

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA AMBIENTAL**

Marília Campos Moser

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO
MANANCIAL DA LAGOA DO PERI: TESTES
GENOTÓXICOS, CITOTÓXICOS
E MUTAGÊNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto.

Co-Orientador: Prof^o Dr. William Gerson Matias.

FLORIANÓPOLIS
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

MOSER, Marília Campos

Avaliação ecotoxicológica do Manancial da Lagoa do Peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos - 125p.

Lagoa do Peri, *Cylindrospermopsis raciborskii* , Genotoxicidade

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – Florianópolis – SC – Fevereiro, 2011.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MOSER, Marília C. Avaliação ecotoxicológica do Manancial da Lagoa do Peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos. 2011. 125 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MARÍLIA CAMPOS MOSER

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO
MANANCIAL DA LAGOA DO PERI: TESTES
GENOTÓXICOS, CITOTÓXICOS
E MUTAGÊNICOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Ambiental”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 18 de Fevereiro de 2011.

Prof^o. Flávio Rubens Lapolli, Dr.
(Membro da banca)

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Cátia Regina S. C. Pinto
(Orientadora)

Prof^o. Dr. William Gerson
Matias
(Co-Orientador)

Prof^o. Dr. Flávio R.Lapolli
(Membro da banca)

Prof^o. Ramon Lucas Dalsasso
(Membro da banca)

Prof^a. Dra. Therezinha Maria
Novais de Oliveira
(Membro da banca)

AGRADECIMENTOS

O Deus: pela vida, pela força, pela virtude da fé e da esperança.

À Professora Cátia R. S. de Carvalho Pinto e ao Professor William G. Matias pelos momentos dedicados à orientação não só deste trabalho, mas de diversas atividades desenvolvidas ao longo de sete anos de orientação científica no LABTOX. Pela boa vontade, pelo constante incentivo e confiança depositada, por todas as oportunidades concedidas, pela amizade e convívio. Obrigada por abrir as portas da ciência para mim e assim me permitir realizar um sonho.

A toda equipe do Laboratório de Toxicologia Ambiental da UFSC – LABTOX, sejam estes colaboradores atuais ou antigos, bolsistas de iniciação científica ou pesquisadores dos mais diversos níveis de pós-graduação. Agradeço pela oportunidade de acompanhar suas pesquisas, pelos ensinamentos transmitidos, pela ajuda recebida e pela companhia durante a realização dos trabalhos. Cada um teve uma contribuição muito importante na minha formação acadêmica e pessoal.

À equipe do Laboratório Integrado de Meio Ambiente da UFSC – LIMA e aos colegas dos demais laboratórios de pesquisa da UFSC, por todo suporte, auxílio e agradável convívio. Em especial à colega Lucila do Laboratório de Potabilização das águas da UFSC pelo companheirismo no estudo da *Cylindrospermopsis*.

Ao Laboratório de Biologia Vegetal na pessoa da Professora Roselane, por proporcionar a oportunidade de conhecer melhor o “mundo das cianobactérias” aos professores e bolsistas do Laboratório de Protozoologia/MIP da UFSC.

À minha família, pelo amor, incentivo e paciência nestes anos de estudo e de pesquisa. Pelo apoio incondicional e por toda a ajuda. Sem vocês não teria chegado até aqui. Obrigada por tudo!

Ao Ezekiel, pela companhia carinhosa, pelo apoio e exemplo de determinação e dedicação.

Aos meus amigos, pelos bons momentos que passamos juntos e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao CNPQ pela bolsa concedida durante o período de pesquisa.

Aos membros da banca pela atenção e pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram no decorrer deste trabalho.

RESUMO

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água, é a capacidade destes microorganismos de produzirem e liberarem para o meio líquido toxinas (cianotoxinas) que podem afetar a saúde humana, sendo que a principal via de intoxicação se dá pelo consumo da água quando esta não recebe tratamento adequado para remoção destas toxinas. O manancial da Lagoa do Peri é utilizado para o abastecimento público de água potável no Sul e na costa Leste de Florianópolis, (Ilha de Santa Catarina). A predominância da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* tem sido registrada no local por diversos pesquisadores, sendo que esta espécie é uma potencial produtora de toxinas extremamente agressiva, a qual pode causar problemas de saúde pública e danos ao meio ambiente. Diante deste cenário, este trabalho realizou uma avaliação toxicológica da água da Lagoa do Peri através de testes ecotoxicológicos, citotóxicos e genotóxicos. As amostras testadas apresentaram toxicidade aguda para *Daphnia magna*, e causam efeitos genotóxicos induzindo a formação de micronúcleos em peixes e cultura celular, bem como a formação de cometas em peixes. Os resultados obtidos com este trabalho fornecem informações preliminares para orientar a exploração do manancial através de um programa de gerenciamento visando o monitoramento da qualidade da água no âmbito toxicológico, a remoção das algas e das cianotoxinas, fornecendo também subsídios para estudos futuros.

Palavras chave: Lagoa do Peri, *Cylindrospermopsis raciborskii*, Genotoxicidade .

ABSTRACT

The main concern with the increased occurrence of cyanobacterial blooms in the sources of water, is the ability of these microorganisms to produce and release toxins (cyanotoxins) that can affect human health considering the major route of intoxication is gives the consumption of water when it is not properly treated to the removal of these toxins. The Lagoa do Peri is used to public drinking water supplies in the south and the east coast of Florianopolis (Santa Catarina Island). The predominance of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* has been reported on site by several researchers, where this species is a potential toxin-producing extremely aggressive, which may cause public health problems and environmental damage. Therefore that research conducted a toxicological evaluation of water from Lagoa do Peri through ecotoxicological cytotoxic and genotoxic tests. The samples tested showed acute toxicity to *Daphnia magna*, and cause genotoxic effects by inducing the formation of micronuclei in fish and cell culture, as well as the formation of comets in fish. The results of this study provide preliminary information to guide the use of the lagoon and a management program aimed at monitoring water quality in toxicology, also providing subsidies for future studies.

Keywords: Lagoa do Peri, *Cylindrospermopsis raciborskii*, Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Localização geográfica do Parque Municipal da Lagoa do Peri: Brasil, Florianópolis e o Parque em destaque ...	31
Figura 4.2: Vista Panorâmica do parque Municipal da Lagoa do Peri.....	33
Figuras 4.3 e 4.4 : Filamentos de <i>C.raciborskii</i> com heterocito.	40
Figura 4.5: Filamento de <i>C.raciborskii</i> com heterocito e acineto	40
Figura 4.6: Estrutura geral das saxitoxinas.....	41
Figura 4.7: Estrutura da cilindrospermopsina	42
Figura 4.8: <i>C. raciborskii</i> encontrada na Lagoa do Peri	45
Figura 4.9: Teste do cometa	56
Figura 5.1: Localização geográfica do Parque Municipal da Lagoa do Peri.....	60
Figura 5.2: Localização do ponto de coleta das amostras	60
Figura 5.3 : Esquema geral dos ensaios realizados	62
Figura 5.4: <i>D. magna</i> cultivada pelo LABTOX	63
Figura 5.5: Esquema do teste de toxicidade aguda com <i>D.magna</i>	65
Figura 5.6: <i>Geophagus brasiliensis</i>	66
Figura 5.7: Aquários de intoxicação dos peixes	67
Figura 5.8: Preparação citológica	68
Figura 5.9: Cultura de células VERO	70
Figura 5.10 : Esquema do teste do MTT.....	73
Figura 6.1:Exemplar de <i>C. raciborskii</i> encontrada nas amostras da Lagoa do Peri	75
Figura 6.2: Cromatogramas sobrepostos do padrão da STX e da amostra de água da Lagoa do Peri sonicada	76
Figura 6.3: Perfil da densidade de fitoplâncton, cianobactérias e <i>C.raciborskii</i> na água bruta da Lagoa do Peri nos meses de fevereiro de 2005 a maio de 2008	77
Figura 6.4: a) célula com dois MN e b) célula binucleada com um MN.....	84
Figura 6.5: c) célula com um MN e d) célula três MN	84
Figura 6.6: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com peixes	85
Figura 6.7: Células VERO sem alterações	88
Figura 6.8: Micronúcleos e má formações apresentadas em	

células VERO	88
Figura 6.9: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com célula VERO	89
Figura 6.10: Número de células N2A e Vero micronucleadas induzidas por saxitoxina após 24h de exposição	90
Figura 6.11: Danos causados ao DNA - Ensaio Cometa com peixes	92
Figura 6.12: Danos ao DNA em (%) - Ensaio Cometa com peixes	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1: Resultado das análises quantitativas de <i>C.raciborskii</i>	76
Tabela 6.2: Valores de CE50.....	80
Tabela 6.3: Valores de CE50 encontrado na bibliografia.....	80
Tabela 6.4: Média dos comprimentos dos peixes utilizados no ensaio do Micronúcleo.....	84
Tabela 6.5: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com peixes.....	85
Tabela 6.6: Ocorrência de eritrócitos micronucleados (MN)....	86
Tabela 6.7: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com célula VERO.....	88
Tabela 6.8: Média dos comprimentos dos peixes utilizados no ensaio cometa.....	91
Tabela 6.9: Danos ao DNA -Ensaio Cometa com peixes	91
Tabela 6.10: Danos ao DNA em (%) - ensaio Cometa com peixes.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1: Grupos de cianotoxinas, tecido e/ou órgãos principalmente afetados e os principais gêneros de cianobactérias que as produzem	35
Quadro 4.2: Comparação entre as técnicas de micronúcleo e cometa.....	52
Quadro 5.1: Processamento das amostras utilizadas nos testes .	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CASAN - Companhia de Água e Saneamento
CE - Concentração Efetiva Mediana
Cel - Células
CO₂ – Gás carbônico
CSGMT- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ENS - Engenharia Sanitária e Ambiental
ETA - Estação de Tratamento de Água
FLORAM - Fundação Municipal do Meio Ambiente
Ind - Indivíduo
IOC - International Oceanographic Commission
ISO – International standard Organization
L - Litro
LABTOX - Laboratório de Toxicologia Ambiental
LIMA - Laboratório Integrado do Meio Ambiente
ml - Mililitro
MN – Micronúcleo
nm – Nanômetro
PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato)
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
SC – Santa Catarina
STX - Saxitoxinas
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UNESCO - Organização das Nações Unidas para a educação, a ciência e a cultura
µl – Microlitro

SUMARIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE QUADROS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
SUMÁRIO	12
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
4.1 Lagoa do Peri.....	31
4.2 Cianobactérias e Cianotoxinas.....	34
4.3 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	38
4.4 Cianobactérias em mananciais de água utilizados para abastecimento público.....	42
4.5 Estação de Tratamento de água da Lagoa do Peri.	44
4.6 Intoxicações causadas por Cianobactérias e suas implicações em Saúde Pública.....	46
4.7 Aspectos da Legislação.....	48
4.8 Toxicologia.....	49
4.9 Ecotoxicidade: Toxicidade aguda com <i>Daphnia</i> <i>magna</i>	51
4.10 Considerações sobre genotoxicidade.....	52
4.10.1 Teste de Mutagenicidade: Ensaio do Micronúcleo.....	53
4.10.2 Teste de Genotoxicidade: Ensaio do cometa	55
4.11 Considerações sobre Citotoxicidade.....	57
4.11.1 Teste do MTT.....	58
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
5.1 Coleta, preservação e processamento das amostras da Lagoa do Peri.....	59

5.2	Quantificação da Cianobactéria	
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	62
5.3.	Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	63
5.4	Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> ..	64
5.5	Manutenção e Intoxicação dos peixes.....	65
5.6	Teste de Mutagenicidade: Ensaio do	
	Micronúcleo utilizando peixes.....	67
5.7	Teste de Genotoxicidade: Ensaio do cometa	
	utilizando peixes.....	69
5.8	Cultura Celular.....	70
	5.8.1 Teste do Micronúcleo utilizando cultura celula	71
	5.8.2 Testes de Citotoxicidade: Teste do MTT.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
6.1	Análises Quantitativas e Qualitativas de	
	<i>C.raciborskii</i> na Lagoa do Peri.....	75
6.2	Teste com <i>Daphnia magna</i>	79
6.3	Teste do micronúcleo.....	83
	6.3.1 Teste do micronúcleo utilizando peixes.....	84
	6.3.2 Teste do micronúcleo utilizando células	87
6.4	Teste do cometa utilizando peixes.....	91
6.5	Ensaio de citotoxicidade: Teste do MTT.....	94
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8.	CONCLUSÃO.....	101
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

Apesar de uma maior consciência da necessidade de proteção dos habitats de água doce, os impactos decorrentes das atividades humanas continuam a prejudicar os ecossistemas. Este constitui um problema real para o fornecimento de água potável para as populações humanas, sendo que atualmente, além de poluentes químicos, os mananciais de abastecimento e a água doce em áreas de lazer também estão sujeitas à contaminação por cianobactérias tóxicas (DUVAL *et al.*).

O aumento das florações de cianobactérias tornou-se um problema mundial, tanto em ambientes aquáticos de água doce quanto em ambientes aquáticos marinhos. A grande proliferação desses organismos se dá, em grande parte, à eutrofização dos corpos d'água. Uma vez que certas espécies de cianobactérias são bem conhecidas nos processos de biossíntese de potentes hepatotoxinas e neurotoxinas, tais florações podem representar uma significativa ameaça para a saúde dos animais e dos seres humanos (SIVONEN e JONES, 1999).

