i> sp	Bioensaios em camundongos Bioensaios em camundongos, HPLC Bioensaios em camundongos, HPLC, AchE	Distúrbios nervosos Distúrbios nervosos Distúrbios nervosos	
2000	Lago Pesque Pague (Bacia Guarapiranga SP)	<i>Microcystis paniformis</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Anabaena</i> sp		ND	Matsuzaki, <i>et al.</i> , 2004
2000-2001	Alto Rio Paraná	<i>Anabaena planctonica</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		ND	Train <i>et al.</i> , 2001a
2000-2001	Lagoas da Pousada, Clara e dos Patos Lagoa Finado Raimundo Lagoas das Graças e Traira	<i>Gloeocapsa</i> sp <i>Anabaena solitaria</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		ND	Train <i>et al.</i> , 2001b
2000-2003	Bacia-Rios Piracicaba, Capivari e Jundá (SP)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Anabaena planctonica</i> , <i>Anabaena</i> <i>crassa</i> , <i>Aphanizomenon gracille</i> , <i>Synechocystis aquatilis</i> , <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , <i>Chroococcus minimus</i> , <i>Limnothrix</i> <i>planctonica</i> , <i>Microcystis</i> <i>paniformis</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>		ND	Agujaro <i>et al.</i> , 2003
2002-2003	Sistema Australiano de Lagoas de Estabilização- Novo Horizonte-SP	<i>Aphanocapsa</i> sp, <i>Oscillatoria limnetica</i> , <i>Oscillatoria minesotensis</i> , <i>Rhodphidiopsis curvata</i> <i>Spirulina menghiniana</i> , <i>Aphanothece</i> sp, <i>Synechocystis</i> sp, <i>Synechocystis</i> sp, <i>Chroococcus minutus</i> , <i>Chroococcus</i> sp		ND	Granado, 2004
2002-2003	Lagoa Facultativa ETE Catajá - SP	<i>Anabaena affinis</i> , <i>Anabaena</i> <i>Inaequalis</i> , <i>Chroococcus palidus</i> , <i>Chroococcus turicensis</i> , <i>Merismopedia punctata</i> , <i>Merismopedia tenuissima</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Planktolybya subtilis</i> .		ND	Fiorni, 2004
2002-2003	Represa Faxinal (RS) Represa São Miguel (RS) Represa Maestra (RS) Represa Samuara (RS)	<i>Anabaena spiroides</i> , <i>Anabaena</i> <i>crassa</i> , <i>Anabaena</i> <i>circinalis</i> , <i>Anabaena planctônica</i> <i>Anabaena</i> sp, <i>Microcystis</i> sp <i>Anabaena planctonica</i> , <i>Anabaena</i> <i>spiroides</i> , <i>Anabaena circinalis</i> <i>Anabaena cf. solitaria</i> , <i>Anabaena</i> <i>circinalis</i> <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Anabaena</i>		ND	Yunes <i>et al.</i> , 2004

		<i>crassa, Anabaena sp</i>			
2002	Represas do Médio e Baixo Tietê (SP)	<i>Microcystis viridis, Microcystis sp, Anabaena planctonica, Anabaena circinales Anabaena spiroides, Anabaena sp</i>	Bioensaios em camundongos, zooplâncton	Distúrbios nervosos gastrointestinais	Minillo <i>et al.</i> , 2003
2002	Reservatórios RS, PR, SP	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	HPLC		Proença <i>et al.</i> , 2002
2002	Reservatório Tapacurá-PE	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bioensaios em camundongos, HPLC	Distúrbios nervosos	Bittencourt-Oliveira <i>et al.</i> , 2001
2002-2003	Reservatório São Simão (MG)	<i>Microcystis sp e Anabaena sp</i>		ND	Pinto-Coelho, 2003
2002-2003	Represa do Iraí (PR)	<i>Cylindrospermopsis sp, Oscillatoria sp, Microcystis sp, Aphanocapsa sp</i>	Bioensaios em camundongos, HPLC	ND	Vitola <i>et al.</i> , 2003
2002-2003	Reservatório de Iraí (PR)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii, Microcystis spp</i>		ND	Ventura <i>et al.</i> , 2003
2002-2003	Etas-SC: I-Rio Itajaí-Açú II-Rio Itajaí-Açú III-Manancial Ribeirão Garcia	<i>Anabaena sp, Microcystis sp Oscillatoria sp</i>		ND ND	Schulze <i>et al.</i> , 2003
2003-2004	Represas Billings e Guarapiranga	<i>Aphanocapsa incerta, Microcystis aeruginosa, Anabaena planctonica Anabaena solitaria, Anabaena spiroides, Cylindrospermopsis raciborskii, Raphidiopsis mediterranea, Oscillatoria agardhii, Oscillatoria quadripunctulada, Oscillatoria amphibia, Lyngbya limnetica Pseudoanabaena catenata</i>		ND	Lorenzi, 2004
2004	Pantanal da Nhecolândia MS Lagoa Salina Sto Inácio Lagoa Salina do Meio Faz. Nhumirim Lagoa Salina da Reserva Faz. Nhumirim Lagoa Salitrada Faz. Campo Dora	<i>Arthrospira sp., Microcystis sp., Nostoc sp., Oscillatoria sp., Raphidiopsis sp., Romeria sp., Spirulina sp., Synechococcus sp., Synechocystis sp., Anabaenopsis sp., Cyanomonas sp., Microcystis sp., Nostoc sp., Romeria sp., Spirulina sp., Heterohormogonium sp., Spirulina sp., Cylindrospermum sp., Anabaenophysis sp., Aphanizomenon sp., Cylindrospermum sp., Chroococcus sp., Fischerella sp., Gloeocapsa sp., Oscillatoria sp., Schizothrix sp., Spirulina sp., Synechocystis sp.</i>		ND	Santos <i>et al.</i> , 2004

Nota:* ND: Não detectada.

Segundo Bittencourt-Oliveira (2000), em regiões tropicais e subtropicais, a associação de temperatura, intensidade luminosa e altas razões reprodutivas, juntamente com as estratégias adaptativas, favorecem a dominância de determinadas espécies de cianobactérias.

Os mecanismos que favorecem a dominância das cianobactérias em sistemas aquáticos eutrofizados são: a) habilidade de armazenar fósforo dentro das células, tornando-as capazes de realizar divisão celular quando o fósforo torna-se limitante; b) fixação de nitrogênio atmosférico por várias espécies filamentosas formadoras de florações tóxicas, especialmente *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon*; gêneros não heterocitados, como *Microcystis*, requerem condições eutróficas a hipereutróficas com relação a esse elemento químico, para se tornarem dominantes; c) habilidade de migrar na coluna de água graças à presença de aerótopos nas células, permitindo-lhes se posicionar melhor na zona eufótica.

Para Reynolds e Walsby (1975), a formação de florações de cianobactérias depende da coexistência de três fatores: uma população pré-existente, uma proporção significativa de organismos com flutuabilidade positiva e a estabilidade da coluna de água.

Em 1990, Shapiro apresentou seis hipóteses que, conjuntamente, explicariam a dominância de cianobactérias em sistemas aquáticos eutróficos e hipereutróficos:

- 1) **Temperatura da água:** as cianobactérias têm, em geral, temperaturas ótimas de desenvolvimento mais altas, superiores a 20°C, que as outras algas fitoplanctônicas.
- 2) **Luz:** as cianobactérias têm requerimentos luminosos mais baixos que os outros grupos do fitoplâncton. Isto se deve à presença de pigmentos acessórios, as ficobilinas, que proporcionam grande eficiência quanto à absorção de luz solar.
- 3) **Relação NT/PT:** as cianobactérias, fixadoras ou não de nitrogênio, são favorecidas pelas baixas razões NT/PT.
- 4) **Flutuabilidade:** algumas espécies de cianobactérias são capazes de regular sua flutuabilidade e, assim, podem mover-se verticalmente em ambientes estáveis, otimizando sua atividade fotossintética relacionada com a disponibilidade vertical de nutrientes e energia luminosa.
- 5) **Pastagem pelo zooplâncton:** por várias razões (tamanho da colônia, envoltório gelatinoso, toxicidade potencial), o zooplâncton alimenta-se de forma ineficaz

das cianobactérias. Alimenta-se preferencialmente do fitoplâncton competidor, permitindo às cianobactérias proliferarem-se.

- 6) **Dióxido de carbono/pH:** as cianobactérias têm constantes de saturação baixas, para assimilação de CO₂. Vencerão a competição com outros grupos fitoplanctônicos, principalmente as clorofíceas, em períodos de baixa disponibilidade de CO₂ (por exemplo, quando o pH é alto e o sistema CO₂ é dominado por íons bicarbonatos).

Uma sétima hipótese, que consiste na estratégia de armazenamento de fósforo, foi proposta por Petterson *et al.* (1993). Segundo esses autores, as cianobactérias são capazes de adquiri-lo do sedimento.

Para Reynolds (1984), as colônias de *Microcystis* estabelecem-se no epilímnio, após o crescimento ter se iniciado em águas profundas e anóxicas. Estas populações estabelecem-se após o ambiente ter se tornado termicamente e quimicamente estratificado. Esta constatação foi corroborada por Calijuri *et al.* (1999) no reservatório de Salto Grande (SP), por Calijuri e Dos Santos (1996) e Calijuri (1999) em Barra Bonita. Deve-se, ainda, ressaltar que a turbulência da coluna de água em várias escalas, magnitudes e duração é um fator determinante no crescimento do fitoplâncton e, principalmente, na dominância de cianobactérias (REYNOLDS e WALSBY, 1975; PAERL 1988a; CALIJURI, 1999; CALIJURI *et al.* 2002).

Espécies diferentes respondem, diferentemente, a estímulos externos iguais, e a evolução ou coexistência das espécies são explicadas em termos de uma maior eficiência ou adaptação de cada espécie, a uma combinação de características ambientais. Pensando assim, pode-se dizer que as cianobactérias, no curso da evolução, foram extremamente eficientes em assimilar e responder aos distúrbios. Essa disposição ou potencial das cianobactérias para enfrentar os distúrbios, provavelmente, repousa nos processos de diversidade do potencial genético, plasticidade comportamental e fisiológica.

Assim, torna-se extremamente necessário ampliar a compreensão dos processos que ocorrem nos sistemas aquáticos, para proposição de cenários que auxiliem no manejo, que vise a sustentabilidade dos recursos hídricos e a saúde da população.

6. Legislação

“A Lei não persuade quando não pode punir.”

Tomas Fuller (1654-1734)

A CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, promulgada aos 5 de outubro de 1988, estabelece competências quanto à água. Nossa Carta Magna, no entanto, não conceituou nem estabeleceu procedimentos e responsabilidades sobre os temas; legou essa tarefa à legislação infraconstitucional.