Além da ação tóxica direta, estas toxinas podem se acumular na cadeia trófica, ocasionando diferentes sintomas de intoxicação e efeitos crônicos, muitas vezes difíceis de serem diagnosticados (CARMICHAEL, 1992). Desta forma, as toxinas produzidas por cianobactérias podem causar várias formas de intoxicações no homem, tornando-se um sério problema de saúde pública (FREITAS, 1995). As cianotoxinas podem ser agrupadas em classes de acordo com o seu modo de toxicidade (CARMICHAEL, 1992;) sendo que seus mecanismos de toxicidade descritos e conhecidos são muito diversos e vão desde efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos, à inibição geral da síntese de proteínas (CAMPINAS *et al.*, 2002.)

Os fenômenos de florações de cianobactérias têm ocorrido ao longo da história porém nas duas últimas décadas, os problemas de saúde pública e os impactos econômicos e ambientais têm aumentado em frequência, intensidade e distribuição geográfica (DARANAS *et al.*, 2001). Desta maneira, as florações de cianobactérias e outras microalgas tóxicas tornaram-se uma problemática de considerável magnitude, levando a Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) a criar um comitê especial denominado “International Oceanographic

Commission (IOC-UNESCO) responsável pela gestão e pesquisa dos fenômenos das florações de microalgas tóxicas.

É reconhecido que dentro de uma mesma espécie, podem existir cepas produtoras e não produtoras de toxinas. Entre os gêneros que apresentam espécies tóxicas que formam florações, cita-se: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularina* e *Oscillatoria*. (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Devido à sua capacidade altamente “invasora” a certos corpos d’água, a *Cylindrospermopsis raciborskii* ocorre em corpos d’água de todo o mundo, numa ampla diversidade de habitats. Esta cianobactéria dá origem a florações de elevada densidade e produz toxinas extremamente agressivas tais como as saxitoxinas, também conhecidas por “venenos paralisantes de mariscos”. De acordo com Ohtani (1992), *C. raciborskii* pode produzir mais de um tipo de toxina, e entre elas está a cilindrospermopsina, um alcalóide com ação deletéria no fígado e nos rins. A ocorrência e a produção de toxinas por esta espécie tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores e autoridades sanitárias em diversos locais do globo como na Oceania (STIRLING e QUILLIAM, 2001), Ásia (LI, 2001), Europa (FASTNER *et al.*, 2003; SAKER *et al.*, 2003; KOKOCISNKI *et al.*, 2009; BLÁHOVÁ *et al.*, 2009), América (JONES e SAUTER, 2005), África (HARDING e PAXTON, 2001) e num âmbito nacional (LAUDARES-SILVA, 1999; BOUVY *et al.*, 2001; MONDARDO, 2004; MELO-FILHO, 2006).

A composição da comunidade fitoplancctônica da Lagoa do Peri, já foi estudada por diversos pesquisadores (LAUDARES-SILVA, 1999; MATTHIENSEN, 2001; MONDARDO, 2004, 2010; GRELLMANN, 2006, CORAL, 2009) em diferentes ciclos anuais. Todos foram unânimes em apontar *C. raciborskii* como a espécie de cianobactéria mais importante, não só devido à sua constância e abundância como também devido à sua dominância em vários meses do ano.

A resistência química, a morfologia e a flutuabilidade da *C. raciborskii* foram apontadas por Yunes *et al.* (2003) como as características que possibilitam a passagem destas cianobactérias de maneira praticamente intacta através das diversas etapas do tratamento convencional da água, aparecendo inclusive, na água já tratada, o que pode apresentar riscos à saúde pública. Este indesejável fenômeno pode ser observado na Estação de Tratamento de Água (ETA) da Lagoa do Peri, a qual, desde setembro de 2000, abastece a Costa Leste/Sul da Ilha de Santa Catarina. Esta estação, a

qual utiliza a tecnologia da filtração direta de escoamento descendente, passa por sérias dificuldades operacionais nos períodos em que se verifica um elevado número de cianobactérias no seu manancial (MELO-FILHO, 2006).

O monitoramento e a remoção de cianobactérias e cianotoxinas nos mananciais ainda é uma prática pouco comum em diversos países, sendo o Brasil um dos poucos países que possuem uma Legislação Federal que obriga a detecção das cianobactérias e das cianotoxinas na água destinada ao abastecimento público: a Portaria nº 1.469/2000 do Ministério da Saúde substituída pela Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde. Com a edição dessa Portaria, novos parâmetros analíticos começaram a fazer parte do elenco de parâmetros analisados para garantir a qualidade da água potável nos sistemas produtores de água. A partir da detecção das cianobactérias e das cianotoxinas na água de abastecimento público, uma nova visão sobre os processos de tratamento, até então tidos como verdadeiras barreiras sanitárias para alguns patógenos, começou a ser reavaliada. (BRASIL, 2004; JARDIM e VIANA, 2003).

Testes toxicológicos são considerados uma das metodologias mais apropriadas para se estimar os efeitos tóxicos de contaminantes sobre os organismos aquáticos (MENDONÇA, 2006). Atualmente, além dos testes ecotoxicológicos convencionais, tem-se utilizado técnicas de citotoxicologia e de genotoxicidade para auxiliar nos estudos que avaliam os efeitos destes agentes nos organismos vivos, inclusive no homem. A caracterização dos perigos causados aos seres humanos baseia-se fortemente em estudos com animais, a partir dos quais estimativas quantitativas dos riscos para os seres humanos podem ser extrapolados (CODD *et al.*, 2005).

Toxinas produzidas por algas tóxicas podem ser potentes promotoras de tumores, causar distúrbios em várias funções celulares, inibir a síntese de proteínas e muitas vezes são neurotóxicas. Além disso, algumas dessas toxinas podem ser genotóxicas, ou seja, alteram a seqüência nucleotídica do DNA e podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (FUJIKI *et al.*, 1997). No entanto, os cientistas acreditam que se conhece muito pouco da verdadeira ação das toxinas produzidas por cianobactérias nos organismos. O conhecimento toxicológico e as conseqüências a nível celular, geradas pelas ações a longo prazo na saúde dos

organismos consistem numa grande interrogação para a toxicologia, exigindo amplos programas de investigação e redobrados cuidados com as fontes de contaminação. A Organização das Nações Unidas revela que apenas se conhece uma avaliação completa da toxicidade à saúde pública e ao ambiente, de uma quantidade inferior a 2% dos compostos químicos naturais (IOC, 1995).

Neste sentido, os estudos de citotoxicidade *in vitro* auxiliam na avaliação dos compostos químicos naturais (toxinas) e os danos que podem causar nas estruturas biológicas e nos processos fisiológicos. Uma via comum é quando o toxicante alcança a molécula-alvo e reage com ela, resultando em disfunção celular. Pode acontecer também, do composto tóxico não alcançar o alvo específico, mas influenciar adversamente o microambiente biológico causando disfunção molecular, celular e de organelas ou órgãos, levando a efeitos deletérios. Os testes em cultura celular são simples e baseiam-se em ensaios colorimétricos de viabilidade celular: após a exposição das células às amostras, estas são tratadas com reagentes específicos para que a mudança de cor seja identificada automaticamente por um espectrofotômetro. Em relação aos bioensaios, estes testes oferecem diversas vantagens como rapidez, simplicidade, segurança, precisão e reprodutibilidade.

Essas práticas já estão sendo difundidas nos Países Europeus e América do Norte desde o fim da década de 80, e atualmente, são utilizadas em alguns países como parâmetros de avaliação de risco ambiental dos compostos químicos naturais dispostos no meio ambiente. Diversos trabalhos tem utilizado, em especial, técnicas de genotoxicidade como o micronúcleo, cometa ou testes em cultura celular como o Vermelho Neutro e o MTT aplicadas a estudos relacionados com toxinas produzidas por microalgas (FASTNER *et al.*, 2003; BOTHA, 2004; CARVALHO PINTO-SILVA, 2005; LI, 2008; SOUID-MENSI *et al.*, 2008, MELEGARI, 2010). Sendo assim, estas técnicas nos permitem o entendimento dos fenômenos de toxicidade, originados pelos compostos químicos naturais ou sintéticos, ao nível celular e das moléculas.

A importância destes estudos na área de Engenharia Ambiental se dá através da informação precisa da ação dos compostos nos organismos, possibilitando o uso dos resultados como ferramenta para a indicação da qualidade ambiental através da presença e tolerância dos organismos. Assim, os testes de citotoxicidade e genotoxicidade propostos neste estudo, podem

colaborar para compreendermos melhor o fenômeno das florações de microalgas e elucidar alguns mecanismos de ação tóxica que levam estas toxinas a alterar a fisiologia celular causando diversas patologias, em especial o câncer.

A Lagoa do Peri, tanto suas águas quanto seu entorno, são de grande importância para a população do Sul da Ilha de Santa Catarina, seja para prática de caminhadas, passeios e recreação. Além disso, como mencionado anteriormente, esta Lagoa é usada pela Companhia de água e Saneamento da Capital (CASAN) como fonte de abastecimento de água. Devido às diversas formas importantes do uso destas águas a presença de cianobactérias produtoras de toxinas geram algumas dúvidas tais como: As cianobactérias presentes na Lagoa do Peri liberam toxinas? As toxinas são capazes de causar citotoxicidade e genotoxicidade em peixes e cultura celular? Com a densidade celular de cianobactérias existente na Lagoa é seguro utilizá-la para o abastecimento público? Diante deste contexto esta pesquisa teve como foco a aplicação de testes ecotoxicológicos, citotóxicos e genotóxicos em amostras de água do manancial da Lagoa do Peri a fim de tentar responder a estas perguntas.

2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho justifica-se através de três argumentos: científico, legal e local.

O primeiro argumento científico trata da problemática que envolve a presença de algas tóxicas nos corpos d'água utilizados para consumo humano. O aumento aparente da intensidade, duração e distribuição geográfica de florações de algas nocivas tem sido relatado com maior frequência nas duas últimas décadas em diversos locais do globo. No entanto é necessário provar com rigor científico que o aumento é real, o que exige dados de séries temporais do fitoplâncton e as condições ambientais que estão disponíveis. Estas florações de algas nocivas – assim designadas pela Comissão Oceanográfica Intergovernamental da UNESCO - são vistas como prejudiciais ao homem por seus efeitos adversos à saúde humana, às explorações aquícolas, às populações naturais de organismos marinhos e ao turismo nas zonas costeiras (SAR *et al.*, 2002).

Sua alta competitividade em ambientes eutrofizados, aliada à sua capacidade de formar florações e de produzir toxinas, assim como os problemas causados ao dificultar o tratamento das águas naturais para abastecimento, faz que atualmente *C.raciborskii* seja uma das espécies de cianobactérias mais estudadas tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública.

Além do consumo direto da água contaminada, o acúmulo das toxinas na rede trófica pode atingir conjuntos de organismos muito além da comunidade aquática, como a população local que consome esta água podendo assim afetar a saúde humana. Os problemas decorrentes vão desde intoxicações leves até a morte. Estas toxinas presentes na água podem ser prejudiciais ao homem se ingerida mesmo em doses pequenas e de forma constante. Atualmente além dos testes ecotoxicológicos convencionais (bioensaios), tem-se utilizado também testes toxicológicos mais apurados para auxiliar nos estudos que avaliam os efeitos destes agentes nos organismos vivos, inclusive no homem. Sua aplicação nas investigações de toxicologia ambiental principalmente utilizando amostras naturais de mananciais de abastecimento público, tem importância não só pelo fato de que a adaptação e aplicação das técnicas disponíveis podem colaborar com o avanço da ciência mas também pelo enriquecimento dos registros existentes a respeito dos efeitos destas toxinas.

Assim, a justificativa local se dá pela presença abundante e persistente da espécie produtora de toxinas *C.raciborskii* na Lagoa do Peri, um manancial localizado na Ilha de Santa Catarina e que é utilizado para abastecer o Sul e a Costa Leste de Florianópolis.

Devido às suas características, a Lagoa do Peri e a presença de *C. raciborskii* neste manancial tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores e autoridades sanitárias, sendo também objeto de estudo de alguns grupos de pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina no âmbito da presença desta alga e de suas toxinas na Lagoa. Desta forma este trabalho está inserido nas pesquisas do Laboratório de Toxicologia Ambiental da mesma Universidade. Este realiza desde 1997 estudos científicos no âmbito das florações de algas tóxicas e desenvolve técnicas que possibilitam introduzir nos diagnósticos de qualidade ambiental variáveis sobre os efeitos tóxicos e genotóxicos de elementos químicos dispostos no meio ambiente. Em 2007, Moser realizou estudos preliminares aplicando testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e teste do micronúcleo com peixes à água da Lagoa do Peri apresentando toxicidade em *D.magna* e a formação de micronúcleos em peixe coletado no manancial e também em espécie aclimatado com a água da Lagoa em laboratório. A fim de melhor investigar os resultados encontrados nestes testes preliminares, este trabalho aplicará estes e outros métodos de testes de laboratório. Desta forma, este trabalho se insere no contexto das pesquisas científicas da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial como parte integrante de um grupo de trabalhos já realizados ou em andamento no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA), cujo objetivo está relacionado à caracterização da comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, manancial de abastecimento de água, à avaliação e aplicação de processos de tratamento viáveis na remoção de cianobactérias e cianotoxinas e ao estudo da toxicidade das suas amostras ou das toxinas ali encontradas.

O argumento legal por sua vez, baseia-se no fato que o Brasil é um dos poucos países que possuem uma legislação federal que determina a detecção das cianobactérias e das cianotoxinas nas águas destinadas ao abastecimento público: trata-se da Portaria nº 1469 de 2000, substituída pela Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). Este trabalho possibilitará verificar se as amostras estudadas atendem às condições mínimas determinadas por legislação para que a água da Lagoa do Peri possa ser ingerida ou utilizada para fins higiênicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade da água da Lagoa do Peri através da aplicação de testes ecotoxicológicos, citotóxicos e genotóxicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a cianobactéria *C. raciborskii* presente na Lagoa do Peri;
- Avaliar a toxicidade aguda da água bruta da Lagoa do Peri em *Daphnia magna*;
- Avaliar a genotoxicidade da água bruta da Lagoa do Peri através do ensaio do Micronúcleo e do Cometa em peixes;
- Avaliar a genotoxicidade da água bruta da Lagoa do Peri através do ensaio do Micronúcleo em cultura celular.
- Avaliar a citotoxicidade da água bruta da Lagoa do Peri em cultura celular.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Lagoa do Peri

A Lagoa do Peri está localizada nos limites do Parque Natural Municipal da Lagoa do Peri, ao Sul da Ilha de Santa Catarina, entre as coordenadas 27°42'30'' e 27°46'30'' de latitude Sul e 48°30'00'' e 48°33'30'' de longitude Oeste cerca de 20 Km do centro de Florianópolis (LAUDARES-SILVA, 1999). É uma importante praia lacustre que está preservada como Patrimônio Natural desde 1976, seguido da criação do Parque pela Lei Municipal nº 1.828/1981, regulamentada pelo Decreto Municipal nº 091/82 e alterado pela Lei Complementar nº 315/2008 de Florianópolis. Está sob jurisdição da Fundação Municipal do Meio Ambiente (FLORAM) e é uma das mais importantes reservas florestais, biológicas e reserva natural de água doce de Florianópolis, considerada como uma Unidades de Conservação de Proteção Integral.



Figura 4.1- Localização geográfica do Parque Municipal da Lagoa do Peri: Brasil, Florianópolis e o Parque em destaque (Google Earth).

Fonte: Moser, 2007.

Devido sua importância do ponto de vista ambiental, cultural, econômico e até mesmo estratégico - como fonte de recursos naturais – a Lagoa do Peri tem sido objeto dos mais diferentes estudos que datam desde o início da década de 70. Mais

tarde, Laudares-Silva (1999) realizou um importante e amplo estudo dos aspectos limnológicos, variabilidade espacial e temporal na estrutura da comunidade fitoplanctônica do manancial, sendo ponto de partida para diversos outros estudos deste tipo. Na última década destacam-se as pesquisas ligadas à sua caracterização ambiental através da análise de parâmetros físico-químicos e biológicos (SIMONASSI, 2001), análise sedimentar da área (OLIVEIRA, 2002), da vegetação do Parque (HINKEL, 2002), sendo que em 2006, Grellmann publicou seu trabalho que trata dos aspectos da morfologia e ecologia de *C. raciborskii* e a produção de cianotoxinas na Lagoa do Peri. Além disso diversos autores realizaram estudos de remoção das algas da Lagoa utilizando diferentes tecnologias de tratamento da água (SILVEIRA, 2003; MONDARDO, 2004; RABELO, 2006; MELO-FILHO, 2006; GARCIA, 2007).

Esta Lagoa costeira, como as demais ocorrentes ao longo do litoral brasileiro, compreende um dos principais sistemas lênticos do país. Suas águas não são afetadas pelas oscilações da maré pois está cerca de 3 metros acima do nível do mar (CECCA, 1986) constituindo o maior manancial de água doce de Florianópolis. Em novembro de 2000, através de um projeto da CASAN, este reservatório começou a ser utilizado para abastecimento das regiões Sul e Leste da Ilha.

A Lagoa é abastecida por um conjunto de mananciais hídricos formados junto às encostas que dividem o Sul da Ilha sendo os rios Ribeirão Grande e Cachoeira Grande são os dois principais tributários da bacia. Outros pequenos rios como o Cachoeira Pequena e alguns córregos - classificados como temporários -, que se formam durante períodos mais prolongados de chuvas, também contribuem com a manutenção do fluxo de água à lagoa, porém de forma menos expressiva (CECCA, 1986; SIMONASSI, 2001). Suas águas deságuam próximo à Praia da Armação através do Rio Ribeirão Grande conhecido como canal Sangradouro. Possui volume de aproximadamente $21,2 \times 10^6 \text{ m}^3$, uma área superficial de $5,2 \text{ km}^2$. Levantamentos batimétricos da Lagoa do Peri revelaram que a mesma é simétrica em suas margens laterais, com taludes relativamente íngremes próximos às margens, em seus extremos NE e SW a Lagoa apresenta áreas mais suaves e no centro ela é relativamente plana. Apresenta profundidade média de 4,2m e a máxima de 11,0 m próximo a margem oeste da Lagoa, área que concentra as maiores profundidades (SIMONASSI, 2001). Sendo uma importante praia lacustre é amplamente utilizada para o lazer e

recreação em novembro do ano 2000 através de um projeto da CASAN, este reservatório começou a ser utilizado para abastecimento das regiões Sul e Leste da Ilha.

A temperatura da água máxima registrada pela bibliografia consultada foi de 31°C em 2001 (MONDARDO, 2004) e mínima de 15°C (LAUDARES-SILVA,1999), os valores de pH de 6,0 a 8,6 (LAUDARES-SILVA ,1999; MOSER, 2007) e a condutividade elétrica varia entre 47 e 250 μ S/cm (MONDARDO, 2004; LAUDARES-SILVA, 1999). Isso pode ser explicado pela ação dos ventos na região, o que acaba gerando um aporte de compostos ionicamente carregados provenientes do spray marinho, bem como pela interferência das precipitações marinhas. As concentrações de oxigênio dissolvido variaram entre 6,1 e 9,8mg/L (MOSER, 2007; MONDARDO, 2004), sendo que os perfis de oxigênio revelaram uma tendência à redução dos valores em direção ao fundo, não apresentando deficiência de oxigênio (LAUDARES-SILVA, 1999; SIMONASSI, 2001). Devido à intensa ação dos ventos que agem sobre a Lagoa, há uma constante circulação na coluna d'água, fazendo com que o oxigênio se distribua ao longo da coluna, não havendo registros de regiões anóxicas. A média anual da Clorofila a é de 18,11 μ g/L (GRELLMANN, 2006). Além da abundante presença de *C. raciborskii*, diversas espécies compõe a comunidade fitoplactônica da Lagoa. Laudares-Silva (1999) identificou 76 táxons sendo que Grellmann (2006) observou uma redução para 50 táxons.



Figura 4. 2 – Vista Panorâmica do parque Municipal da Lagoa do Peri (MOSER)

4.2 Cianobactérias e Cianotoxinas

As cianobactérias são microorganismos aeróbicos fotoautotróficos, ou seja, fotossintetizantes, sendo a fotossíntese seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo assemelhando-se assim às algas (vegetais eucariontes). No entanto sua organização celular demonstra que esses microorganismos são procariontes e portanto muito semelhantes bioquimicamente e estruturalmente às bactérias.

A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios é uma das características marcantes das cianobactérias. Várias espécies vivem em solos e rochas onde desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na ciclagem de nutrientes. Entretanto, ambientes de água doce são os mais importantes para o seu crescimento, visto que a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutro alcalinas (pH 6-9), temperatura entre 15 a 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (AZEVEDO, 1998).

A morfologia das cianobactérias é bastante variada podendo ser encontradas na forma unicelular, colonial e filamentosa. Suas células podem apresentar-se esféricas, cúbicas, ovóides, cilíndricas, ou mesmo sem forma definida, formando filamentos simples ou com ramificações e colônias com diferentes arranjos.

O sucesso competitivo das cianobactérias em relação a outras espécies é baseado em estratégias fisiológicas e adaptativas ecológicamente (SANT'ANNA, 2008). São reconhecidas neste sentido, a capacidade de várias espécies de cianobactérias em ajustar sua fluutuabilidade por meio de vesículas de gás, buscando condições do meio mais favoráveis ao seu crescimento, principalmente em relação à intensidade luminosa. Pode-se considerar também a afinidade destes organismos com fósforo e nitrogênio, dois nutrientes geralmente limitantes no crescimento. Possuem a capacidade em armazenar importantes quantidades de fósforo para posterior utilização, e de certas espécies em fixar o nitrogênio atmosférico (ROBERT *et al.*, 2005).

Os *blooms* de cianobactérias em reservatórios de água destinada à produção de água para consumo humano originam muitos problemas, sendo o mais preocupante o fato de uma proporção significativa de cianobactérias produzirem uma ou mais toxinas (CAMPINAS *et al.*, 2002).

As cianotoxinas por sua vez, constituem um grupo de diversas toxinas que são biossintetizadas por certas espécies e cepas de cianobactérias, sendo um grupo quimicamente heterogêneo e que apresenta diferentes propriedades toxicológicas. As toxinas das cianobactérias são consideradas metabólitos secundários biologicamente ativos, isto é, são compostos não utilizados por esses organismos em seu metabolismo primário, muitos dos quais com potencial farmacológico. Em geral as cianotoxinas encontram-se dentro das células viáveis de cianobactérias, sendo apenas uma pequena fração liberada para o meio líquido (AZEVEDO e BRANDÃO, 2003). De acordo com a sua estrutura química, estas toxinas podem ser classificadas em três grandes grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos. A classificação principal, porém, baseia-se na sua ação farmacológica, ou seja, sobre determinados tecidos, órgãos-alvo ou organismos. Segundo esta classificação, as cianotoxinas são agrupadas de acordo com seu modo de toxicidade em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (citotoxinas) (SIVONEN e JONES, 1999, CARMICHAEL, 1992).

O Quadro 4.1 apresenta de forma simplificada os grupos de cianotoxinas que são atualmente estudados, o tecido e/ou órgãos principalmente afetados e os principais gêneros de cianobactérias que as produzem:

Grupo de toxinas	Estrutura química	Tecido/órgãos alvo e ação	Gêneros de Cianobactérias
Anatoxina-a	alcalóide	Sinapse nervosa liga-se ao receptor da acetilcolina	<i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> (<i>Oscillatoria</i>), <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxina-a (s)	alcalóide	Sinapse nervosa-inibidora da acetilcolinesterase	<i>Anabaena</i> ,
Aplisiatoxina	alcalóide	Pele	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix</i> (<i>Oscillatoria</i>),

Cilindrospermopsina	alcalóide	Fígado, rim – inibidora de síntese protéica	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Umezakia</i> <i>Raphidiopsis</i>
Homoanatoxina-a	alcalóide	Sistema nervoso	<i>Oscillatoria formosa</i>
Lymbyatoxina-a	alcalóide	Pele, trato gastrointestinal	<i>Lyngbya</i>
Lipopolissacarídeo	lipopolissacarídeo	Irritante aos tecidos expostos	todas
Microcistina	peptídeo	Necrose do fígado e tumores	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix (Oscillatoria)</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i>
Neosaxitoxina e Saxitoxina	alcalóide	Nervo axônico- Liga-se aos canais de sódio	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i>
Nodularina	peptídeo	Fígado	<i>Nodularia</i>

Quadro 4.1: Grupos de cianotoxinas, tecido e/ou órgãos principalmente afetados e os principais gêneros de cianobactérias que as produzem.

Fonte: Chorus e Bartram (1999), Calijuri *et al.*, (2006), Bittencourt-Oliveira e Molicca, 2003.

A partir da produção de cianotoxinas, a toxicidade de florações de Cianobactérias pode apresentar uma variação temporal, desde intervalos curtos de tempo até diferenças sazonais, anuais e também espaciais, provavelmente decorrente de alterações na proporção de cepas tóxicas e não tóxicas na população. A ocorrência irregular da toxicidade nas cianobactérias ainda não foi devidamente esclarecida sendo que para o estudo desta variabilidade deve-se considerar a hipótese da ocorrência de cepas geneticamente distintas que não produzem toxinas e/ou da possibilidade de que fatores ambientais tais como luz, temperatura, nutrientes que regulem a síntese dessas toxinas (CARMICHAEL, 1992).

Da mesma forma os motivos e a função exata produção das cianotoxinas ainda é desconhecida. Acredita-se que estes compostos tenham função protetora contra herbivoria (CARMICHAEL, 1992; FREITAS, 1995), enquanto outros pesquisadores sugerem que a produção está relacionada às condições de crescimento ou à competição por recursos e pode ser ocasionada e liberada ao meio por situações de estresse, mesmo sem a ruptura celular (CALIJURI *et al.*, 2006). A liberação ao meio externo pode ocorrer também naturalmente, pela redução na população como resultado de morte ou por ação humana via adição de compostos algicidas ou por processos de tratamento de água (SIQUEIRA e OLIVEIRA-FILHO). Para a realização de ensaios em laboratório pode-se considerar o congelamento e descongelamento em temperatura ambiente por 3 vezes, para provocar o rompimento das membranas das células com o objetivo de liberar as toxinas presentes no interior das células das cianobactérias (WHITE *et al.*, 2007; CETESB, 2003 *apud* TAKENAKA 2007).