No Capítulo II – DA UNIÃO, reza artigo 20: São bens da União:

III – os lagos, rios e quaisquer correntes de água em terrenos de seus domínios, ou que banhem mais de um Estado, sirvam de limites com outros países, ou se estendam a território estrangeiro ou dele provenham, bem como os terrenos marginais e as praias fluviais.

No artigo 21: Compete à União:

XIX – instituir sistema nacional de gerenciamento de recursos hídricos e definir critérios de outorga de direitos de seus uso.

Artigo 22: Compete privativamente à União legislar sobre:

IV – águas, energia, informática, telecomunicações e radiodifusão.

Artigo 23: É competência comum da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios:

VI – proteger o meio ambiente e combater a poluição em qualquer de suas formas.

XI – registrar, acompanhar e fiscalizar as concessões de direitos de pesquisa e exploração de recursos hídricos e minerais em seus territórios.

Artigo 24: Compete à União, aos Estados e ao Distrito Federal legislar concorrentemente sobre:

VI – florestas, caça, pesca, fauna, conservação da natureza, defesa do solo e dos recursos naturais, proteção do meio ambiente e controle da poluição.

No Capítulo III – DOS ESTADOS FEDERADOS, reza:



Artigo 26: Incluem-se entre os bens dos Estados:

I – as águas superficiais ou subterrâneas, fluentes, emergentes e em depósito, ressalvadas, neste caso, na forma da lei, as decorrentes de obras da União.

No Capítulo VIII – DA ORDEM SOCIAL, Capítulo I – DISPOSIÇÃO GERAL, Seção II – DA SAÚDE:

IV – participar da formulação da política e da execução das ações de saneamento básico.

V – incrementar em sua área de atuação o desenvolvimento científico e tecnológico.

VI – fiscalizar e inspecionar alimentos, compreendido o controle de seu teor nutricional, bem como bebidas e águas para consumo humano.

VIII – colaborar na proteção do meio ambiente, nele compreendido e do trabalho.

Capítulo VI – DO MEIO AMBIENTE:

Artigo 225: Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

§ 1º - Para assegurar a efetividade desse direito, incube ao Poder Público:

I – preservar e restaurar os processos ecológicos essenciais e prover o manejo ecológico das espécies e ecossistemas.

III – definir, em todas as unidades da Federação, espaços territoriais e seus componentes a serem especialmente protegidos, sendo a alteração e a supressão permitidas somente através de lei, vedada qualquer utilização que comprometa a integridade dos atributos que justifiquem sua proteção.

IV – exigir, na forma da lei, para instalação de obra ou atividades potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, estudo prévio de impacto ambiental, a que se dará publicidade.

VII – proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais a crueldade.

§ 4º - A Floresta Amazônica brasileira, a Mata Atlântica, a Serra do Mar, o Pantanal Mato-Grossense e a Zona Costeira são patrimônio nacional, e sua utilização

far-se-á, na forma da lei, dentro de condições que assegurem a preservação do meio ambiente, inclusive quanto ao uso dos recursos naturais.

A Portaria MS nº 1469 de 29 de dezembro de 2000 (Brasil, 2001), conforme estabelece constitucionalmente os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências.

A Portaria nº 1469 definiu normas e padrões de potabilidade da água para consumo humano no Brasil, incluindo a obrigatoriedade do monitoramento da ocorrência de cianobactérias potencialmente nocivas, testes de toxicidade e análises de algumas cianotoxinas (microcistina, cilindrospermopsina, saxitoxina) tanto na água bruta do manancial utilizado para a captação de água, como na água tratada para o consumo doméstico.

Devido aos casos de intoxicações causadas por cianotoxinas, a Portaria nº1469, traz várias normas a respeito do assunto e como proceder se for detectada a presença de cianobactérias na água.

Segundo Leme e Silva (2002), a Portaria nº1.469 não estabeleceu limites para cianotoxinas em águas de hemodiálise; e a Sociedade Brasileira de Nefrologia recomendou que fosse estabelecida como nula a presença de microcistinas.

A Portaria nº 1469, foi substituída pela Portaria MS nº 518 de 25 de março de 2004, publicada no DOU de 2 de abril de 2004 (Brasil, 2004) que mantém estabelecidos os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso de suas atribuições e considerando o disposto no Art. 2º do Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977, resolve:

Art. 1º - Aprovar a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano, na forma do Anexo desta Portaria, de uso obrigatório em todo território nacional.

Art. 3º - É de responsabilidade da União, dos Estados, dos Municípios e do Distrito Federal a adoção das medidas necessárias para o fiel cumprimento desta Portaria.

Art. 4º - O Ministério da Saúde promoverá, por intermédio da Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS, a revisão da Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano estabelecida nesta Portaria, no prazo de 5 anos ou a qualquer tempo, mediante

solicitação devidamente justificada de órgãos governamentais ou não governamentais de reconhecida capacidade técnica nos setores objeto desta regulamentação.

No Capítulo II – DAS DEFINIÇÕES:

Art. 4º - Para os fins a que se destina esta Norma, são adotadas as seguintes definições:

XI - cianotoxinas - toxinas produzidas por cianobactérias que apresentam efeitos adversos à saúde por ingestão oral, incluindo:

a) microcistinas - hepatotoxinas heptapeptídicas cíclicas produzidas por cianobactérias, com efeito potente de inibição de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A e promotoras de tumores;

b) cilindrospermopsina - alcalóide guanidínico cíclico produzido por cianobactérias, inibidor de síntese protéica, predominantemente hepatotóxico, apresentando também efeitos citotóxicos nos rins, baço, coração e outros órgãos; e

c) saxitoxinas - grupo de alcalóides carbamatos neurotóxicos produzido por cianobactérias, não sulfatados (saxitoxinas) ou sulfatados (goniautoxinas e C-toxinas) e derivados decarbamil, apresentando efeitos de inibição da condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio.

No Capítulo III – DOS DEVERES E DAS RESPONSABILIDADES:

Art. 5º São deveres e obrigações do Ministério da Saúde, por intermédio da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS:

I - promover e acompanhar a vigilância da qualidade da água, em articulação com as Secretarias de Saúde dos Estados e do Distrito Federal e com os responsáveis pelo controle de qualidade da água, nos termos da legislação que regulamenta o SUS;

II - estabelecer as referências laboratoriais nacionais e regionais, para dar suporte às ações de maior complexidade na vigilância da qualidade da água para consumo humano;

III - aprovar e registrar as metodologias não contempladas nas referências citadas no artigo 17 desta Norma;

IV - definir diretrizes específicas para o estabelecimento de um plano de amostragem a ser implementado pelos Estados, Distrito Federal ou Municípios, no exercício das atividades de vigilância da qualidade da água, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS; e

V - executar ações de vigilância da qualidade da água, de forma complementar, em caráter excepcional, quando constatada, tecnicamente, insuficiência da ação estadual, nos termos da regulamentação do SUS.

Também a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 (Brasil, 2004) faz como determinação no Capítulo IV:

Art. 8º - Cabe aos responsáveis pela operação de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, exercer o controle da qualidade da água.

Parágrafo único. Em caso de administração, em regime de concessão ou permissão do sistema de abastecimento de água, é a concessionária ou a permissionária a responsável pelo controle da qualidade da água.

Art. 9º - Aos responsáveis pela operação de sistema de abastecimento de água incumbe:

I - operar e manter sistema de abastecimento de água potável para a população consumidora, em conformidade com as normas técnicas aplicáveis publicadas pela ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas e com outras normas e legislações pertinentes;

II - manter e controlar a qualidade da água produzida e distribuída, por meio de:

a) controle operacional das unidades de captação, adução, tratamento, reservação e distribuição;

b) exigência do controle de qualidade, por parte dos fabricantes de produtos químicos utilizados no tratamento da água e de materiais empregados na produção e distribuição que tenham contato com a água;

c) capacitação e atualização técnica dos profissionais encarregados da operação do sistema e do controle da qualidade da água; e

d) análises laboratoriais da água, em amostras provenientes das diversas partes que compõem o sistema de abastecimento.

III - manter avaliação sistemática do sistema de abastecimento de água, sob a perspectiva dos riscos à saúde, com base na ocupação da bacia contribuinte ao manancial, no histórico das características de suas águas, nas características físicas do sistema, nas práticas operacionais e na qualidade da água distribuída;

IV - encaminhar à autoridade de saúde pública, para fins de comprovação do atendimento a esta Norma, relatórios mensais com informações sobre o controle da qualidade da água, segundo modelo estabelecido pela referida autoridade;

V - promover, em conjunto com os órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos, as ações cabíveis para a proteção do manancial de abastecimento e de sua bacia contribuinte, assim como efetuar controle das características das suas águas, nos termos do artigo 19 desta Norma, notificando imediatamente a autoridade de saúde pública sempre que houver indícios de risco à saúde ou sempre que amostras coletadas apresentarem resultados em desacordo com os limites ou condições da respectiva classe de enquadramento, conforme definido na legislação específica vigente;

VI - fornecer a todos os consumidores, nos termos do Código de Defesa do Consumidor, informações sobre a qualidade da água distribuída, mediante envio de relatório, dentre outros mecanismos, com periodicidade mínima anual e contendo, no mínimo, as seguintes informações:

a) descrição dos mananciais de abastecimento, incluindo informações sobre sua proteção, disponibilidade e qualidade da água;

b) estatística descritiva dos valores de parâmetros de qualidade detectados na água, seu significado, origem e efeitos sobre a saúde; e

c) ocorrência de não conformidades com o padrão de potabilidade e as medidas corretivas providenciadas.

VII - manter registros atualizados sobre as características da água distribuída, sistematizados de forma compreensível aos consumidores e disponibilizados para pronto acesso e consulta pública;

VIII - comunicar, imediatamente, à autoridade de saúde pública e informar, adequadamente, à população a detecção de qualquer anomalia operacional no sistema ou não conformidade na qualidade da água tratada, identificada como de risco à saúde, adotando-se as medidas previstas no artigo 29 desta Norma; e

IX - manter mecanismos para recebimento de queixas referentes às características da água e para a adoção das providências pertinentes.

Art. 10º - Ao responsável por solução alternativa de abastecimento de água, nos termos do inciso XII do artigo 7 desta Norma, incumbe:

I - requerer, junto à autoridade de saúde pública, autorização para o fornecimento de água apresentando laudo sobre a análise da água a ser fornecida, incluindo os parâmetros de qualidade previstos nesta Portaria, definidos por critério da referida autoridade;

II - operar e manter solução alternativa que forneça água potável em conformidade com as normas técnicas aplicáveis, publicadas pela ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, e com outras normas e legislações pertinentes;

III - manter e controlar a qualidade da água produzida e distribuída, por meio de análises laboratoriais, nos termos desta Portaria e, a critério da autoridade de saúde pública, de outras medidas conforme inciso II do artigo anterior;

IV - encaminhar à autoridade de saúde pública, para fins de comprovação, relatórios com informações sobre o controle da qualidade da água, segundo modelo e periodicidade estabelecidos pela referida autoridade, sendo no mínimo trimestral;

V - efetuar controle das características da água da fonte de abastecimento, nos termos do artigo 19 desta Norma, notificando, imediatamente, à autoridade de saúde pública sempre que houver indícios de risco à saúde ou sempre que amostras coletadas apresentarem resultados em desacordo com os limites ou condições da respectiva classe de enquadramento, conforme definido na legislação específica vigente;

VI - manter registros atualizados sobre as características da água distribuída, sistematizados de forma compreensível aos consumidores e disponibilizados para pronto acesso e consulta pública;

VII - comunicar, imediatamente, à autoridade de saúde pública competente e informar, adequadamente, à população a detecção de qualquer anomalia identificada como de risco à saúde, adotando-se as medidas previstas no artigo 29; e

VIII - manter mecanismos para recebimento de queixas referentes às características da água e para a adoção das providências pertinentes.

Art. 12º Para a garantia da qualidade microbiológica da água, em complementação às exigências relativas aos indicadores microbiológicos, deve ser observado o padrão de turbidez expresso no Quadro 3, abaixo (pertencente à lei e não ao trabalho):

Quadro 3 - Padrão de turbidez para água pós-filtração ou pré-desinfecção

TRATAMENTO DA ÁGUA	VMP ⁽¹⁾
Desinfecção (água subterrânea)	1,0 UT ⁽²⁾ em 95% das amostras
Filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta)	1,0 UT ⁽²⁾
Filtração lenta	2,0 UT ⁽²⁾ em 95% das amostras

NOTAS:

(1) Valor máximo permitido.

(2) Unidade de turbidez.

Art. 14º A água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam risco para a saúde, expresso no Quadro 4 (pertencente à lei e não ao trabalho), a seguir:

Quadro 4 - Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde

PARÂMETRO	UNIDADE	VMP ⁽¹⁾
INORGÂNICAS		
Antimônio	mg/L	0,005
Arsênio	mg/L	0,01
Bário	mg/L	0,7
Cádmio	mg/L	0,005
Cianeto	mg/L	0,07
Chumbo	mg/L	0,01
Cobre	mg/L	2
Cromo	mg/L	0,05
Fluoreto ⁽²⁾	mg/L	1,5
Mercúrio	mg/L	0,001
Nitrato (como N)	mg/L	10
Nitrito (como N)	mg/L	1
Selênio	mg/L	0,01
ORGÂNICAS		
Acrilamida	µg/L	0,5
Benzeno	µg/L	5

Benzo[a]pireno	µg/L	0,7
Cloreto de Vinila	µg/L	5
1,2 Dicloroetano	µg/L	10
1,1 Dicloroetano	µg/L	30
Diclorometano	µg/L	20
Estireno	µg/L	20
Tetracloroeto de Carbono	µg/L	2
Tetracloroetano	µg/L	40
Triclorobenzenos	µg/L	20
Tricloroetano	µg/L	70
AGROTÓXICOS		
Alaclor	µg/L	20,0
Aldrin e Dieldrin	µg/L	0,03
Atrazina	µg/L	2
Bentazona	µg/L	300
Clordano (isômeros)	µg/L	0,2
2,4 D	µg/L	30
DDT (isômeros)	µg/L	2
Endossulfan	µg/L	20
Endrin	µg/L	0,6
Glifosato	µg/L	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	µg/L	0,03
Hexaclorobenzeno	µg/L	1
Lindano (g-BHC)	µg/L	2
Metolacloro	µg/L	10
Metoxicloro	µg/L	20
Molinato	µg/L	6
Pendimetalina	µg/L	20
Pentaclorofenol	µg/L	9
Permetrina	µg/L	20
Propanil	µg/L	20
Simazina	µg/L	2
Trifluralina	µg/L	20
CIANOTOXINAS		
Microcistinas ⁽³⁾	µg/L	1,0

DESINFETANTES E PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA DESINFECÇÃO		
Bromato	mg/L	0,025
Clorito	mg/L	0,2
Cloro livre ⁽⁴⁾	mg/L	5
Monocloramina	mg/L	3
2,4,6 Triclorofenol	mg/L	0,2
Trihalometanos Total	mg/L	0,1

NOTAS:

(1) Valor Máximo Permitido.

(2) Os valores recomendados para a concentração de íon fluoreto devem observar à legislação específica vigente relativa à fluoretação da água, em qualquer caso devendo ser respeitado o VMP desta Tabela.

(3) É aceitável a concentração de até 10 µg/L de microcistinas em até 3 (três) amostras, consecutivas ou não, nas análises realizadas nos últimos 12 (doze) meses.

(4) Análise exigida de acordo com o desinfetante utilizado.

§ 1º - Recomenda-se que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de cilindrospermopsina e saxitoxinas (STX), observando, respectivamente, os valores limites de 15,0 µg/L e 3,0 µg/L de equivalentes STX/L.

Art. 17º- As metodologias analíticas para determinação dos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e de radioatividade devem atender às especificações das normas nacionais que disciplinem a matéria, da edição mais recente da publicação Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, de autoria das instituições American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF), ou das normas publicadas pela ISO (International Standardization Organization).

§ 1º - Para análise de cianobactérias e cianotoxinas e comprovação de toxicidade por bioensaios em camundongos, até o estabelecimento de especificações em normas nacionais ou internacionais que disciplinem a matéria, devem ser adotadas as metodologias propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua publicação Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.

§ 2º - Metodologias não contempladas nas referências citadas no § 1º e “caput” deste artigo, aplicáveis aos parâmetros estabelecidos nesta Norma, devem, para ter validade, receber aprovação e registro pelo Ministério da Saúde.

§ 3º - As análises laboratoriais para o controle e a vigilância da qualidade da água podem ser realizadas em laboratório próprio ou não que, em qualquer caso, deve manter programa de controle de qualidade interna ou externa ou ainda ser acreditado ou certificado por órgãos competentes para esse fim.

Art. 18º- Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água devem elaborar e aprovar, junto à autoridade de saúde pública, o plano de amostragem de cada sistema, respeitando os planos mínimos de amostragem expressos nas Quadros 5, 6, (pertencentes à lei e não ao trabalho):

§ 5º - Sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder 20.000 células/mL (2 mm³/L de biovolume), durante o monitoramento que trata § 3º do artigo 19, será exigida a análise semanal de cianotoxinas na água de saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis), sendo que esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização semanal de bioensaios em camundongos.

Quadro 5 - Número mínimo de amostras para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo de manancial

PARÂMETRO	TIPO DE MANANCIAL	SAÍDA DO TRATAMENTO (NÚMERO DE AMOSTRAS POR UNIDADE DE TRATAMENTO)	SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO (RESERVATÓRIOS E REDE)		
			População abastecida		
			< 50.000 hab.	50.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Cor Turbidez pH	Superficial	1	10	1 para cada 5.000 hab.	40 + (1 para cada 25.000 hab.)
	Subterrâneo	1	5	1 para cada 10.000 hab.	20 + (1 para cada 50.000 hab.)
CRL ⁽¹⁾	Superficial	1	(Conforme § 3º do artigo 18).		
	Subterrâneo	1			
Fluoreto	Superficial ou Subterrâneo	1	5	1 para cada 10.000 hab.	20 + (1 para cada 50.000 hab.)
Cianotoxinas	Superficial	1 (Conforme § 5º do artigo 18)	-	-	-
Trihalometanos	Superficial	1	1 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾
	Subterrâneo	-	1 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾
Demais parâmetros ⁽³⁾	Superficial ou Subterrâneo	1	1 ⁽⁴⁾	1 ⁽⁴⁾	1 ⁽⁴⁾

NOTAS:

(1) Cloro residual livre.

(2) As amostras devem ser coletadas, preferencialmente, em pontos de maior tempo de detenção da água no sistema de distribuição.

(3) Apenas será exigida obrigatoriedade de investigação dos parâmetros radioativos quando da evidência de causas de radiação natural ou artificial.

(4) Dispensada análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

Quadro 6 - Freqüência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo de manancial.

PARÂMETRO	TIPO DE MANANCIAL	SAÍDA DO TRATAMENTO (FREQUÊNCIA POR UNIDADE DE TRATAMENTO)	SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO (RESERVATÓRIOS E REDE)		
			População abastecida		
			<50.000 hab.	50.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Cor	Superficial	A cada 2 horas	Mensal	Mensal	Mensal
Turbidez					
pH	Subterrâneo	Diária			
Fluoreto					
CRL ⁽¹⁾	Superficial	A cada 2 horas	(Conforme § 3º do artigo 18).		
	Subterrâneo	Diária			
Cianotoxinas	Superficial	Semanal (Conforme § 5º do artigo 18)	-	-	-
Trihalometanos	Superficial	Trimestral	Trimestral	Trimestral	Trimestral
	Subterrâneo	-	Anual	Semestral	Semestral
Demais parâmetros ⁽²⁾	Superficial ou Subterrâneo	Semestral	Semestral ⁽³⁾	Semestral ⁽³⁾	Semestral ⁽³⁾

NOTAS:

(1) Cloro residual livre.

(2) Apenas será exigida obrigatoriedade de investigação dos parâmetros radioativos quando da evidência de causas de radiação natural ou artificial.

(3) Dispensada análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

Art. 19º - Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas e de soluções alternativas de abastecimento supridos por manancial superficial devem coletar amostras semestrais da água bruta, junto do ponto de captação, para análise de acordo com os parâmetros exigidos na legislação vigente de classificação e enquadramento de águas superficiais, avaliando a compatibilidade entre as características da água bruta e o tipo de tratamento existente.

§ 1º - O monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer a frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/ml (ou 1mm³/L de biovolume), e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor.

§ 2º- É vedado o uso de algicidas para o controle do crescimento de cianobactérias ou qualquer intervenção no manancial que provoque a lise das células desses microrganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder 20.000 células/ml (ou 2mm³/L de biovolume), sob pena de comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados às cianotoxinas.

Art. 20º - A autoridade de saúde pública, no exercício das atividades de vigilância da qualidade da água, deve implementar um plano próprio de amostragem, consoante diretrizes específicas elaboradas no âmbito do Sistema único de Saúde - SUS.

A norma trás no capítulo VIII, as disposições finais, segundo os artigos:

Art. 29º - Sempre que forem identificadas situações de risco à saúde, o responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água e as autoridades de saúde pública devem estabelecer entendimentos para a elaboração de um plano de ação e tomada as medidas cabíveis, incluindo a eficaz comunicação a população, sem prejuízo das providências imediatas para a correção da anormalidade.