Florações de cianobactérias produtoras de toxinas tem causado intoxicação e morte de organismos aquáticos e outros animais que utilizam a água como fonte de alimentação (CARMICHAEL, 1992). Diversas pesquisas mostram que cianobactérias tóxicas tem efeitos adversos na comunidade zooplânctônica e nos diversos níveis tróficos devido à letalidade ou à diminuição da sua taxa de crescimento e reprodução (BOUVY *et al.*, 2001; TRABEAU *et al.*, 2004).

Visando identificar cepas produtoras de toxinas e também elucidar o mecanismo de ação, o extrato de diversas cianobactérias cultivadas em laboratório tem sido testado em camundongos, peixes (BERRY *et al.*, 2009), anfíbios (WHITE *et al.*, 2007), cultura celular, plantas superiores (BEYER *et al.*, 2009), invertebrados (WHITE *et al.*, 2006; KINNEAR *et al.*, 2007), microalgas (DUVAL, *et al.*), zooplâncton (FASTNER 1995, SANEVAS, 2006, METCALF *et al.*, 2002).

Nesta perspectiva, torna-se preocupante a possibilidade de bioacumulação e transferência de cianotoxinas através da cadeia trófica, como exemplo na ingestão de peixes e moluscos que se alimentaram continuamente de cianobactérias, possibilitando a acumulação de toxinas em seus tecidos, oferecendo assim um sério risco à saúde humana (CARVALHO PINTO-SILVA, 2005; FALCONER 1991, 1994). Além disso, a exposição humana pode

se dar de outras maneiras: contato dermal, inalação, ingestão oral e por via intravenosa (CALIJURI *et al.*, 2006).

No Brasil diversos estudos confirmam a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias em corpos d'água de diversos Estados, como por exemplo: São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Bahia, Pernambuco e Distrito Federal (AZEVEDO, 1998, BOUVY *et al.*, 2001, MOLICA, 2005). No entanto, é sensato considerar que esta informação não reflete a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias apenas nestes Estados, mas sim uma maior representação de estudos sobre este tema concentrados na região Centro-Sul do Brasil (MENDONÇA, 2006).

4.3 *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii é uma espécie de cianobactéria bem conhecida por formar bloom tóxico, originalmente descrita como uma espécie de origem tropical (WOLOSZYNSKA, 1912 *apud* VALÉRIO, 2005). No entanto a formação de blooms causados por esta cianobactéria tem ocorrido nas regiões dos trópicos às zonas temperadas e os registros das aparições nas últimas décadas foi primeiramente documentado em um amplo estudo realizado por Padisák (1997).

A ocorrência e até a dominância da *C.raciborskii* tem sido identificada em diferentes locais do planeta como em Portugal (SAKER *et al.*, 2003), Alemanha (FASTNER *et al.*, 2003; WIEDNER, 2007), França (BRIAND *et al.*, 2002), Egito (MOHAMED, 2006), Nova Zelândia (STIRLING e QUILLIAM, 2001; WOOD e STIRLING, 2003), Tailândia (LI *et al.*, 2001), Polônia, (KOKOCINSKI *et al.*, 2009), Austrália (MC GREGOR e FABBRO, 2000), Estados Unidos (JONES e SAUTER, 2005), África do Sul (HARDING e PAXTON, 2001), Uruguai (VIDAL e KRUK, 2008) sendo que a maioria destes trabalhos comprovam a ocorrência de cepas produtoras de toxinas.

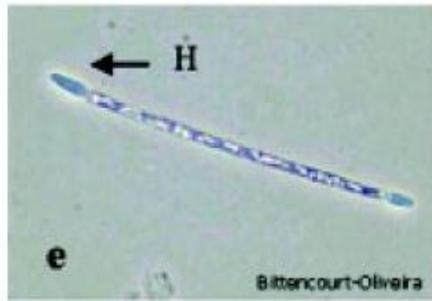
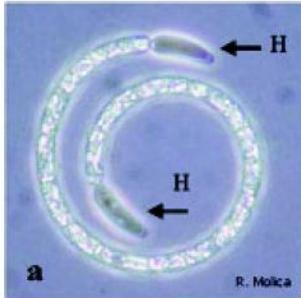
No Brasil, florações de *C.raciborskii* têm sido identificadas em diversas regiões e se caracterizam pela dominância em sistemas tropicais eutróficos rasos (MELO-FILHO, 2006) e tem sido identificada em diversos corpos d'água de regiões de Pernambuco (BOUVY *et al.*, 2001, MOLICA *et al.*, 2005), Espírito Santo (FUNASA, 2007), São Paulo (TUCCI e SANT'ANNA, 2003; GEMELGO, 2008; MATSUZAKI, *et al.*; 2004), Santa Catarina

(LAUDARES-SILVA, 1999), Minas Gerais (FIGUEREDO *et al.*, 2007), Rio de Janeiro (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009^a) entre outros citados por Bittencourt-Oliveira e Molica (2003) como Paraná, Distrito Federal, Goiás, Paraíba, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e Tocantins.

Segundo Padisák (1997) seu sucesso é atribuído a diversas razões, em especial: grande habilidade de flutuação que por um lado permite uma migração diurna entre as camadas de água com maior ou menor disponibilidade de nutrientes e por outro evita a acumulação na superfície de uma grande quantidade de filamentos, o que poderia causar danos fisiológicos; alta tolerância ao sombreamento o que permite o crescimento de uma grande população, a alta afinidade na absorção de amônio, além da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico através de células vegetativas diferenciadas chamadas heterocitos (Figuras 4.3 e 4.4) e a capacidade de estocar fosfato na forma de grãos de polifosfato e a resistência a herbivoria. Pode ainda apresentar estrutura denominadas acinetos (Figura 4.5), que podem ser caracterizados como esporos de resistência, normalmente presentes quando da ocorrência de desequilíbrio nas condições ambientais, além de serem capazes de estocar substâncias de reserva (MENDONÇA, 2006). Suas paredes espessas acumulam reservas de proteínas sob a forma de grânulos de cianoficinas sendo produzidos quando as condições do meio são desfavoráveis, são altamente resistentes ao dessecação e podem resistir nos sedimentos por muitos anos (SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Estudos recentes indicam também que um efeito alelopático sobre outras espécies pode facilitar sua expansão geográfica e a ocorrência de blooms (FIGUEREDO *et al.*, 2007; MENDOZA-VERA *et al.*, 2008). Padisák (1997) afirma também que *C. raciborskii* tem preferência por altas temperaturas (25°C) e por altos valores de pH (8,0-8,7). Entretanto esta espécie foi encontrada na Lagoa do Peri durante o inverno, em temperaturas baixas (15°C) e em pH próximo a 6,0 (LAUDARES-SILVA, 1999; MOSER, 2007).

Em muitos corpos d'água a combinação destas e de outras características permitem a formação de florações e até mesmo de dominância durante longos períodos de tempo. Diversos autores (MCGREGOR e FABBRO, 2000, BRIAND *et al.*, 2002, 2004) sugerem que as mudanças no clima possam servir como uma possível explicação para a expansão da espécie em certas regiões do planeta.



Figuras 4.3 e 4.4 : Filamentos de *C.raciborskii* com heterocito (H). Fonte: Bittencourt-Oliveira e Molica, 2003.



Figura 4.5: Filamento de *C.raciborskii* com heterocito e acinetos.
Fonte: Briand *et al.*,2002.

Além disso, a alta competitividade em ambientes eutrofizados aliada à capacidade de formar florações e produzir toxinas fazem desta, uma das cianobactérias mais estudadas tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública (TUCCI, 2003).

No âmbito da toxicologia, esta cianobactéria é de grande interesse e estudo pois produz comprovadamente ao menos dois tipos de cianotoxinas: as neurotoxinas (“Paralytic Shellfish Poisoning”- PSP-saxitoxinas, neo-saxitoxinas e goniautoxinas) e as citotoxinas (cilindrospermopsina) (OHTANI *et al.*,1992; LI *et al.*,2001,). Segundo Sens *et al.* (2005), as análises de detecção da concentração de saxitoxina e neosaxitoxina, podem atingir um total de 5,4 µg/L de equivalentes de saxitoxina, num período de dominância da espécie de cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* nas águas da Lagoa do Peri.

As saxitoxinas são alcalóides carbamatos que inibem a condução nervosa por bloqueamento dos canais de sódio, afetando a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas. Os sinais de intoxicação são: tontura, adormecimento da boca e de

extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia, podendo levar a morte entre 2 a 12 horas após a ingestão (FUNASA, 2003).

Em camundongos, por via intraperitoneal a DL50 para 24h é de 10-30 µg /kg (CHORUS e BARTRAM 1999). Segundo Carneiro *et al.* (2009) a produção de saxitoxinas pela *C.raciborskii* é modulada pela luz em um ritmo circadiano.

A Figura 4.6 apresenta a estrutura química geral da saxitoxina:

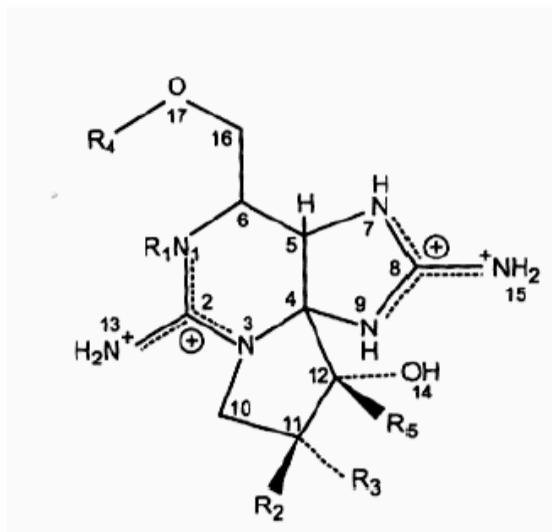


Figura 4.6: Estrutura geral das saxitoxinas
Fonte: Chorus e Bartram, 1999.

A cilindrospermopsina por sua vez, é um alcalóide cíclico de guanidina altamente solúvel em água e relativamente estável no escuro, não sendo suscetíveis a variações de pH nem temperaturas elevadas (50°C).

Novas variantes têm sido identificadas, entre elas a demetoxi-cilindrospermopsina (CHORUS e BARTRAM, 1999) e a deoxi-cilindrospermopsina (LI *et al.*, 2001). Seu mecanismo de ação se dá por inibição da síntese protéica, podendo causar danos severos em células renais, pulmonares, estomacais, cardíacas e do fígado bem como no sistema circulatório e linfático, quando testada em animais (HAWKINGS, 1985; FUNASA, 2003).

Tem ação lenta, podendo ser necessários de 5 a 7 dias para atingir seu efeito tóxico máximo. Em camundongos, por via intraperitoneal a DL50 para 24h é de 2100 µg/kg, passando a ser 200 µg /kg para 6 dias (OHTANI *et al.*, 1992, TERA0 *et al.*, 1994) sendo que resultados também foram encontrados para uma espécie do zooplâncton *Artemia salina*: a DL50 para 24h é de 8.1.mg.kg-1, passando a ser 0,7mg.kg0-1 para 72h (METCALF *et al.*, 2002).

Diversas pesquisas mostram que esta cianotoxina pode acumular-se nos tecidos de organismos aquáticos (SAKER e EAGLESHAM, 1999) e pode ser causadora de efeitos adversos nos diversos níveis tróficos como em bactérias, na comunidade zooplanctônica, (BOUVY *et al.*, 2001; METCALF *et al.*, 2002), comunidade fitoplanctônica (DUVAL *et al.*), peixes (SAKER e EAGLESHAM, 1999; BERRY *et al.*, 2009), anfíbios (WHITE *et al.*, 2007), cultura celular, invertebrados (WHITE *et al.*, 2006; KINNEAR *et al.*, 2007) , microalgas (DUVAL *et al.*) entre outros.

A Figura 4.7 apresenta a estrutura química geral da cilindropermopsina:

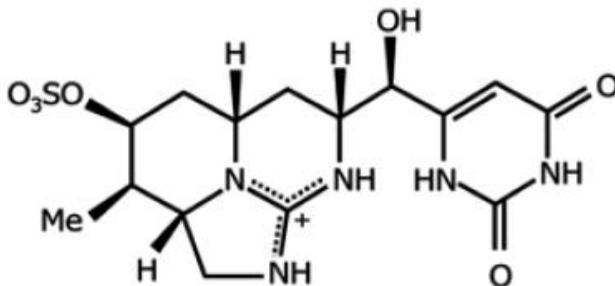


Figura 4.7: Estrutura da cilindropermopsina.

Fonte: Chorus e Bartram, 1999.