Art. 30º - O responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água pode solicitar à autoridade de saúde pública a alteração na frequência mínima de amostragem de determinados parâmetros estabelecidos nesta Norma.

Parágrafo único. Após avaliação criteriosa, fundamentada em inspeções sanitárias e, ou, em histórico mínimo de dois anos do controle e da vigilância da qualidade de água, a autoridade de saúde pública decidirá quanto ao deferimento da solicitação, mediante emissão de documento específico.

Art. 31º - Em função de características não conformes com o padrão de potabilidade da água ou de outros fatores de risco, a autoridade de saúde pública

competente, com fundamento em relatório técnico, determinará ao responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água que amplie o número mínimo de amostras, aumente a frequência de amostragem ou realize análises laboratoriais de parâmetros adicionais ao estabelecido na presente Norma.

Art. 32º - Quando não existir na estrutura administrativa do estado a unidade da Secretaria da Saúde, os deveres e responsabilidades previstos no artigo 6º desta Norma serão cumpridos pelo órgão equivalente.

7 Considerações Finais

“É porém, melhor que uma verdade, uma vez percebida, lute por muito tempo sem atrair a atenção que merece, do que se tudo o que a imaginação ardente do homem produz fosse facilmente recebido”

(Jean B Lamarck, 1744-1829)

Os registros de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas no Brasil cresceram significativamente nos últimos 15 anos. Entretanto, a maior frequência dos casos é verificada no Estado do Rio Grande do Sul, fato que, provavelmente, deve-se à grande quantidade de trabalhos científicos com esse tema na região.

Os fatores apontados como causadores desse fenômeno, de grande impacto do ponto de vista sócio-econômico, são: o aporte de grande carga orgânica nas águas (principalmente N e P), a carência, na maioria dos centros urbanos, de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e a falta de uma postura ambientalmente correta da população.

Avaliar a ocorrência e os efeitos dessas florações, em um país da magnitude do Brasil, constitui tarefa difícil e complexa, devido: ao tamanho territorial do país, que apresenta diversidade de ecossistemas e de climas substanciais; falta de um centro de informações eficientes na detecção de florações potencialmente tóxicas, e uma legislação que reponsabilize os causadores das alterações nos sistemas aquáticos, principalmente nas águas continentais, que abastecem a população nos seus usos mais nobres.

Como o desconhecimento é grande em relação ao controle de florações de cianobactérias, as medidas utilizadas por parte dos operadores das ETAS contribuem com o aumento das concentrações de cianotoxinas na água pelo uso de algicidas como: sulfato de cobre ou peróxido de hidrogênio, que levam as células à lise e, conseqüentemente, à liberação de toxinas que se dissolverão na água, além do acúmulo de cobre na cadeia trófica. Conseqüentemente, agravam-se os riscos à saúde da

população e o custo eleva-se na busca por tecnologias que atendam às necessidades de tratamento da água de abastecimento.

As técnicas que estão sendo desenvolvidas para retirada de cianotoxinas das águas são: filtros de carvão ativado em pó (mais eficiente na remoção de microcistina-LR do que anatoxina-a) ou granulado (mais eficiente na remoção de anatoxina-a do que na microcistina-LR); ozonização em águas filtradas; adição de permanganato de potássio em águas filtradas; aplicação de radiação ultra-violeta em doses mais elevadas que as usadas para desinfecção e cloração para atingir pH 5, o que remove microcistina-LR e não modifica o teor de anatoxina-a (CARLILE, 1994 e NEWCOMBE *et al.*, 2003). Um resumo dessas técnicas pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5 - Desempenho de algumas técnicas de tratamento para remoção de cianotoxinas.

Técnica de tratamento	Expectativa Células preservadas	de remoção Toxina extracelular	Comentários
Coagulação/sedimentação/flotação por ar dissolvido	>80%	<10%	Remove apenas a toxina contida na célula
Precipitação/sedimentação	>90%	<10%	Remove apenas a toxina contida na célula
Filtração rápida	>60%	<10%	Remove apenas a toxina contida na célula
Filtração lenta em areia	~99%	provavelmente significante	A eficiência para microcistina dissolvida depende do biofilme e do comprimento do filtro
Coagulação/sedimentação/filtração combinadas	>90%	<10%	Remove apenas a toxina contida na célula
Flotação por ar dissolvido	>90%	não avaliada, provavelmente baixa	Remove apenas a toxina contida na célula
Adsorção (PAC) ⁽¹⁾	insignificante	> 85%	Para doses adequadas (>20mg.L ⁻¹), a competição COD ⁽²⁾ reduz a capacidade
Adsorção (GAC) ⁽³⁾	>60%	>80%	A competição COD reduz a capacidade e acelera a quebra, remove as células
Carvão ativado granular biológico	>60%	>90%	A atividade biológica aumenta a eficiência de remoção
Pré ozonização	aumenta coagulação	aumento potencial	Utilizada em dosagens baixas, risco de liberar a toxina
Pré cloração	aumenta coagulação	causa lise e libera metabólitos	Aplicável para cianobactérias tóxicas apenas se o tratamento subsequente remover as toxinas dissolvidas

Ozonização (pós clarificação)	-	>98%	Rápido e eficiente para toxinas solúveis
Cloro livre (pós filtração)	-	>80%	Efetivo >0,5 mg.L ⁻¹ após 30 minutos a pH<8 e baixo COD
Cloramina	-	insignificante	Ineficiente
Dióxido de cloro	-	insignificante	Não efetivo com doses usadas em tratamento de água para abastecimento
Permanganato de potássio	-	95%	Efetivo sobre toxina solúvel, mas apenas na ausência de células completas
Peróxido de hidrogênio	-	insignificante	Não efetivo
Radiação UV	-	insignificante	Capaz degradar microcistina-LR e anatoxina-a, mas apenas em doses impraticavelmente altas
Processos de membranas	>99%	incerto	Depende do tipo de membrana

(1) PAC-carvão ativo em pó.

(2) COD- carbono orgânico dissolvido.

(3) GAC- carvão ativo granulado.

FONTE: Hrudey *et al.*, 1999

Embora no Brasil existam poucos registros de vítimas humanas em função da ocorrência de cianobactérias, os que se tem conhecimento são drásticos como o que aconteceu em 1963, em Pernambuco, na cidade de Tamandaré e em 1988, no reservatório de Itaparica (Bahia). Entretanto, o caso mais grave e que despertou o interesse da comunidade científica - o que é possível avaliar pela quantidade de trabalhos produzidos depois dessa data no Brasil - foi o de Caruaru (Pernambuco), em 1996.

Apesar de extremo, o caso de Caruaru foi importante para o levantamento de alguns pontos que merecem atenção:

- a água como sendo meio de veiculação de toxinas letais;

- a falta de profissionais preparados para a identificação dos microrganismos (tarefa difícil, ainda mais quando se trata de cianobactérias),
- a carência de laboratórios especializados em análises de cianotoxinas;
- a ausência de uma legislação realmente punitiva e específica.

A Portaria nº518, do Ministério da Saúde, estabeleceu os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade de água, padrões de potabilidade, concentrações máximas de algumas cianotoxinas, mas na prática, toda essa normatização ainda não é seguida.

Os problemas ambientais e públicos causados pelas florações são grandes e sua previsão ainda é difícil. Costuma-se fazer o monitoramento das áreas com florações através da contagem celular e identificação pelo uso de microscopia, o que acaba sendo ineficiente, pois as cepas tóxicas e não tóxicas coexistem.

O ideal parece ser uma detecção precoce das cepas tóxicas, antes que as florações se instalassem; e uma alternativa poderia ser a utilização de técnicas de biologia molecular como a reação de cadeia da polimerase (PCR), que usa oligonucleotídeos iniciadores específicos para as seqüências de genes envolvidos na produção de cianotoxinas.

No Brasil, o uso de marcadores em algas e cianobactérias é recente e vários são os desafios impostos para a sua execução em escala como: formação de centros de pesquisas e treinamentos; adaptação das técnicas existentes para os organismos em questão; padronização dos marcadores e desenvolvimento de novas técnicas (OLIVEIRA, 1998). Mas se até mesmo as técnicas de detecção que são exigidas pela Portaria do Ministério da Saúde não são efetuadas, imagine a dificuldade para a aplicação de técnicas de biologia molecular?

Algumas alternativas, levando-se em conta as características regionais-financeiras, poderiam ser adotadas:

- Convênios com centros de pesquisas (universidades, organizações governamentais e particulares) que trabalhem com tecnologia para tratamento do esgoto;
- Formação de profissionais preparados para identificação e classificação das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas;
- O uso de sensoriamento remoto (aerolevanteamento) na identificação de ocorrências de florações de cianobactérias;

- O desenvolvimento de estratégias eficientes no gerenciamento de lagos, represas e reservatórios, (através de treinamento de gerentes e administradores), por meio dos Comitês de Bacias;
- Educação ambiental, buscando a conscientização da população sobre a problemática da água e os impactos causados por atividades antrópicas. Dessa maneira poderá haver a formação de pessoas críticas que pressionarão os órgãos governamentais na busca por soluções.

Outro importante ponto na legislação deveria ser a divulgação das quantidades máximas de cada uma das cianotoxinas conhecidas, não apenas para microcistinas (1 $\mu\text{m/L}$); saxitoxinas (3 $\mu\text{m/L}$) e cilindrospermopsinas (15 $\mu\text{m/L}$).

Segundo Zagatto e Aragão (1997), a Cetesb realizou estudos com camundongos (bioensaios) analisando o limite máximo admissível (LMA) de alguns organismos em água bruta, como pode ser visto no Quadro 7; entretanto, os mesmos não constaram da Portaria nº 1469 de 2000, e não constam da nº 518 de 2004.

Quadro 7 - Espécies de cianobactérias e seus limites máximos admissíveis (LMA) em água bruta.

Espécies	DL ₅₀ ; 24 h (mg/kg)	LMA (mg/L)	LMA em nº de células ou filamentos/ml
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	12,1	0,175	450
<i>Microcystis aeruginosa</i>	35,3	0,875	**195.000
<i>Phormidium</i> sp	545,6	8,75	250.000
<i>Oscillatoria limnetica</i>	707,1	8,75	350.000
<i>Oscillatoria quadripunctulada</i>	742,7	8,75	130.000
<i>Oscillatoria amphibia</i>	687,4	8,75	-
<i>Microcystis incerta</i>	496,8	1,75	-

** células

FONTE: Zagatto e Aragão (1997).

No entanto, é impossível negar que nos últimos anos tem-se observado o aumento potencial nas pesquisas realizadas nas universidades e o esforço na capacitação de pessoal (biólogos, químicos, ecólogos) para o trabalho com cianobactérias. Além dos

cursos de pós-graduação, muitos encontros científicos são realizados com o intuito de discutir e propor soluções a esse problema.

Além disso, em todo o mundo, pesquisadores vêm propondo estratégias para o manejo de ecossistemas aquáticos que englobam medidas de controle de florações de cianobactérias, como as que podem ser vistas na tabela 6.

Tabela 6- Estratégias utilizadas para o controle das florações.

Estratégias	Métodos	Técnicas
1. Prevenção da Floração	Manejo da bacia hidrográfica	
	Métodos físicos de tratamento	Circulação artificial da água Aeração do hipolímnion Camada de aeração Retirada de água do hipolímnion Dragagem e bloqueio do sedimento Redução da floração pela descarga
	Métodos químicos	Redução da entrada de nutrientes Precipitação e inativação do fósforo no lago Uso de algicidas
	Métodos biológicos	Aumento da pressão de predação Aumento da competição pela introdução de macrófitas Uso de cianófagos e mixobactérias Alelopatia Palha de cevada
2. Controles Operacionais	Remoção da nata Manejo da vazão	Redução do tempo de residência da água no reservatório
3. Métodos Químicos para Erradicação da Floração	Sulfato de cobre Permanganato de potássio Outras substâncias químicas	Cal Substâncias orgânicas

FONTE: Adaptada de Yoo *et al.*, 1995.

Para o manejo das florações, a caracterização da bacia hidrográfica, observando o uso e ocupação do solo (matas e florestas; agricultura e localização de centros urbanos), é imprescindível. A partir disso o gerenciamento e controle das florações podem ser de caráter preventivo ou corretivo, sendo o preventivo o caminho mais desejável, pois evita alterações das características organolépticas, produção e liberação de compostos tóxicos. No entanto, nenhuma técnica de prevenção é simples. Assim, a escolha do melhor método deverá ser feita após estudo sobre as variáveis físicas, químicas e biológicas que atuam sinérgica e antagonisticamente no sistema aquático em questão.

Os governantes brasileiros deveriam investir em trabalhos voltados à redução do aporte de nutrientes nas águas, que é a principal causa da eutrofização que tem como consequência a ocorrência de florações de cianobactérias. O investimento em pesquisas (métodos de detecção, técnicas moleculares) poderá diminuir a distância que existe entre a degradação ambiental e o desenvolvimento com sustentabilidade, pois as características sanitárias dos ecossistemas aquáticos são de suma importância, já que a qualidade das águas é o produto final dos processos desenvolvidos nas bacias hidrográficas.

8 Referências Bibliográficas

“No esforço para entender a realidade, somos um homem que tenta compreender o mecanismo de um relógio fechado. Ele vê o mostrador e os ponteiros, escuta o tique-taque, mas não tem como abrir a caixa. Sendo habilidoso, pode imaginar o mecanismo responsável pelo que ele observa, mas nunca estará seguro de que sua explicação é a única possível.”

Albert Einstein (1879-1955).

AGUJARO, L.F.; ISAAC, R. de L. (2003). I-087- *Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá – Estado de São Paulo – Brasil e avaliação das mananciais em relação à eutrofização*. 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES- Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 8p.

AMORIM, A.M.G. (1997). *Acumulação e Depuração de Microcistinas por Mytilus Galloprovincialis Lamarck*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto .69p.

AN, J.; CARMICHAEL, W.W. (1994). Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno sorbent assay or the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*, v.32, p.1495-1507.

APHA (1995). *Standart Methods: for examination of water and wastewater*. 19 ed *AWWA*. Washington, American Public Health Association. 1134p.

ARAR, E.J. (1997). Determination of Chlorophyll a, b, c1 and c2, and Pheophytin a in marine and freshwater phytoplankton by spectrophotometry. *EPA method 446.0*. EPA.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A. da M. (2003). *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Paulo: Rima. 322 p.

AZEVEDO, S.M.F.O. (1998). Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a Saúde Pública. *Medicina On Line*, v.1, Ano 1, n. 3. Jul/Ago/Set.

BAKER, D.R. (1995). *Capillary eletrophoresis*. Wiley-Interscience John Wiley & Sons, Inc. Unidet States of America. 244p.

BARNES, R.D.; RUPPERT, E.E.(1996). *Zoologia dos invertebrados*.Roca p 4-6.

BEYRUTH, Z. (1996). *Comunidade fitoplanctônica da Represa de Guarapiranga: 1991-92. Aspectos ecológicos, sanitários e subsídios para reabilitação da qualidade ambiental*. Tese. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo. 191p.

BEYRUTH, Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; CARVALHO, M.C.; PEREIRA, H.A.S.L. (1992). Toxic algae in freswaters of São Paulo State. p. 53-64. In: CORDEIRO-MARINHO, M.; AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L.; TOMITA, N. Y. & PLASTINO, E. M. *Algae and Environment: a general approach*. SBFic/CETESB.

BICUDO, C.E. M., BICUDO, R.M.T.(1970). *Algas de águas continentais brasileiras: chave ilustrada para identificação de gêneros*. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências. São Paulo: FUNDEC. 228 p.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. (2000). Development of *Microcystis aeruginosa* (Kützing). Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. *Algolog. Stud.* 99: 29-37.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., OLIVEIRA M.C., YUNES, J.S. (2001). Cianobactérias Tóxicas: O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento* n°23. novembro/dezembro

BLACK, J.G. (2002). *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*. 4ª ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan S.A. 829 p.

BLOMQUIST, P.; PETTERSON, A.; HYENSTRAND, P. (1994). Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Arch Hydrobiol*, n.132, p.141-164.

BOUCAÏNA, N., VIA-ORDORIKI, L., VANDEVELDE, T., FAUCHON, N., PUISEUX-DAO, S. (1998). Toxic Cyanoprokaryotes in resource waters: monitoring of their occurrence and toxin detection. *OECD Workshop Molecular Methods for the Safe Drinking Water*. Paris. p.1-9.

BOUVY, M. (1998). Condições e consequências da proliferação de cianobactérias nos reservatórios. *Cendotec- França-Flash*. nº17. 2p.

BRANCO, L.H.Z.; NECCHI-JÚNIOR, O.; BRANCO, C.C.Z. (2001). Ecological distribution of Cyanophyceae in lotic ecosystems of São Paulo State. *Revista Brasil. Bot.* São Paulo. v.24, n1, p.99-108.

BRANCO, S.M. (1978). *Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária*. 2.ed. São Paulo: Companhia de Saneamento Ambiental. 620 p.

BRASIL.(2001). Portaria nº1.469 de 29 de dezembro de 2000: aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 32p.

BRASIL (2004). Portaria nº518 de 25 de Março de 2004. Brasília: Ministério da Saúde. 21p.

BROOKS, W.P. e CODD, G.A. (1986). Extraction and purification of toxic peptides from the natural blooms and laboratory isolates of the cyanobacterium. *Letters in Applied Microbiology*. n.2. p. 1-3.

CALDAS, L.Q. de A.; GUERRA, L.R.; MORAES, A.C.L. de; ROCHA, S.R.A.; UNES, A.F.; CALDAS, A.F. de A.; FONSECA, A.F.; MARTINS, I. de O. (2000). Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. *Centro de Controle de Intoxicações (CCIn)*. Hospital Universitário Antônio Pedro. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 40 p.

CALIJURI, M.C. (1985). *Curvas de luz-fotossíntese e fatores ecológicos em ecossistema artificial e estratificado – Represa do Broa (Lobo), São Carlos, S.P.* Dissertação de Mestrado. PPG em Ecologia e Recursos Naturais, DCB-UFSCAR, São Carlos. 280p.

_____. (1988). *Respostas fisiocológicas da comunidade fitoplanctônica e fatores ecológicos em ecossistemas com diferentes estágios de eutrofização*. Tese de Doutorado: PPG em Hidráulica e Sanemanto, EESC-USP, São Carlos. 239p.

_____. (1999). *A comunidade fitoplanctônica em um Reservatório Tropical (Barra Bonita, SP)*. Tese de Livre-Docência. Departamento de Hidráulica e Saneamento, EESC-USP. São Carlos. 211p.

CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A. (1996). Short-term changes in the Barra Bonita reservoir (São Paulo, Brazil): emphasis on the phytoplankton communities. *Hydrobiologia*, 330, p.163-175.

CALIJURI, M.C.; DEBERDT, G.L. B.; MINOTI, R. (1999). A produtividade primária pelo phytoplankton na Represa de Salto Grande (Americana-SP). In Henry, R. (ed.), *Ecologia de Reservatórios: Estrutura, Função e Aspectos Sociais*. FAPESP, FUNABIO. p. 109-148.

CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A.; JATI, S. (2002). Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP – Brazil). *Journal Plankton Research*. Vol. 24, nº7. p. 617-634.

CÂMARA, V. de M. (2002). *Textos de epidemiologia para vigilância ambiental em saúde: Fundação Nacional de Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde. 132 p.

CARLILE, P.R. (1994). Further studies to investigate microcystin-LR and anatoxin-a removal from water. april. Report nº FR0458. Disponível em: <http://www.fwr.org/waterq/fr458.htm>. Acesso em 12 dez. 2004.

CARMICHAEL, W.W. (1981). Freshwater Blue-green Algae (Cyanobacteria) Toxins – A Review. *The Water Environment Algal Toxins and Health*. Edited by Wayne W. Carmichael. Wright State University. Dayton, Ohio. Plenum. New York and London. p.1-13

_____. (1989). Freshwater cyanobacteria toxins, in natural toxins: characterization, pharmacology and therapeutics. *Proceedings of the 9th World Congress on Animal Plant and Microbiol Toxins*, Stillwater, Oklahoma. Ownby C. L., Odell G. V. (eds). Oxford: Pergamon Press. p:3-16.

_____. (1991). Blue-Green Algae: An Overlooked Health Threat. *In Health & Environment Digest. Freshwater Foundation*. July, 1991. v.5, n.6. p.1-4.

_____. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, n.72, p.445-459.

_____. (1994a). An overview of toxic cyanobacterial research in the United States. *In Proc. of Toxic Cyanobacteria – A Global Perspective*, Adelaide, South Australia Centre for Water Quality Research.

_____. (1994b). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. v.1, n.270, p.78-86.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELLOF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.I.; KRISHNAMURTHY, T. YU, M.J. MOORE, R.E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O.M.; WATANABA, M. (1988a). Naming. of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, v. 26., p. 971-973.

CARMICHAEL, W.W.; ESCHEDOR, J.T.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E. (1988b). Toxicity and partial structure of hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens Emend. L575 from New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.54, p. 2257-2263.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L. G. (2001). *Desenvolvimento de Métodos para HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. Série Apontamentos. São Carlos: EdUFSCAR. 77p.

CAVALIERE, M.J.; CALORE, E.E.; PEREZ, N.M.; PUGA, F.R. (1996). Miotoxicidade por organofosforados. *Rev. Saúde Pública*, 30 (3): 267-272.