4.4 Cianobactérias em mananciais de água utilizados para abastecimento público

Devido à sua capacidade altamente “invasora” a certos corpos d’água, *Cylindrospermopsis raciborskii* ocorre em corpos d’água de todo o mundo numa ampla diversidade de habitats. As florações de cianobactérias estão relacionadas com alterações no gosto e odor da água através da produção de compostos aromáticos podendo causar a modificação da sua transparência, depleção de

oxigênio e propiciando a produção de toxinas, podendo levar a morte da fauna e flora existentes (CARMICHAEL, 1992).

Os *blooms* de cianobactérias em reservatórios destinados à produção de água para consumo humano originam muitos problemas para o abastecimento de água potável como entupimento de filtros, acréscimo da dosagem de reagentes, produção de odores e sabores (CAMPINAS *et al.*, 2002). De acordo com Di Bernardo (1995), a presença de cianobactérias em ETAs pode causar problemas operacionais em várias etapas de tratamento, tais como dificuldade de coagulação e floculação, baixa eficiência do processo de sedimentação, colmatação dos filtros e aumento da necessidade de produtos para a desinfecção. No Brasil, algumas ETAs que utilizam a tecnologia da filtração direta descendente apresentam problemas operacionais os quais podem levar à produção de água com qualidade imprópria para consumo humano (BRANDÃO *et al.*, 1996 *apud* MONDARDO, 2004).

De um modo geral são poucos os trabalhos que avaliaram a remoção de cianotoxinas em ETAs, principalmente a fração extracelular, ou seja, a toxina que já está dispersa na massa líquida. Além disso, a maioria dos autores aborda principalmente a remoção de cianotoxinas numa única etapa do processo de tratamento e apenas um reduzido número de autores pesquisados na bibliografia avaliou as seqüências de tratamento mais comuns, que envolvam a coagulação química e uma ou mais etapas de clarificação (MELO-FILHO, 2006).

O monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em fontes naturais de água é uma prática ainda pouco comum em muitos países. No entanto, quando estas apresentam a ocorrência de populações de cianobactérias, deve ser efetuado um controle da sua ocorrência, bem como da possível produção de cianotoxinas ao longo de pontos críticos do sistema de abastecimento de água. Estes locais incluem o reservatório de água origem da captação, a água bruta da estação de tratamento de água (ETA), pontos chave do processo de tratamento e a água tratada.

O tratamento e o manejo do corpo d'água devem incluir algumas técnicas de engenharia que alterem em grau mínimo suas condições hidrofísicas e reduza satisfatoriamente o crescimento das cianobactérias. As técnicas de controle mais imediatas que podem ser usadas no manejo do corpo d'água em estado natural incluem: anulação da espécie indesejada por meio de um desvio, seleção pelo processo de filtração, uso de barreiras para restringir o movimento

da espécie indesejada e intervenção com tratamento químico, porém estas devem ser tratadas com cuidado e estudos prévios. Atualmente, a remoção de cianobactérias e suas toxinas e a avaliação da sua remoção é um dos maiores desafios do tratamento da água, devendo ser considerada uma questão prioritária (CAMPINAS *et al.*, 2002; CHORUS e BARTRAM, 1999).

4.5 Estação de Tratamento de água da Lagoa do Peri

A Estação de Tratamento de Água (ETA) da Lagoa do Peri está em funcionamento desde 2000, sob o controle da Companhia de Água e Saneamento (CASAN) e abastece as regiões Sul e Leste de Florianópolis, atendendo uma população estimada em 70 mil habitantes das localidades: Campeche, Retiro da Lagoa, Barra da Lagoa, Lagoa, Ribeirão da Ilha, Armação, Pântano do Sul, Tapera, Alto do Ribeirão, Morro das Pedras, Praia dos Açores, Praia da Solidão, Costa de dentro, Joaquina, Praia Mole, Canto da Lagoa, Canto dos Araçás e Caieira. A captação da água é feita através de uma barragem de elevação de nível com um canal adutor até a Estação de Recalque de Água Bruta de onde é bombeada para a ETA.

Na estação, a água é tratada passando primeiramente pelo processo de coagulação. Neste processo é adicionado à água bruta o sulfato de alumínio para aglutinar partículas coloidais, retirando as impurezas da água. Após este processo a água passa por uma bateria de filtros descendentes que são formados por camadas de antracito, areia e pedra (seixos). Durante a filtração ocorre a floculação e a retenção dos flocos formados no processo de coagulação. A limpeza dos filtros é feita por retrolavagem a contra corrente e o efluente resultante deste processo é tratado antes de ser devolvido ao canal que leva ao mar. Após a filtração, para completar o processo de tratamento, são adicionados à água, o cloro (desinfecção) e o flúor (prevenção de cáries). A água já tratada é bombeada para os diversos reservatórios localizados na Região da Costa Leste e Sul, para ser distribuída à população (CASAN).

A presença de *C.raciborskii* (Figura 4.8) ocasiona diversos problemas nas etapas de tratamento da ETA da Lagoa do Peri. A elevada densidade de fitoplâncton ocasiona rápida oclusão de seus filtros, diminuindo as carreiras de filtração, gastando um grande

volume de água de lavagem dos mesmos e comprometendo a qualidade da água produzida (MONDARDO, 2004).



Figura 4.8: *C. raciborskii* encontrada na Lagoa do Peri. Fonte: Moser, 2007

Assim, a remoção de cianobactérias e/ou das toxinas por elas produzidas na Lagoa do Peri tem sido objeto de estudos de muitos pesquisadores e são várias as linhas de abordagem do problema, entre os quais alguns se destacam. Mondardo (2004) realizou estudos com diferentes oxidantes utilizados na pré-oxidação da água a ser submetida à filtração direta descendente seguida de desinfecção por cloro, avaliando a qualidade da água após o tratamento completo, principalmente, no que se refere à formação de trihalometanos e atividades genotóxicas. Melo-Filho (2006) cita a remoção com pré-ozonização ou pré-cloração ou processos de filtração direta com polimento com ozônio e carvão ativado granular. Já Rabelo (2006) sugere a utilização da filtração em margem como etapa de pré-tratamento da água. Apesar de apresentarem resultados satisfatórios, estes não eliminaram as cianobactérias e/ou suas toxinas dispersas na água em sua totalidade, e mesmo atingindo algumas vezes limites inferiores aos estabelecidos pela legislação, sabe-se que o efeito do consumo a longo prazo de baixas concentrações de cianotoxinas sobre a saúde do ser humano pode ser prejudicial. No entanto deve-se considerar que trabalhos recentes tem apontado técnicas mais eficientes na busca pela remoção das cianobactérias e das cianotoxinas presentes em água de abastecimento público. Mondardo (2004) e Coral

(2009) por sua vez, apontam técnicas mais eficientes como a pré-ozonização seguida da filtração direta descendente e flotação por ar dissolvido e nanofiltração utilizando membranas, respectivamente. Deve-se considerar também que estes métodos exigem maiores estudos pois a ozonização, por exemplo, se má utilizada, pode apenas quebrar as células do fitoplâncton e não ser suficiente para oxidar a toxina, aumentando assim o problema.

É importante citar ainda, trabalhos que visam a remoção de microalgas e cianobactérias através de técnicas de filtração em margem, pois estudos mais aprofundados têm mostrado que esse método pode eliminar 100% das células. (SENS *et al.*, 2006 - PROSAB 4; MONDARDO, 2009).

4.6 Intoxicações causadas por Cianobactérias e suas implicações em Saúde Pública

Registros de intoxicação animal pelo consumo de água contaminada por cianobactérias tóxicas tem sido documentados pelo mundo (CHORUS e BARTRAM, 1999). As intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias, por sua vez, já foram descritas em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul.

Há inúmeras suspeitas de mortes humanas por consumo oral de cianotoxinas, porém sua confirmação é bastante difícil. Tem-se dificuldades de obter dados e registros a respeito do meio de contaminação e situações que confirmem a presença de cianotoxinas em alimentos ou em água de abastecimento. O primeiro relato documentado de mortes humanas devido à exposição direta à hepatotoxinas ocorreu de forma intravenosa em uma clínica de hemodiálise em Caruaru (Brasil) no ano de 1996. (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001). Este passou a ser o primeiro caso confirmado de mortes humanas causadas por uma toxina produzida por cianobactérias (JOCHIMSEN *et al.*, 1998). Em termos globais, os relatos clínicos de danos para a população humana, pelo consumo oral de toxinas de cianobactérias em águas de abastecimento, aparecem como conseqüência de acidentes, ignorância ou má administração. Como resultado, esses relatos são parcialmente estimados e as circunstâncias originais são frequentemente de difícil definição (AZEVEDO, 1998).

Em muitos casos, as cianobactérias causadoras dos danos desaparecem do reservatório antes que as autoridades de saúde pública considerem uma floração como o possível risco, pois são geralmente desconhecedoras dos danos possíveis resultantes da ocorrência de florações de cianobactérias e, portanto, assumem que os padrões de purificação de água utilizados nas estações de tratamento de água são capazes de remover qualquer problema potencial. Entretanto, várias toxinas de cianobactérias, quando em solução, não podem ser retiradas através de processos convencionais de tratamento, sendo inclusive resistentes à fervura. Desta forma, os reservatórios de água utilizados para o abastecimento da população que são sujeitos ao aparecimento de florações de cianobactérias precisam ser cuidadosamente monitorados para evitar todos os riscos potenciais adversos à saúde humana. Sabendo-se que as cianotoxinas são endotoxinas, que só são liberadas para a água quando ocorre a lise ou morte celular, a relação entre a idade e a condição da floração deve ser avaliada para evitar as consequências para a saúde pública (AZEVEDO, 1998).

Segundo Di Bernardo *et al.* (2003 *apud* Melo-Filho, 2006), estudos realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LETC-IBCCF-UFRJ) têm confirmado a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público de água dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Bahia, Pernambuco e Distrito Federal. Segundo os autores, quando testadas em bioensaios de toxicidade ou por análises químicas, 82% das cepas isoladas mostraram-se tóxicas, mais especificamente 9,7% neurotóxicas, e as restantes hepatotóxicas.

O fato de *C. raciborskii* ser um perigo potencial para a saúde humana se tornou evidente em um incidente em Salomão Dam, Palm Island, no norte de Queensland, Austrália em 1979. Ocorreram vários casos de hepatoenteritis na população local (cerca de 148 pessoas contaminadas) devido à contaminação da água potável com um cianobactéria que mais tarde foi identificada como *C. raciborskii* (BOURKE *et al.*, 1983). Estudos epidemiológicos confirmam que filamentos desta espécie provenientes de um reservatório de água potável produzia sérios efeitos hepatotóxicos em um rato utilizados para os bioensaios e havia, portanto, sido responsável pelas ocorrências de hepatoenterities (HAWKINS *et al.*, 1985).

No Brasil, a prática da análise das saxitoxinas em amostras de água para consumo humano é de extrema importância, pois um grande aumento da ocorrência do gênero *Cylindrospermopsis*, produtoras deste grupo de neurotoxinas, tem sido isoladas de vários mananciais de abastecimento, desde a região Nordeste até a região Sul do país (FUNASA, 2003). Ainda de acordo com a mesma fonte, em muitos reservatórios, incluindo alguns recém construídos, este gênero já é dominante e atinge um número de células muito acima dos limites máximos aceitáveis, cujo risco para a saúde humana não pode ser desprezado.

Diante deste contexto é importante considerar que a atividade de vigilância da qualidade da água para consumo humano envolve uma série de cuidados, desde a avaliação do grau de risco que os sistemas representam à saúde pública em função da origem da água, do tratamento empregado e dos procedimentos adotados em todo o processo, até a verificação de queixas e denúncias realizadas por consumidores em relação à qualidade da água fornecida. Assim o potencial de risco apresentado pela água consumida pela população deve ser avaliado criteriosamente e desencadear medidas corretivas e preventivas para que o sistema recupere ou mantenha as condições de segurança (CORAL, 2009).

4.7 Aspectos da Legislação

Em decorrência da proliferação crescente de cianobactérias tóxicas em corpos d'água utilizados para o abastecimento público, como é o caso da Lagoa do Peri, as autoridades sanitárias do país revisaram a Portaria 36/MS/1990, dando origem a Portaria 1469/MS/2000. Assim, todos os órgãos produtores de água no Brasil, passaram a ter alguns novos parâmetros de controle de qualidade da água potável. Dentre esses parâmetros, a análise de cianobactérias e das toxinas produzidas por algumas espécies, passaria a ser obrigatória, três anos a partir da edição da citada lei. Mais tarde, esta foi substituída pela Portaria 518/MS/2004, estabelecendo assim os atuais os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Segundo a Portaria 518/MS/2004, o monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, é baseado na contagem do número de células, e vários dos seus artigos

estão relacionados à presença de *C.raciborskii* em água utilizada para abastecimento público. Esta portaria alerta para que sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder 20.000 células/ml ($2\text{mm}^3/\text{L}$ de biovolume), durante o monitoramento, será exigida a análise semanal de cianotoxinas na água na 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. Além disso, o monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/ml (ou $1\text{mm}^3/\text{L}$ de biovolume), e semanal, quando o número de células exceder este valor. Recomenda ainda, que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de cilindropermopsina e saxitoxinas (STX), observando, respectivamente, os valores limites de 15,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 3,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ de equivalentes STX/L.