CASTELO BRANCO, C.W. (1991). *A comunidade planctônica e a qualidade da água no Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil*. Mestrado. Brasília (DF). Universidade de Brasília. 340 p.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. (2000). *Análise instrumental*. Editora Interciência. Rio de Janeiro. 606p.

CIOLA, R. (1998). *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)*. 1ª edição. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo. 179 p.

COLLINS, C.H. e BRAGA, G.L. (1987). *Introdução a métodos cromatográficos*. Editora UNICAMP. (Série Manuais). Campinas. 298 p.

CUNHA, A.M.; FONSECA, O. (1918). O Microplancton das Costas Meridionaes do Brazil. *Rev. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Brasil. n. 10, p 99-103.

CURTIS, H. (1977). *Biologia* 2.ed. Editora Guanabara Koogan S.A.. Rio de Janeiro, RJ Tradução Heni Sauaia. p 964

DE SÁ, O.R. (1994). *O Peixe como Bio-Indicador da Contaminação Ambiental: Avaliação da Toxicidade de Agrotóxicos*. Dissertação, USP-EESC-São Carlos.187p.

DEBERDT, G.L.B. (2002). *Estudo de cianobactérias em reservatório com elevado grau de trofia (reservatório de Salto Grande – Americana – SP)*. Tese (Doutorado).Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil,p. 207, 2002.

DEVLIN, J.P.; EDWARDS, O.E.; GORHAM, P.R.; HUNTER, N.R.; PIKE, R.K.; STAVRIC, B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h¹. *Can. J. Chem.* 55:1367-1371.

DOMINGOS, P. e HUSZAR, V.L. de M. (1993). *Efeitos imediatos em um evento de mortandade maciça de peixes sobre a comunidade fitoplanctônica dominada por CYANOPHYCEAE em uma lagoa costeira, (RJ)*. VI Reunião Brasileira de Ficologia. Brasil: Tramandaí/Imbé, RS. V.1, 1p.

DRUM, R.W.; HOPKINS, J.T. (1965). Diatom locomotion: an explanation. *Protoplasma*. v.62. nº1.p.1-33.

FAINTUCH, B.L. (1989). *Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas*. Dissertaçãp. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. USP. São Paulo. 192p.

FARIA, J. de G. (1914). *Um ensaio sobre o plankton, seguido de observações sobre ocorrência de plankton monótono, causando mortandade na Bahia do Rio de Janeiro*. Trabalho apresentado a Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, para obtenção do título de docente livre. Rio de Janeiro. 48 p.

FERRÃO-FILHO, A.S.; DOMINGOS, P. e AZEVEDO, S.M.F.O. (1998). *Efeitos tóxicos de amostras naturais de Microcystis aeruginosa (Cyanophyceae) sobre o crescimento e a reprodução de Cládoceros da Lagoa de Jacarepaguá (RJ)*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 64.

FERREIRA, A.B. de H. (1997). *Novo Dicionário da Língua Portuguesa*. 2ª ed.. 44ª impressão. Editora Nova Fronteira. Rio de Janeiro.

FIORINI, M.P. (2004). *Mudanças Temporais da Comunidade Fitoplanctônica e das Condições Ecológicas do Efluente Final da ETE do Município de Catajái, SP*. Dissertação. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos: São Carlos. 93 p.

FREITAS, J.C. (1998). *Observações sobre neurotoxinas paralisantes detectadas em organismos marinhos do Litoral de São Paulo*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 24.

FULTON, R.; PAERL, H.W. (1987a). Effects of Colonial Morphology on Zooplankton Utilization of Algal Resources During Blue-Green Algal (*Microcystis aeruginosa*) Blooms. *Limnol. Oceanogr.*, v.32, n.3, p 634-644.

GANF, G.G.; WALSBY, A.E. (1989). Optical properties of gas-vacuolate cells and colonies of *Microcystis* in relation to light attenuation in turbid, stratified reservoir (Mout Bold Reservoir, South Australia). *Aust J Mar Freshwater Res*, n.40, p.595-611.

GARCIA, V.M.T. (1997). *Harmful algae problems in Brazil*. Apresentado na IV Sessão do IOC-International on Harmful Algal Blooms, Vigo, 30/06-02/07/1997. 3p.

GARCIA, V.M.T.; ODEBRECHT, C.; RÖRIG, L.R. (1995). Florações Nocivas de Fitoplâncton na Costa Brasileira. *IOC Workshop Report*. Nº101. AnexoIII. P.9-14.

GIANI, A.; FIGUEREDO, C.C; ETEROVICK, P.C. (1999). Algas planctônicas do reservatório da Pampulha (MG): Euglenophyta, Crysophyta, Pyrrophyta, Cyanobacteria. *Rev. Brasileira de Botânica*. v. 22, nº 2. São Paulo. 22 p.

GIANESELLA-GALVÃO, S.M.F; COSTA, M.P. de F.; KUTNER, M.B.B. (1995). Bloom of *Oscillatoria (Trichodesmium) erythraea* (Ehr) Kutz in coastal waters of Southwest Atlantic. *Inst. Oceanogr.* São Paulo. 11. p 133-140.

GRANADO, D.C. (2004). *Variações Nictemerais e Sazonais na Estrutura da Comunidade Fitoplanctônica num Sistema de Lagoas de Estabilização (Novo Horizonte, SP)*. Dissertação. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos. 130 p.

GUZMAN, N.A. (1993). *Capillary Electrophoresis Technology*. *Chromatographic Science Series* vol. 64. Marcel Dekker, Inc. United States of Ameica. 857p.

HAWKINS, P.; LAMBERT, W. (1989). The Effect of *Daphnia* Body Size on Filtering Rate Inhibition in the Presence of a Filamentous Cyanobacterium. *Limnol. Oceanogr.*, v.34, n. 6, p. 1084-1089

HERRICKS, E.E.; MILNE, I.; JOHNSON, I. (1994). Selecting Biological Test Systems to Asses Time Scale Toxicity. *Water Environment Research Foundation-* project 92-BAR-1.p.4-3.

HIROOKA, E.Y.; PINOTTI, M.H.P.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. (1999). Survey of Microcystins in Water Between 1995-1996 in Paraná, Brazil Using Elisa. *Natural Toxins*. 7. p. 103-109.

HOUAISS, A. (2001). *Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*. Rio de Janeiro, Objetiva Editora.

HRUDEY, S.; BURCH, M.; DRIKAS, M.; GREGORY, R. (1999). Remedial Measures. In: Chorus, I. & Bartram (ed.) – *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. World Health Organization, London and New York, p. 275-312.

HUSZAR, V.L. de M.; GIANI, A. (2004) - *Amostragem da comunidade fitoplanctônica em águas continentais: reconhecimento de padrões espaciais e temporais*. In: Bicudo, C. E. de M. & Bicudo, D. de C. (eds) - *Amostragem em Limnologia*. Rima Editora, São Carlos, SP: 133 -148.

IBELINGS, B.W.; MUR, L.R. (1992). Microprofiles of photosynthesis and oxygen concentration in *Microcystis* sp scums. *FEMS Microb Ecol*, n.86, p.195-203.

JARDIM, F.A. (2000). Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento COPASA-MG. Dissertação. Belo Horizonte: MG.

JOLY, A.B. (2002). *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13ª ed. São Paulo. Companhia Editorial Nacional. 777p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (2000). *Biologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A. 339p.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (2000). *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*. Editora Guanabara Koogan S. A. 591p.

KELETI, G.; SYKORA, J.L.; MAIOLIE, L.A.; DOERFLER, D.L.; CAMPBELL, I.M. (1981). Isolation and Characterization of Endotoxin from Cyanobacteria (Blue-Green Algae). *The Water Environment Algal Toxins and Health*. Edited by Wayne W. Carmichael. Wright State University. Dayton, Ohio. Plenum Press. New York and London. p. 447-464.

KIRVIRANTA, J.; SIVONEN, K.; LATHI, K.; LUUKKAINEN, R.; HELSINKI, S.I.N. (1991). Production and biodegradation of cyanobacterial toxins – a laboratory study. *Arch Hydrobiol.* 121 (3). p. 281-294.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (1999). Cyanoprokaryota, 1: Chroococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (ed.). *Das phytoplankton des Süßwasser: Systematik und Biologie, Band 7*. Schwarzerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1044 p.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERARD, J. (1999). *Human Health Aspects* em CHORUS, I. & BARTRAM, J. (editores). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their Public Health – Consequences, Monitoring and Management*. Londres: E. & F.N. Spon. p.113-141.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, M.F. O.; OSHIMA, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cyellindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*: 37. p.1359-1373.

LANNA, A.C. (2002). Impacto ambiental de tecnologias, indicadores de sustentabilidade e metodologias de aferição: uma revisão. *Embrapa Arroz e Feijão*. Santo Antônio de Goiás, GO. Documento 144. 1ª edição. p 22.

LARCHER, W. (2000). *Ecofisiologia Vegetal*. Tradução: Carlos Henrique B.A. Prado. São Carlos, Rima. 531 p.

LARINI, L. (1993). *Toxicologia*. Editora Manole. São Paulo. 2ªed. 281p.

LAWTON, L.A.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. (1994). Extraction high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystis in raw and treated waters. *Analyst*. 119. p.1525-1530.

LEME, I.L.; SILVA, V.G. (2002). Recomendações para a garantia da qualidade da água tratada para uso em unidades de hemodiálise. Disponível em: www.abcdt.org.br/docs/RevistaABCDT .(Revista da Associação Brasileira de Centros de Diálise e Transplantes) Brasília-DF. 16p. Acesso 11 nov. 2003.

LOMBARDO, M.; ROSITO, F.M.; CARVALHO, L.R.; KIYOTO, S. (2003). *Otimização de Protocolos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a Análise e Purificação de Proteínas e Toxinas Peptídicas Extraídas de Materiais Vegetais e de Algas Cianofíceas*. 16ª Reunião Anual do Instituto Biológico-RAIB. Arquivos do Instituto Biológico vol.70, suplemento 3. 5p.

LORENZEN, C.J. (1967). Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12: 343.

LORENZI, A.S. (2004). *Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas de Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil*. Dissertação (mestrado) Centro de Energia Nuclear na Agricultura.(CENA). Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba-São Paulo. 92p.

LUND, J.W.G.; KIPLING, C.; LECREN, E.D. (1958). The invert microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* (11):143-170.

MACKINTOSH, C.; MACKINTOSH, R.W. (1994). The inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and extremely sensitive and rapid bioassay for toxin detection em CODD *et al.* (editors). *In Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. The Royal Society of Chemistry. p.90-99.

MAGALHÃES, E.M.M.; LIRA, M.C.A.; PORFIRIO, Z.; CAVALCANTI, M.O. (1998). *Cianobactérias do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú/Manguaba-AL-Brasil*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 65.