4.8 Toxicologia

Segundo Chasin e Azevedo (2003), a Toxicologia é a ciência que tem por objetivo estudar os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, tanto no plano analítico, como do ponto de vista fisiológico e bioquímico. A Toxicologia Ambiental e a Ecotoxicologia são termos que os autores têm empregado para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas liberadas no ambiente. Dentro desta perspectiva, alguns termos usados em toxicologia devem ser compreendidos:

-Agente Tóxico, Toxicante ou Xenobiótico é uma substância, de estrutura química definida, que interagindo com um organismo, produz um efeito nocivo. Pode estar nas seguintes formas físicas: sólida, líquida, gasosa (vapor, aerossol);

-Toxicidade é a capacidade ou propriedade potencial que as substâncias químicas possuem, em maior ou menor grau, de produzirem efeitos nocivos ao interagirem com um organismo. É influenciada por diversos fatores relacionados ao próprio agente

químico (solubilidade, volatilidade), ao organismo (fatores genéticos, idade, sexo, estado nutricional), ao ambiente (temperatura, pressão), e à exposição (dose, via de administração, tempo e frequência de exposição);

-Intoxicação é o desequilíbrio orgânico manifestado por sinais e sintomas, causado pela interação do sistema biológico com o intoxicante;

Sendo assim, a avaliação toxicológica envolve a determinação da toxicidade de uma substância química, geralmente em uma variedade de sistemas biológicos e sob diferentes condições de exposição e também uma estimativa da relação risco-segurança em uma exposição específica à substância química em humanos.

Em diversas ocasiões é possível que os efeitos de substâncias químicas observados em animais de laboratório ocorram também em humanos sob condições apropriadas. Por isso, estudos em animais têm se tornado a principal fonte de dados de toxicidade. As principais vantagens da utilização de animais de laboratório nestes estudos são:

- A possibilidade de empregar doses relativamente elevadas que induzirão sinais de toxicidade evidentes, que ajudarão a localizar com precisão o órgão alvo e efeito específico, os quais são examinados criticamente em animais tratados com doses mais baixas;

-A possibilidade de controlar as condições experimentais e determinar os efeitos da substância química através de uma maior variedade de determinações, incluindo estudos patológicos. No entanto, alguns fatores influenciam os dados experimentais e devem ser considerados:

-Características físico-químicas: pureza, estabilidade, outras propriedades como pH, solubilidade, tamanho de partícula, veículo, etc;

-Variáveis biológicas: espécie e linhagem, sexo, idade;

-Outros: dose, duração da exposição, via de administração, número de animais controles.

As substâncias nocivas influenciam os seres vivos de modo muito diferente, provocando assim as mais variadas reações. Para qualificar e quantificar os efeitos, localizar o local da intervenção ou

identificar os caminhos da ação de substâncias dentro de um organismo necessita-se, conforme o objetivo da investigação, escolher o procedimento e a configuração adequada de um sistema de teste (KNIE e LOPES, 2004).

Em geral, o princípio do método dos testes de toxicidade para avaliar os efeitos causados aos organismos testados, consiste na exposição destes à várias diluições da amostra a ser testada por um período determinado de tempo (NBR 12.713) (ABNT, 2003). Neste contexto, levando em consideração o tempo de exposição, os testes de toxicidade aquática podem ser classificados, segundo Knie e Lopes (2004) em testes de toxicidade aguda, testes crônicos e testes de curta duração ou subletais.

O tempo de exposição geralmente compreende 24-48h. Os efeitos avaliados são mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, no caso de invertebrados; e crescimento, no caso de algas. O resultado é expresso em Concentração Efetiva Mediana - CE50, ou seja, a concentração na qual 50% da população exposta resiste à amostra a qual foi exposta no período de tempo determinado.

Convém notar que às vezes uma exposição aguda pode não determinar um efeito crônico, e que um dos eventos da exposição crônica pode, por outro lado, determinar ou não efeitos agudos. Na exposição crônica, quando a taxa de absorção supera a de eliminação, o tóxico acumula-se no organismo até atingir um estado de equilíbrio responsável por efeitos específicos, ou até quando a eliminação for muito lenta, atingindo níveis de exposição aguda, com seus efeitos conseqüentes.

A exposição do organismo ao tóxico e conseqüente absorção podem ocorrer de várias maneiras, com variabilidade na ou eficiência sendo as vias: endovenosa, respiratória, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intradérmica, oral e tópica. Quer a exposição seja aguda ou crônica, uma das características da relação exposição-efeito tóxico, é a existência de proporcionalidade entre a dose e a resposta. A mensuração desta resposta, por métodos variados, permite avaliar o grau de toxicidade de uma substância.

4.9 Ecotoxicidade: Toxicidade aguda com *Daphnia magna*

O gênero *Daphnia* é um microcrustáceo que tem sido amplamente utilizado para a avaliação e monitoramento da

toxicidade aguda e crônica de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos e amostras de várias outras formulações. Espécies desse gênero, representativas de ambientes límnicos, desempenham um papel importante para a transferência de energia de um nível trófico a outro no ecossistema aquático. Facilmente cultivadas em laboratório, elas têm se demonstrado bastante sensíveis a diferentes grupos de compostos químicos.

Segundo Ruppert e Barnes (1996), o organismo teste *D.magna* é classificado taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera. Mede de 5 a 6 mm de comprimento, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga d'água, têm larga distribuição no hemisfério norte e ocupam uma importante posição nas cadeias alimentares aquáticas (NBR 12.713, 2003a).

Este organismo foi selecionado como organismo-teste para esta pesquisa por ser amplamente conhecido, facilmente cultivado e mantido em laboratório e por ter reprodução freqüente, o que garante o suprimento para testes constantes. Necessita-se de pequena infraestrutura, os custos para manutenção são relativamente baixos se comparados à outros tipos de organismos e as respostas aos agentes ambientais são rápidas, devido ao seu ciclo de vida.

Cabe também lembrar que o monitoramento usual realizado através de parâmetros físicos e químicos, ao ser complementado pelo monitoramento de caráter ecotoxicológico, permite avaliar amplamente corpos d'água complexos, uma vez que o resultado do teste ecotoxicológico baseia-se na resposta da biota ao conjunto de substâncias que compõem o meio aquático (BRENTANO e LOBO, 2003).

4.10 Considerações sobre genotoxicidade

Funcionalmente, os agentes genotóxicos possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Dessa forma, as medidas de genotoxicidade incluem principalmente danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas. Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes

químicos ou físicos (TICE *et al.*, 2000), podendo ser avaliadas pelos seguintes ensaios: teste de Ames, teste do micronúcleo, ensaio do cometa, entre outros.

4.10.1 Teste de Mutagenicidade: Ensaio de Micronúcleo

O teste do micronúcleo tem sido amplamente utilizado para ensaios laboratoriais de genotoxicidade de muito compostos e para pesquisas *in situ* visando avaliar o risco de ambientes contaminados com potencial mutagênico (CHAUDHARY, 2006). O estudo do micronúcleo se constitui em um dos métodos para a medida de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, ou ainda de erros de segregação, uma vez que o micronúcleo resulta da produção de fragmentos acêntricos, ou de cromossomos inteiros que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula em anáfase. No processo de divisão celular, quando a célula entra em telófase, tanto fragmentos acêntricos como cromossomos com quebras cromossômicas ou cromatídicas, ou ainda, cromossomos inteiros perdidos por problemas no fuso mitótico, são incluídos nas células filhas, podendo se fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais núcleos secundários: os micronúcleos (HEDLLE *et al.*, 1983 *apud* CARVALHO PINTO-SILVA, 2005). O autor afirma ainda que existem 4 mecanismos reconhecidos que podem dar origem ao micronúcleo e estruturas semelhantes como: 1) perda mitótica de fragmentos acêntricos, 2) uma variedade de conseqüências mecânicas de quebras e trocas cromossômicas, 3) perda mitótica de cromossomos inteiros e por fim, 4) apoptose, que é uma forma de destruição nuclear em que o núcleo se desintegra e fragmentos celulares são formados. O fenômeno da apoptose ocorre naturalmente ou em resposta a danos celulares quimicamente induzidos, sendo que estes danos não necessitam ser de natureza genética.

O teste consiste basicamente na exposição dos organismos ao material testado, no preparo de lâminas com o material biológico e na avaliação das alterações causadas às células em microscópio. Esta última etapa consiste na contagem dos micronúcleos (e de má formações nucleares) presentes em 1000 células binucleadas por organismo testado, considerando teste realizado com cultura celular e utilizando-se no a citocalasina (FENECH, 2000). Para os testes com animais a contagem é realizada 2000 células mononucleadas.

A presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas, em algum momento do ciclo de vida das células (CARRANO e NATARAJAN, 2002). Assim, este teste tem sido amplamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* e *in situ*, com a vantagem de ser simples e rápido na detecção de danos cromossômicos induzidos. Além disso é bem aceito por várias autoridades regulamentatórias, incluindo o Guia de Substâncias Químicas Testadas para Mutagenicidade - Grã -Bretanha (1981) e é recomendado pela CSGMT- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1995). Outra vantagem dos micronúcleos é que podem ser observados em quase todos os tipos de células e a maioria pode ser empregada no estudo com humanos e animais de laboratório.

O número de ensaios de mutagenicidade/genotoxicidade em águas superficiais citados em 128 publicações científicas do período entre 1990 a 2004 mostrou que 17% destes consistiam no ensaio do micronúcleo *in vivo* e/ou *in vitro* (OHE *et al.*, 2004). Considerado uma excelente ferramenta para avaliar a genotoxicidade de diversas substâncias em água (BARDIENE, 2005; GRISOLIA *et al.*, 2009), o ensaio do micronúcleo tem sido utilizado na avaliação toxicológica de diferentes pesquisas ambientais: estudo de tratamento de efluentes utilizando plantas (MIELLI, 2008), no biomonitoramento de áreas sob influência de petróleo aplicando o teste em peixes e em cultura celular humana (LEMONS, 2008), em estudos envolvendo a presença de cianotoxinas na água como a cylindrospermopsina (SAKER, 1999; HUMPAGE *et al.*, 2000) entre outros.

No caso da aplicação *in vivo*, os organismos utilizados em testes de mutagênese tem que ser selecionados através de critérios que permitam uma avaliação realista do potencial mutagênico de uma amostra. Organismos aquáticos como os peixes são indicados para testes envolvendo o meio aquático pois estes podem acumular substâncias obtendo-as diretamente da água contaminada ou indiretamente através da ingestão de organismos aquáticos contaminados ou dos próprios produtores destas toxinas (algas) (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Em geral os cromossomos de peixes e outros organismos aquáticos são relativamente pequenos em tamanho e/ou em número elevado. No entanto estas características não afetam a desempenho do ensaio do micronúcleo na análise de aberrações cromossômicas podendo ser facilmente aplicado a peixes ou outros organismos aquáticos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

4.10.2 Teste de Genotoxicidade: Ensaio do cometa

O Ensaio Cometa ou *Single Cell Gel (SCG) Assay* é utilizado amplamente na genética médica, genética toxicológica ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações. O ensaio consiste em um método de eletroforese em microgel rápido e eficiente quando usada para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA em células individuais, usando microscopia (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN; 1995).

Essa metodologia de ensaio genotóxico apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente precisam estar em fase de divisão. As células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, para então serem transferidas para uma solução com altas concentrações de sais e detergentes, afim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente as lâminas são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste empregado. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundárias e terciárias presentes no núcleo celular. São então submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. São coradas através do emprego de substâncias capazes de associar ao DNA, como agentes intercalantes (p.e. brometo de etídio) ou redutores (p.e. nitrato de prata). Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples.

Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, crosslinks, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (SILVA, 2007).

A análise teste do cometa é efetuada em microscópio de fluorescência com filtros adequados, onde é avaliado o comprimento

da imagem do cometa (cabeça + cauda), e este comprimento vai indicar a magnitude de dano ocorrido. A classificação é feita de forma visual enquadrando o dano em uma das classes descritas a seguir:

- Classe 0: ausência de cauda, sem danos
- Classe 1: cauda pequena, pequeno dano,
- Classe 2: Cauda média, médio dano;
- Classe 3: cauda maior que o diâmetro da cabeça, grande dano;
- Classe 4: Cauda muito extensa com cabeça muito pequena, grande dano.

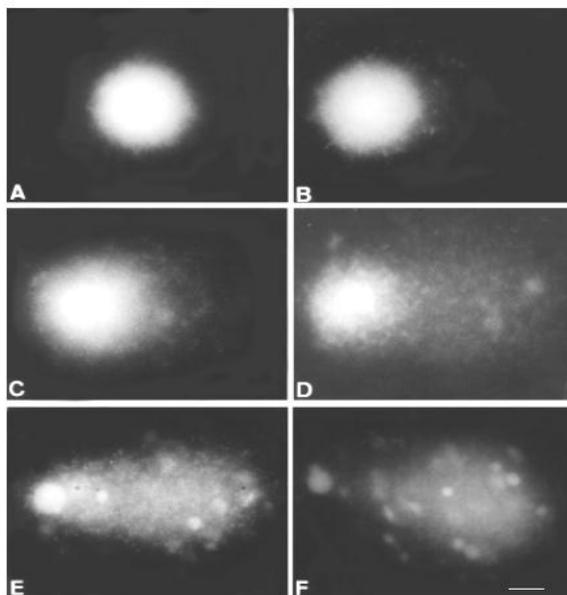


Figura 4.9: Teste do cometa: A) Classe 0; B)Classe 1; C)Classe 2; D)Classe 3; E)Classe 4; F) Célula em apoptose (SILVA *et al.*, 2000).

Há algumas investigações comparativas entre o teste do micronúcleo e o teste do cometa com o objetivo de se determinar qual é o mais adequado para o monitoramento em organismos aquáticos, porém estes estudos muitas vezes são realizados sob condições determinadas em um determinado organismo ou um tecido, utilizando um determinado agente mutagênico sendo assim,

específico para cada caso (SILVA, 2009). Deve-se considerar também que em alguns casos é possível obter respostas positivas para um destes dois testes e negativa para outro, sendo então testes considerados complementares na análise global do mecanismo de ação tóxica de uma substância.

O Quadro 4.2 a seguir ilustra as principais diferenças entre as técnicas do micronúcleo e do cometa, duas técnicas consideradas complementares na avaliação do dano genotóxico:

Parâmetros Teste do Micronúcleo Teste do cometa		
Tipo de alteração	Mutação cromossômica	Dano no DNA
Reparo	Não reparável	Reparável
Divisão celular	Necessária	Não necessária
Tempo de exposição	Mediano/longo (dias/meses)	Curto/mediano (min/horas)

Quadro 4.2: Comparação entre as técnicas de micronúcleo e cometa
Fonte: Melegari, 2008.

4.11 Considerações sobre Citotoxicidade

O primeiro efeito citotóxico que pode ser identificado através de uma avaliação microscópica das alterações morfológicas ocorridas na monocamada de células se traduz pela desorganização do tapete celular, pelo aspecto granuloso, arredondado e/ou vacuolizado das células. Por conseguinte, os ensaios freqüentemente utilizados para avaliar a citotoxicidade baseiam-se nas alterações da permeabilidade celular (ex. uso de corantes vitais, tais como azul de tripan, preto de naftaleno, eosina, entre outros), nas funções mitocondriais (ex: ensaio do MTT, XTT, entre outros) e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular (ex: ensaios de proliferação celular, ensaios clonogênicos, entre outros). Esses ensaios já estão estabelecidos para muitos tipos de células e avaliam diferentes aspectos das funções celulares. Tem sido

utilizados na avaliação dos efeitos causados por cianobactérias produtoras de toxinas, incluindo a *C.raciborskii* (FASTNER *et al.*, 2003).

4.11.1 Teste do MTT

Um dos mais utilizados métodos para medida da citotoxicidade *in vitro* é também uma das mais rápidas e sensíveis formas de se obter uma estimativa da proliferação e da viabilidade celular: a redução metabólica dos sais de tetrazólium (MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide) à uma substância denominada formazan. A succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, é capaz de transformar o MTT que é de cor amarela e solúvel em cristais de formazan que são de cor púrpura e insolúveis. Assim, o número de células sobreviventes é diretamente proporcional ao nível de formazan gerado que com o auxílio de um detergente induz a liberação dos cristais que estão solubilizados. Desta forma os sais de tetrazólium são especialmente utilizados para ensaios de quantificação da viabilidade celular devido à possibilidade de mensurar, por espectrofotometria, a mudança de coloração da cultura, o que indica a quantidade de células viáveis. Este ensaio apresenta-se mais rápido, seguro e com alto grau de precisão quando comparado a outros métodos colorimétricos ou outras técnicas como as radioativas (ensaio que consiste na capacidade das células de incorporar substâncias radioativas ou na capacidade liberar um marcador radioativo).

Outra particularidade e vantagem deste ensaio, é o fato de que apenas as células viáveis são consideradas. Apresenta-se como um ensaio muito versátil, considerado como um avanço sobre as tradicionais técnicas de ensaios de citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Ente os ensaios o Teste do MTT se destaca e tem disso utilizado pela comunidade científica no desenvolvimento das mais diversas linhas de estudo, desde células expostas à substâncias químicas (FOTAKIS E TIMBRELL, 2006), estudo dos efeitos causados por benzeno às células de pulmão humano (GIULIANO *et al.*, 2009), estudo da viabilidade de esperma bovino (AZIZ, 2006), efeito de toxinas sintetizadas por fungos (BOUAZIZ *et al.*, 2006) por exemplo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas das amostras da água da Lagoa do Peri ocorreram no ano de 2009 e 2010. O processamento das amostras e a realização dos testes ocorreram nas dependências do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Durante todo o período da pesquisa e inclusive simultaneamente aos testes, outras atividades de rotina foram realizadas como o preparo de soluções e a manutenção constante da cultura celular.

5.1 Coleta, preservação e processamento das amostras da Lagoa do Peri

As coletas foram realizadas dentro dos limites do Parque Municipal da Lagoa do Peri, na área de captação da água da ETA da CASAN. Grellmann (2006) destaca que este ponto é caracterizado como um ambiente raso, com influência da margem antrópica, devido à proximidade com a sede do Parque Municipal da Lagoa do Peri, em que se verifica um elevado fluxo de pessoas, por este ser um ambiente recreativo, e maior taxa de renovação da água, uma vez que corresponde ao ponto de deságue da Lagoa. As coletas foram realizadas neste local considerando-se a exigência do monitoramento da água bruta nos sistemas de tratamento de água no ponto de captação. As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam a área do Parque, sua situação geográfica em Florianópolis e no Brasil, bem como a localização do ponto de coleta:

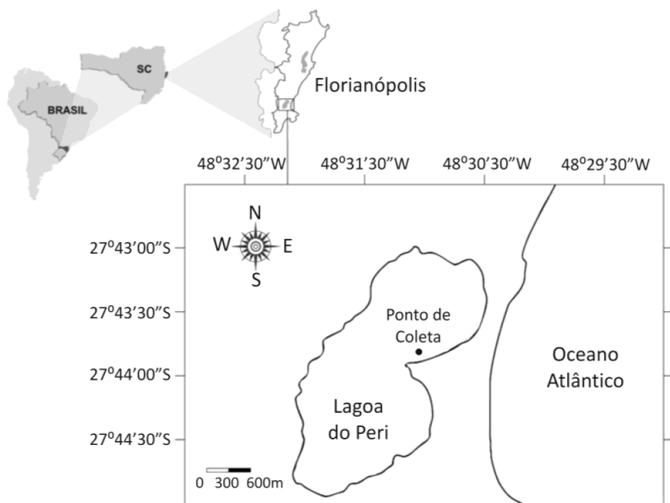


Figura 5.1: Localização geográfica do Parque Municipal da Lagoa do Peri: Brasil. Fonte: Martins *et al.*;2009.



Figura 5.2: Localização do ponto de coleta das amostras (Google Earth)

As amostras foram coletadas nas seguintes datas: 20/5/2009, 26/5/2009, 01/06/09, 16/9/2009, 17/11/2009, 15/12/2009, 26/6/2010, 25/08/2010, 16/09/2010.

Foram coletados volumes diferentes de amostra variando de 2 a 20 L, dependendo do teste que seria realizado a cada coleta, sendo que as amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno com volumes de 200 mL, 1,5 L e 5 L. Para as análises quantitativa das *C.raciborskii* presentes na Lagoa por exemplo, foram reservadas alíquotas de 500 ml de amostra. Os demais volumes foram processados conforme a necessidade de cada teste, adquirindo assim uma identificação e possibilitando diferentes análises posteriores, considerando as hipóteses apresentadas no Quadro 5.1:

Nome	Processamento	Objetivo
LP Bruta	Utilização imediata em temperatura ambiente	Análise da água contendo <i>C. raciborskii</i> e toxinas dispersas na água
LP Filtrada	Filtração utilizando filtro 25µm	Análise da água livre de células de <i>C. raciborskii</i> e com possibilidade de toxinas dispersas na água
LP Congelada	Congelamento/descongelamento sequência de 3 processos repetidos.	Análise da água após rompimento das células de <i>C. raciborskii</i> e com possibilidade de toxinas dispersas na água
LP Congelada/ Filtrada	Congelamento/descongelamento, numa sequência de 3 processos repetidos seguido de filtração com filtro 25µm;	Análise da água após rompimento das células de <i>C. raciborskii</i> , livre das células e com possibilidade de toxinas dispersas na água

Quadro 5.1: Processamento das amostras utilizadas nos testes.

LP = Lagoa do Peri

Além das amostras provenientes da Lagoa do Peri, foram realizados também alguns testes com uma cepa T3 como comparativo, pois segundo estudos realizados por Coral (2009) e por Mondardo (2009) utilizando técnicas de detecção por HPLC, esta cepa é produtora de toxinas e poderá balizar a confiabilidade dos métodos aplicados e dos resultados obtidos.

As células de *C.raciborskii*, cepa T3 utilizadas neste trabalho possuem média de 20 células para filamentos mais longos e

8 células para filamentos mais curtos (CORAL, 2009). Foram cultivadas no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) da UFSC sendo inicialmente adquirida no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade do Rio de Janeiro (UFRJ) e fornecida pelo Laboratório de Ficologia e Laboratório de Potabilização de Águas da UFSC que através de um cultivo permanente a utiliza em suas pesquisas. O processamento destas amostras seguiram o mesmo que foi descrito para a água da Lagoa do Peri assim como a denominação padrão, sendo consideradas: T3 Bruta, T3 Filtrada, T3 Congelada e T3 Congelada/Filtrada.

De um modo geral, após a coleta e tratamento das amostras, foram realizados os seguintes ensaios conforme apresenta a Figura 5.3:

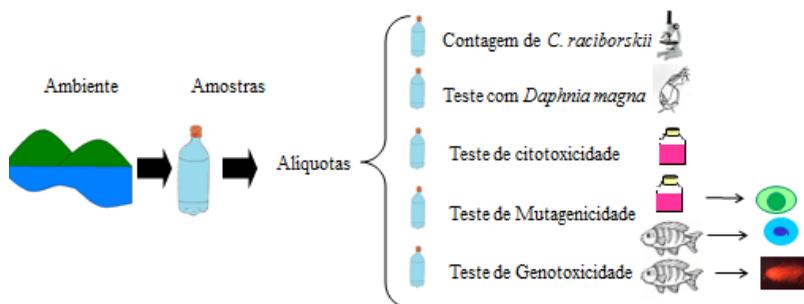


Figura 5.3: Esquema geral dos ensaios realizados

5.2 Quantificação da Cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*

A identificação e contagem dos exemplares de *C. raciborskii* presentes nas amostras foi realizada logo após a coleta, ao chegar ao LABTOX. Após homogeneização, uma alíquota de 1ml de amostra foi fixada com lugol e depositada em uma câmara de contagem (Sedgwick-Rafter) permanecendo em descanso para sedimentação por cerca de 2h. A contagem foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico Bioval XDS-1 (aumento de 250x) segundo as recomendações do Standard Methods (APHA, AWWA, WPCF, 2005). Pelo menos 100 indivíduos da espécie de interesse devem ser contados em cada amostra para que se tenha erro < 20% (LUND *et al.*, 1958).

O número de filamentos por ml é dado pela fórmula:

$$\text{No/ml} = \frac{\text{NO} \times 1000 \text{ mm}^3}{\text{C} \times \text{P} \times \text{L} \times \text{NF}}$$

Sendo que:

NO = Número de organismos contados

C = Comprimento da faixa contada

P = Profundidade da faixa contada

L = Largura da faixa contada

NF = Número de faixas contadas

5.3. Cultivo de *Daphnia magna*

Desde 1996 o LABTOX tem o cultivo de *D. magna* (Figura 5.4) como rotina de trabalho. A metodologia de cultivo do organismo teste *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) segue o descrito na NBR 12.713 (2003).



Figura 5.4 : *D. magna* cultivada pelo LABTOX (0,5 cm). Fonte: Moser, 2007

O método de cultivo objetiva a manutenção do organismo teste em laboratório, sob condições que permitam a avaliação da toxicidade de amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e substâncias químicas solúveis ou

dispersas em água. Para crescimento dos organismos foram utilizados recipientes com capacidade para 500mL de meio de cultura M4 (DIN 38412, 1989).

Os organismos foram alimentados diariamente com cultura algácea de *Scenedesmus subspicatus*, produzida pelo próprio laboratório conforme ISO 8692 (1986). Cada lote de Daphnias comportou de 15 a 20 indivíduos, exclusivamente fêmeas. As fêmeas se reproduzem por partenogênese, o que garantiu que os indivíduos fossem clones uns dos outros. As culturas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e em fotoperíodo de 16 horas de luz, condições obtidas através do uso de um germinador.

Os lotes receberam manutenção três vezes por semana, havendo troca do meio de cultura, eliminação dos restos de carapaças e retirada dos filhotes. A sensibilidade do organismo teste é avaliada através de ensaios com a substância de referência dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), realizado conforme a metodologia descrita segundo a ISO 6341 (1996), visando assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados.

5.4 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* ocorreram com as amostras coletadas nas seguintes datas: 25/08/2010 e 16/09/2010. Para a realização dos testes foram utilizados organismos cultivados pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental e a metodologia do teste seguiu o descrito na NBR 12.713 (2003).