MAGALHÃES, V.F.; OLIVEIRA, A.C., MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (1999). Bioacumulação de Microcistinas (Hepatotoxinas de cianobactérias) em pescado da Baía de Sepetiba (RJ). VII Reunião de Ficologia, Porto de Galinhas, PE, 166p

MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077-1085.

MAHAMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. (1987). Anatoxin-a(S), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos aquae* NRC-525-17. *Toxicon*. 25(11), 1221-1227 p.

MAHAMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. (1986). Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24:175-186.

MARGALEF, R. (1983). *Limnologia*. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.

MARKER, A.F.H.; NUSH, E.A.; RAI, H.; RIEMANN, B. (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch Hydrobiol. Beith. Ergebn. Limnol.*, 14:91-106.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; HINO, K.O; ROCHA, O. (1986). Características limnológicas da Lagoa do Taquaral (Campinas, SP) – um ambiente hipereutrófico. *Ciência e Cultura*. 38 (3): 420-425 p.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; NIEMSZURA, W.P. (1989). Anatoxin-a(S), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8021-8023 p.

MATSUZAKI, M.; MUCCI, J.L.N.; ROCHA, A.A. (2004). Comunidade fitoplanctônica de um pesqueiro na cidade de São Paulo. São Paulo. *Rev. Saúde Pública*, v. 38, n. 5., 12p.

MATTHIENSEN, A; YUNES, J.S.; CODD, G.A. (1999). Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Rev. Brasil Biol* 59 (3): 361-376.

MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K.A.; YUNES, J.S.; KAYA, K.; CODD, G.A. (2000). [D-Leu¹] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry*. 55. p. 383-387.

MINILLO, A.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; CUNHA, N.T.; YUNES, J.S. (2003). *Presença de Cianotoxinas e Toxicidade de Florações de Cianobactérias em Represas do Médio e Baixo Rio Tiête (SP)*. IX Congresso Brasileiro de Limnologia. Água – Rompendo fronteiras entre Ciência, Educação e Cidadania. Juiz de Fora 20-25/06/2003 .1 p.

MINILLO, A.; FERREIRA, A.H.F.; YOGUI, G.T.; YUNES, J.S. (2000). *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*. São Carlos, RiMa. Editores: ESPÍNDOLA, E.L.G.; BOTTA, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.,C; OLIVEIRA-NETO, A.L.de. p.521-536.

MOED, J.R. e HALLEGRAEFF, G.M. (1978). Some problems in the estimation of chlorophyll-a and phaeopigments from pre- and postacidification spectrophotometric measurements. *Int. Revue. Ges. Hydrobiol.*, 63 (6): 787-800.

MOLICA, R.J.R.; NASCIMENTO, S.M.; BOUVY, M.; SILVA, N.R.R. (1998). *Florações Neurotóxicas de *Cylindrospermopsis* em Reservatório de Abastecimento do Estado de Pernambuco*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil.

Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 66.

MONTEIRO, N.J.C; BOHRER, M.B. C. e YUNES, J.S. (1998). *Avaliação preliminar da toxicidade de cianobactérias da Lagoa dos Patos em testes com Daphnia similis*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 66.

MOURA, A.T.do N. (1996). *Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica numa lagoa eutrófica, São Paulo, SP, Brasil, a curtos intervalos de tempo: Comparação entre épocas de chuva e seca*. Dissertação. Instituto de Bioeciências. Campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista-UNESP. Rio Claro. 172p.

NASCIMENTO, S.M.; MOLICA, R.J.R.; FARIA, T.C.F F.; SILVA, L.H.S. (1998). *O estudo das cianobactérias tóxicas no Açude Tabocas, Caruaru- Pernambuco*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 66.

NECCHI-JUNIOR, O.; BRANCO, L. H. Z.;BRANCO, C. C. Z. (2003). Ecological distribution of stream macroalgal communities from a drainage basin in the Serra da Canastra National Park, Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.*, vol.63, no.4, p.635-646.

NEDERLANDSE NORM. (1981). NEN 6520. *Nederlands*.

NEWCOMBE, G.; COOK, D.; BROOKE, S.H.O.L.; SLYMAN, N. (2003). Treatment options for microcystin toxins: similarities and differences between variants. *Environmental Technology*. v. 24. n. 3. 28p.

NICHOLSON, B.C.; BURCH, M.D. (2001). *Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines*. Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment- National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia. 37p.

NOBRE, M.M.Z. de A. (1997). *Deteção de Toxinas (Microcistinas) Produzidas por Cianobactérias (Algas Azuis) em Represas para Abastecimento Público, pelo Método de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) e Identificação Química*. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. São Paulo. p154.

NOGUEIRA, I de S. e LEANDRO-RODRIGUES, N.C. (1999). Algas Planctônicas de um Lago Artificial do Jardim Botânico Chico Mendes, Goiânia, Goiás: Florística e Algumas Considerações Ecológicas. *Revista Brasileira de Biologia*. v. 59. nº3. São Carlos. 27p.

NORMAS TÉCNICAS CETESB L5.303. (1991). *Determinação de Fitoplâncton de Água Doce Método Qualitativo e Quantitativo. Método de Ensaio*. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. CETESB. – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 23p.

NORMAS TÉCNICAS CETESB L5.025. (1993). *Água – Teste para Avaliação da Toxicidade Aguda de Cianofíceas (Algas Azuis)*. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 12p.

NUSH, E.A. (1980). Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beach. Stuttgart*, 14:14-36.

NUSH, E.A.; PALME, G. (1975). Biologische methoden für die praxis der gewässeruntersuchung, *Gwf-Wasser/Abwasser.*, 116: 562-565.

ODEBRECHT, C.; AZEVEDO, S.M.F.O.; GARCIA, V.M.T.; HUSZAR, V.L.M.; MAGALHÃES, V.E.; MENEZES, M.; PROENÇA, L.A.O.; RÖRIG, L.R.; TENENBAUM, D.R.; VILLAC, M.C.; YUNES, J.S. (2002). Floraciones de Microalgas Nocivas en Brasil: Estado Del Arte Y Proyectos en Curso. *Instituto Español de Oceanografía*. 14p.

OLIVEIRA, M.C. (1998). *O uso de marcadores moleculares no estudo de biodiversidade*. Congresso Latino-Americano de Ficologia. Anais IV Congresso Latino-Americano de Ficologia. São Paulo: Sociedade Ficologia da América Latina e Caribe. v.1. p. 179-186.

OLIVEIRA, A.C.P.; SOARES, R.M.; COSTA, S.M. e AZEVEDO, S.M.F.O (1998). *Ocorrência de cianotoxinas em reservatórios de abastecimento público do Brasil*. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 67.

PADISÁK, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynnska) Seenayya et Subba Raju na expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide dsitribution and review of its ecology. *Arch für Hydrobiology* 107: 563-593 p.

PÁDUA, H.B. (2002). Cianotoxinas e outras intrigantes ocorrências em criações de organismos aquáticos. *Artigo 23ª Procuradoria de Justiça Criminal de Goiás. Caderno Doutrina Ambiental*. p 17.

PAERL, H.W. (1988a). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnol. Oceanogr.* 33. p. 823-847.

_____ (1988b). *Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria)*. In: Sandgren CD (ed). *Growth and reproductive strategies of freshwater Phytopankton*. pp261-315. Cambridge University Press, Cambridge UK.

PAERL, H.W.; USIACH, J.F. (1982). Blue-green algal scums: an explanation for their occurrence during freshwater blooms. *Limnol Oceanogr* n.27, p.212-217.

PAERL, H.W.; FULTON, R.S.; MOISNDER, P.H.; DYBLE, J. (2001). Harmfull freswater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World*. n.1. p. 76-113.

PARRA, O.O., GONZALEZ, M., DELLAROSA, V., RIVERA, P., ORELLANA, M. (1982). *Manual Taxonomico del Fitoplâncton de Aguas Continentais.*: Universidad de Concepción.70p.

PELCZAR Jr., J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. (1996). *Microbiologia: conceitos e aplicações*, volume I, 2^a ed. P 524

PEREIRA, G.P. de C.; PEQUITO, M.M. de A; COSTA; P.C.R. (1998). *O impacto do incremento das cianobactérias como indicador de toxicidade*. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9899/g005.htm>. Acesso 22 nov. 2004.

PETTERSON, A; HALLBON, L.; BERGMAN, B. (1993). Aluminum effects on uptake and metabolism of phosphorus by cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Plant Physiol*. 86:112-116.

PINHO, G.L.L.; MOURA DA ROSA, C.; YUNES, J.S.; LUQUET, C.M.; BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J.M. (2003). Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135. p 459-468.

PINTO-COLEHO, M.R.; CASTELLANOS-SOLA, M.E. (2003). *Impacto humano no reservatório de São Simão – II: Efeito de fontes difusas (atividade agrícola) no aporte de N e P nas sub-bacias de captação*. Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Ecol. Cons. e Manejo da Vida Silvestre. Belo Horizonte-Minas Gerais. 1p.

PORTER, K.G. (1973). Selective Grazing and Differential Digestion of Algae by Zooplâncton. *Nature*, v. 244, p. 179-180.

PROENÇA, L.A. (2000). Avaliação do Impacto de florações Nocivas no Brasil. IV Encontro do Grupo de Trabalho Regional sobre Florações de Algas Nocivas na América do Sul – (IOC-FANSA). Rio Grande – RS. 6p.

PROENÇA, L.A.O; CUNHA, N.T.; YUNES, J.S. (2002). *Análise da Cianotoxina Cilindrospermopsina em Amostras de Reservatórios*. Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, 28/04/-01/05/2002. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC. 3p.

PROENÇA, L.A de O.; VILLAC, M.C. (2003). Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones de Algas Nocivas em Sundamérica. FANSA/COI/UNESCO. Informe Nacional Brasil. Guayaquil, Ecuador.14p.

RAMÍREZ, J.J.; BICUDO, C.E.M. (2002). Variation Of Climatic And Physical Co-Determinants Of Phytoplankton Community In Four Nictemeral Sampling Days In A Shallow Tropical Reservoir, Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. São Carlos. vol.62, nº1, 20 p.

RAVEN, P.H.; VERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (2001). *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan. 6ª edição. 906p.

REYNOLDS, C.S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge studies in ecology. Cambridge University Press. London, p 384.

REYNOLDS, C.S.; WALSBY A.E. (1975). Cyanobacterial Water Blooms. *Biolog. Rev.* n.50, p.437-481.

REYNOLDS, C.S.; JAWOSKI, G.H.M.; CMIECH, H.A.; LEEDALE, G.F. (1981). *On the annual cycle of the blue-green alga Microcystis aeruginosa*. Kütz Emend Elenkin. *Phil Trans R Soc Lond B* 293: 419-477.

RIBEIRO, M.A.G.; KUBO, E.; MAINARDES-PINTO, C.S.R. (1997). Efeito do adubo orgânico e da dosagem do fertilizante químico no aumento do fitoplâncton e do zooplâncton. *B. Inst. Pesca.* n.24. p. 57-64.

ROCHA, O.; DUNCAN, A (1985). The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *J. Plank. Res.*, v.7, n.2, p. 279-294.

RÖRIG, L.R.; YUNES, J.S.; KUROSHIMA, K.N.; SCHETTINI, A.F.; PEZZUTO, P.R.; PROENÇA, L.A.O. (1998). *Studies on the ecology and toxicity of Trichodesmium spp. Blooms Southern Brazilian Coastal waters.* Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco. 4p.

ROSET, J.; AGUAYO, S.; MUÑOZ, M.J. (2001). Detección de cianobacterias y toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicología.* 18: 65-71.

SALOMON, P.S.; YUNES, J.S.; PARISE, M.; COUSIN, J.C.B. (1996). Toxicidade de um extrato de *Microcystis aeruginosa* da Lagoa dos Patos sobre camundongos e suas alterações hepáticas. *Vitalle*, Rio Grande, n. 8, p. 23-32.

SALOMON, P.S.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A. e CODD, G.A. (1998). *Efeito da salinidade sobre Microcystis aeruginosa (Cyanobacteria).* Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 69.

SALOMON, P.S.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A; CODD, G.A. (2001). Does salinity affect the toxin content of an estuarine strain of *Microcystis aeruginosa*. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn the Millennium.* p.537-548.

SANDES, M.A.L. (1998). *Estudos ecológicos em florescimento de Microcystis (Cyanobacteria-Cyanophyceae) e interações com a flora bacteriana na represa de Barra Bonita-Médio Tietê/SP*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 242p.

SANT'ANNA, C.L.; SORMUS, L.; TUCCI, A.; AZEVEDO, M.T. de P. (1997). Variação sazonal do fitoplâncton no Lago das Garças, São Paulo, SP. *Hoehnea* v.24, n.1, p. 67-86.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T. de P.; SENNA, P.A.C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. (2004). Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasil. Biol.*, vol. 27, nº2, p. 213-227.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. (2000). Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.36, nº1, jan./jun. p.97-110

SANTOS, K.R. de S.; SAKOMOTO, A.Y.; NETO, M.J.; BARBEIRO, L.; QUEROZ NETO, J.P. de. (2004). Ficoflora do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: um levantamento preliminar em três lagoas salinas e uma salitrada. *IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. Corumbá/MS. SIMPAN. 7p.

SCHULZE, E.; SCHUBERT, L.B.; CABALLI, V.; PACHECO, M.R. (2003). Reconhecimento de algas e contagem de células e cianofíceas nos mananciais que abastecem as Etas do SAMAE de Blumenau. *SAMAE- Blumenau-SC*. 27p.

SHAPIRO, J. (1990). Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Verh Int Verein Limmol*, n.24, p.38-54.

SIVONEN, K.; JONES, G. (1999). *Cyanobacterial toxins* em CHORUS, I. & BARTRAM, J. (editores). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their Public Health – Consequences, Monitoring and Management*. Londres: E. & F.N. Spon. p. 42-111.

SMITH, G.M., 1955. *Botânica Criptogâmica: Algas e Fungo*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 527 pp.

SOARES, J.J. (1981). *Estudos sobre biomassa e produtividade do perifiton em macrófitas na Represa do Lobo, São Carlos – SP*. Tese. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 223 p.

SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. (1999). *Acúmulo, depuração e efeitos de microcistinas (hepatotoxinas) de Microcystis aeruginosa em Tilapia rendalli*. VII Reunião Brasileira de Ficologia. Brasil: Porto de Galinhas, PE. p.165.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. (1998). 20th ed. Washington: American Public Health Association.

STEINBERG, C.E.W; HARTMANN, H.M. (1988). Planktonic bloom-forming cyanobacteria and eutrophication of lakes and rivers. *Freshwater Biol*, n.20, p.279-287.

STEVENS, D.K.; KRIEGER, R.I. (1991). Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-a. *Toxicon*, 29, 167-179 p.

SZE, P. (1993). Prokaryotic Algae (Cyanophyta, Prochlorophyta). *In A Biology of the Algae*, 2 ed. Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers. 259 p.

TALAMONI, J.L.B. (1995). *Estudo Comparativo das Comunidades Planctônicas de Lagos de Diferentes Graus de Trofia e uma Análise do Efeito de Microscystis aeruginosa (Cyanophyceae) Sobre Algumas Espécies de Microscutáceos*. Tese de Doutorado-Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR.305p.

TAVARES, M.F.M. (1997). Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Revista Química Nova*, 20 (5). p 493-511

TORGAN, L.C. (1989). Florações de algas, composição, causas e conseqüências. Florianópolis. *Insula* (19): 15-34.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F.; CANDEIAS, J.A.N.; GOMPERTZ, O.F. (1999). *Microbiologia*. 3.ed. Saõ Paulo: Editora Atheneu.

TRAIN, S. (1998). *Flutuações temporais da comunidade fitoplanctônica do sub-sistema Rio Baía- Lagoa do Guaraná, planície de inundação do Alto Paraná* (Bataiporã, Mato Grosso do Sul). Tese Doutorado- Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos.189 p.

TRAIN, S.; RODRIGUES, L.C.; BORGES, P.A.F.; ZANDONADI, A.P.; PIVATO, B.M.; BOVO, V.M.; UYEDA, A.T.; NACAGAVA, M.M. (2001a). Fitoplâncton. 11p. Disponível em: <http://www.peld.uem.br/relat2001/PDF>. Acesso em 05 set. 2003.

TRAIN, S.; RODRIGUES, L.C.; BOVO, V.M.; BORGES, P.A.F.; PIVATO, B.M. (2001b). *Composição e Biomassa Fitoplanctônica em Ambientes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná*. Nupélia, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná. 4p.

TREVISAN, M.T. e MACEDO, F.V.V. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterse para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*. Vol. 26, nº3. p.301-304.

TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M.F.; SUZUKI, M.E HARADA, K-I. (1993). Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environmental Science and Tecnology*, 28. p.173-177.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. (2003). *Cilindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. vol. 26. nº1. 16p.

UHELINGER, V., (1964). Étude statistique des methodes de dénombrement planctonique. *Arch. Sci.*, 17(2): 121-223.

UTERMÖHL, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 9:1-38.

VENTURA, C.; LAGOS, P.; FERANDES, L.F.; GOBBI, E.F.; GOBBI, M.F.; RECKSIDER, R.; CARNEIRO, C. (2003). *Distribuição horizontal das cianobactérias no Reservatório do Irai, Pinhais, Paraná*. IX Congresso Brasileiro de Limnologia. Juiz de Fora, 20-25/07/2003. 1p.

VITOLA, C.R.R.; YUNES, J.S.; FARIA, S.M.S.de; MARQUES, G. de S.; PIERIN, C.E. (2003). *Estudo da migração vertical diária das Cianobctérias na represa do Irai. E a avaliação das Cianotoxinas*. IV Seminário do Projeto Interdisciplinar sobre Eutrofização de Água de Abastecimento Público na Bacia do Altíssimo Iguaçu, Curitiba-PR, 18 e 19/10/03. 4 p.

WALSBY, A.E.; REYNOLDS, C.S.; OLIVER, R. KROMCAMP, J.C. (1989). The role of gas vacuoles and carbohydrate content in the buoyancy and vertical distribution of *Anabaena minutissima* in Lake Rotongaio. New Zeland. *Arch. Hidrobiol.* 32. p.1-25.

WALSBY, A.E. (1994). Gas vesicles. *Microbiol Ver*, n.58, p. 94-144.

WEBER, C.I. (1973). *Biological field and laboratory methods for measuring the quality of surface waters and effluents*. EPA-670/4-73-001. National Environmental Research Center, Office of Research & Development, U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.

WETZEL, R.G. (1993). *Limnologia*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. p.919.

WETZEL, R.G.; LIKENS, G.E. (1991). *Limnology analyses*. 2nd. Ed. Springer Verlag.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. (2000). *The Ecology Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers (ed).

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. (1995). *Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide*. American Water Works Association - Research Foundation, U.S.A. 229p.

YUNES, J.S.; SUZUKI, M.T. SILVERA, A.G.; CAMARGO, M. WERNER, V.R. (1990). Cianobactérias fixadoras de nitrogênio do estuário da Lagoa dos patos, RS: *Nostoc. Muscorum*. *Ciência e Cultura* (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 42 (5/6): p. 375-383.

YUNES, J.S.; SILVERA, A.G.; SUZUKI, M.T.; CAMARGO, M.G.; WERNER, V.R. (1994). Diazotrophic growth and nitrogenase activity of cyanobacteria from the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *VITTALLE*, Rio Grande, 6: 25-36.

YUNES, J. S.; SALOMON, P.S.; MATTHIENSEN, K.A.; BEATTIE, S.; RAGGETT, S.L.; CODD, G.A. (1996). Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. 5. p. 223-229.

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

YUNES, J.S.; CUNHA, N.T.; BARROS, L.P.; PROENÇA, L.A. O.; MONSERRAT, J.M. (2003). Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. *Comments on Toxicology*, 9: 103-115. Taylor & Francis.

YUNES, J. S; MATTHIENSEN, A.; CARNEIRO, C.; OROSKI, F.; BECKER, V.; CARVALHO, M do C. (2004). *Florações de Cianobactérias Tóxicas: mãos à obra no problema*. Anais do IX Congresso Brasileiro de Limnologia. 19p.

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A. (1997). Manual de orientação em casos de florações de algas tóxicas: um problema ambiental e de saúde pública. São Paulo. *Série Manuais*, 14- Cetesb. 20p.

ZAGATTO, P.A, ARAGÃO, M.A., DOMINGUES, D.F., BUATINI, S.V.; ARAÚJO, R.P.A.(1998a) *Avaliação ecotoxicológica do reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase à problemática das algas tóxicas e algicidas* Congresso Latino-americano de Ficologia. Anais do IV Congresso Latino-americano de Ficologia. São Paulo: Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe.v.1. Exata Editoração. 63-81p.

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A.; BURATINI, S.V.; DOMINGUES, D.F.; LAGOS, N.; AZEVEDO, S.M. F.O. (1998b). *Toxicidade e identificação das toxinas de três cepas da alga *Cylindrospermopsis raciborskii**. Resumo. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí. Santa Catarina. 5º ECOTOX – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. 1º COBAN- Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. p 71

ZAGATTO, P.A. (2001). Toxinas de algas: Riscos à Saúde Pública. *Revista Gerenciamento Ambiental*. V.3 nº17. Nov/Dez.São Paulo. 4p.