Foram realizados testes de toxicidade aguda de 48 horas baseando-se na exposição de neonatos de *D. magna*, de 2 a 26 horas de idade, em diluições da amostra preparadas com precisão volumétrica, em progressão geométrica de razão 2. Para o grupo controle negativo, utilizou-se água de diluição (meio ISO), descrito na norma ISO 6341 (ISO, 1996). Cada diluição foi colocada em 2 béqueres de 25ml, sendo testados 20 organismos por diluição com exposição de 10 exemplares do organismo *D. magna* em cada béquer (Figura 5.5). Os frascos foram cobertos com filme de policloreto de vinila (PVC) e mantidos em uma germinadora de testes com controle de temperatura entre 18°C e 22°C , sem alimentação ou iluminação.

Após o tempo de exposição (48 horas) observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração e a partir destes dados, calculou-se a porcentagem de imobilidade por concentração. O resultado do teste é expresso em Concentração Efetiva Inicial Mediana - CE(I)50 48h (CE50), que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio, que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos expostos em 48 horas, nas condições de teste. Para o cálculo da CE50 utilizou-se o programa estatístico Sperman-Karber Method.

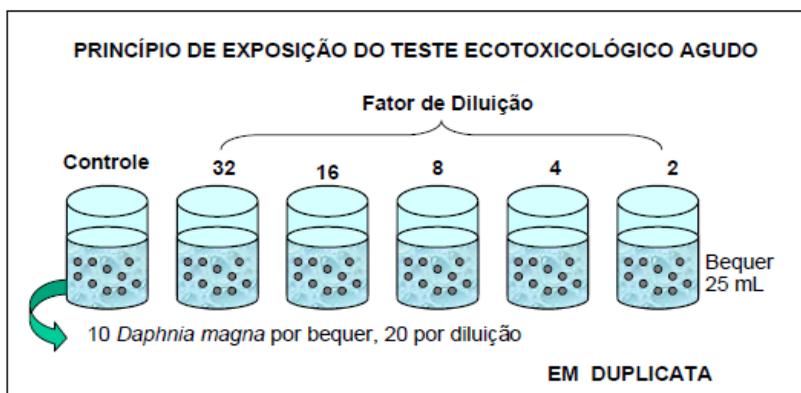


Figura 5.5: Esquema do teste de toxicidade aguda com *D.magna*.

Fonte: Brentano, 2006.

5.5 Manutenção e Intoxicação dos peixes

Espécies aquáticas são mais utilizadas na genética ecotoxicológica do que as terrestres e microbiológicas: poucos são os estudos que utilizaram organismos terrestres ou pássaros. Isso pode ser explicado pela própria natureza do agente químico, sendo a maioria dos compostos genotóxicos lipofílica, os quais no ambiente aquático se acumulam na fração biótica, facilitando o monitoramento de espécies aquáticas (SILVA, 2009). Os estudos sobre ensaios de genotoxicidade utilizando peixes, indicam que estes podem ser utilizados para o estabelecimento de um modelo adequado de monitoramento de genotoxicidade de ambientes aquáticos e da qualidade das águas devido a sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes (CHAUDHARY *et*

al.; 2006). Desta forma foram utilizados exemplares de *Geophagus brasiliensis* (Figura 5.6) para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade desenvolvidos neste estudo.



Figura 5.6: *Geophagus brasiliensis* (LABTOX)

Os exemplares utilizados nos testes foram oriundos uma lagoa de criação localizada na cidade de Pomerode -SC, sendo transportados para o LABTOX, onde foram mantidos em aclimatação por no mínimo 10 dias, até a execução dos testes. A aclimatação se deu em tanques de água natural desclorada e mantidos com aeração constante, pH entre 6,5 a 7,5 e temperatura controlada (cerca de 25°C), sendo alimentados com ração granular específica para peixes de água doce. Para os experimentos com peixes in vivo, as substâncias teste devem ser injetadas nos peixes ou misturadas à água ou aos alimentos (COTELLE e FERRARD, 1999). Para a realização dos testes propostos os peixes foram colocados em aquários com volume de 2,5L de amostra disponível por peixe, mantidos sob aeração constante e sem alimentação durante as 48h de exposição (Figura 5.7).

O controle negativo se deu com a exposição dos peixes a água de torneira desclorada (a mesma que era utilizada para a aclimatação).



Figura 5.7: Aquários de intoxicação dos peixes

5.6 Teste de Mutagenicidade: Ensaio do Micronúcleo utilizando peixes

Os testes de do micronúcleo com peixes foram realizados com as amostras coletadas em 17/11/2009 nas formas: LP Bruta, LP Filtrada e LP Gelo. O controle positivo foi realizado com a intoxicação de peixes em solução de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 2,5 ml/L, de acordo com Lemos *et al.* (2007). O teste foi realizado em triplicata, submetendo 3 peixes a cada amostra.

O material citológico de cada peixe também foi analisado em triplicata, ou seja, lâminas por peixe. A preparação citológica do material proveniente dos peixes deu-se da seguinte forma: foi retirado, com o auxílio de uma seringa contendo anticoagulante (heparina), o sangue da espinha dorsal dos peixes para a seguir ser realizado um esfregaço do sangue em lâminas de microscopia. Os esfregaços foram fixados em metanol (PA) por 20 minutos, para depois secos em temperatura ambiente (Figura 5.8). Logo após esta etapa, as lâminas foram coradas pelo método Feulgen-Fast-Green .

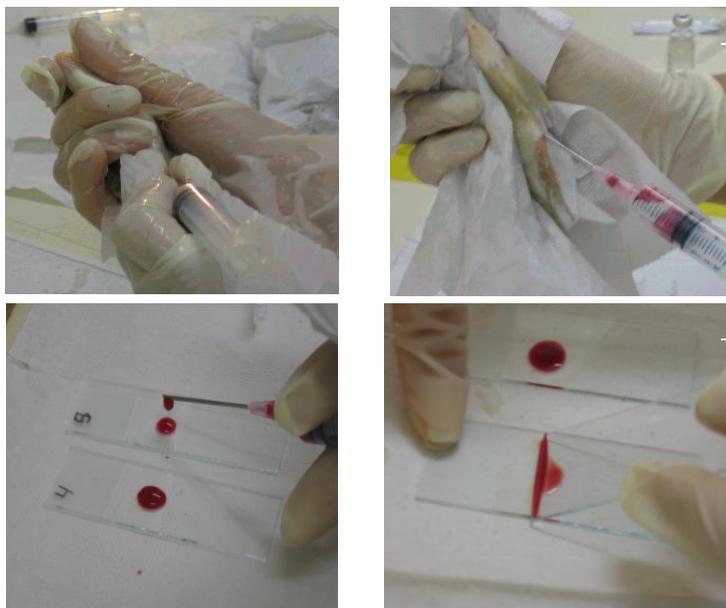


Figura 5.8: Preparação citológica (Retirada do material sanguíneo dos peixes e esfregaço em lâminas). Fonte: Moser, 2007

A análise citogenética foi realizada utilizando um microscópio óptico (Olympus BX40) para a leitura. Partículas com uma cor e estrutura semelhante à cromatina, sem brilho ou refração, ao lado do núcleo principal mas sem tocá-lo e sem existência de ponte ligando-os, foram interpretados como micronúcleos. Foram considerados também segundo os critérios de Fenech (2003), as anormalidades nucleares (NA) encontradas em células binucleadas como a formação de pontes nucleoplásmicas e de gemas nucleares. Somente células íntegras foram consideradas para a análise, ou seja, com membrana celular e nuclear intactas. Além disso, para determinar a frequência da ocorrência de micronúcleos (MN) foram analisadas em teste cego, 2000 células mononucleadas por lâmina. Este consiste na recodificação das lâminas para que o examinador não tenha conhecimento da origem do material analisado e assim se evite a indução na leitura dos resultados.

5.7 Teste de Genotoxicidade: Ensaio do cometa utilizando peixes

O teste de cometa com peixes foi realizado com as amostras coletadas em 15/12/2009 nas formas: LP Congelada/Filtrada e T3 sendo que o ensaio foi realizado em triplicata, submetendo 3 peixes por amostra. O material citológico de cada um deles foi analisado em no mínimo 2 lâminas.

Foi utilizada a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988) e as considerações de Tice *et al.* (2000), com adaptações, observando também as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*.

A preparação citológica do material proveniente dos peixes deu-se de forma semelhante à metodologia do ensaio do micronúcleo na primeira parte: extração de 5 ml de sangue da espinha dorsal dos peixes, com o auxílio de uma seringa contendo 100µl de anticoagulante (heparina).

Todo o procedimento a seguir foi realizado em ambiente com pouca luz para evitar que esta pudesse causar danos ao DNA. As amostras de sangue (5 µl) foram então misturadas a 120µl de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) mantida a 37C. Após homogeneização, 120µl da mistura foram depositados sob lâmina pré-preparada com camada de agarose de ponto de fusão normal (Sigma). Colocou-se uma lamínula sob o material mantendo em geladeira por aproximadamente 5 min até que a camada de agarose endurecesse para que a lamínula pudesse ser retirada. Em seguida as lâminas foram mergulhadas em solução de lise celular gelada recentemente preparada e protegida da luz (Cloreto de sódio 2,5M, EDTA dissódico 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X-100, DMSO e água desionizada). O desenrolamento e eletroforese do DNA se deu em uma cuba para eletroforese (Horizon GIBCO) preenchida com solução tampão (Hidróxido de Sódio 10 N, ETA dissódico 200 mM e água desionizada) previamente resfriada em geladeira. As lâminas foram colocadas sob o suporte da cuba e mergulhadas na solução permanecendo por 30 minutos para o desenrolamento do DNA. Em seguida a cuba foi ligada por cerca de 30 minutos para a corrida com ajuste da fonte em cerca de 25V e corrente de 300 mA. Após o término da corrida as lâminas foram retiradas e receberam por 3 vezes com intervalos de 5 minutos uma solução de neutralização

(Tris 0,4M e água desionizada) para serem coradas com solução de Brometo de Etídio a 20 µ g/ml.

A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX40 em aumento de 400x com auxílio de filtro de excitação de 515 a 560 nm (verde), sendo selecionadas 50 células por lâmina e classificando a migração do DNA em 5 diferentes classes, de 0 a 4, atribuindo scores com valor correspondente em uma escala de 0 a 4 também.

O controle positivo foi realizado submetendo amostras de sangue de peixes do controle negativo a 200µM de uma solução de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 30% (MACHADO, 2005) durante 2h em estufa com temperatura e umidade controlada, antes da confecção das lâminas para teste (COURA, 2004).

5.8 Cultura Celular

As linhagens de célula VERO são fibroblastos provenientes dos rins de Macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e são suscetíveis a uma grande variedade de vírus, o que possibilitou que fossem utilizadas para a produção industrial de vacinas virais. Podem ser cultivadas em laboratório crescendo em sistema de monocamadas e em abundância (DOYLE e GRIFFITHS, 1998).

A cultura celular se deu com linhagens de células VERO fornecidas pelo Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC.

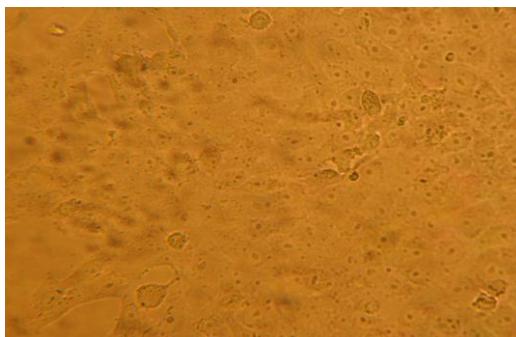


Figura 5.9: Cultura de células VERO

Estas foram cultivadas em garrafas descartáveis para cultura celular com volumes de 25 cm² e de 75 cm² (TPP) em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 5 % de soro bovino fetal (Cultilab/Gibco), 1 % de L-Glutamina (Amresco) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina- Invitrogen). A cultura foi mantida em incubadora exclusiva (Ultrasafe HF 212 UV) com atmosfera úmida a 5 % de CO₂ e temperatura de 37°C. A repicagem de manutenção foi realizada a cada 48 horas.

5.8.1 Teste do Micronúcleo utilizando cultura celular

Os testes do micronúcleo com células foram realizados com as amostras coletadas em 16/09/2009, na versão LP Filtrada, LP Filtrada/Congelada, T3 Filtrada e T3 Filtrada/Congelada.

Para a realização dos testes, uma suspensão celular contendo 10⁵ células por ml foi colocada em microplacas com 6 poços e Incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após incubação, o meio foi retirado e os poços contaminados com o meio de cultivo em pó preparado com água da Lagoa a ser testada após procedimento de filtração em laboratório (filtro 25µm seguido de filtragem a 0,22µm), a fim de eliminar matéria orgânica e bactérias. Para o controle positivo foi utilizada Colchicina (Sigma) a 6µM. Após a incubação por 24h as células foram retiradas e parte da suspensão foi delicadamente colocada sobre as lâminas pré-coradas com Acridine Orange para então serem analisadas em microscópio.

A análise citogenética foi realizada da mesma forma que o teste utilizando peixes, ou seja, utilizando um microscópio óptico (Olympus BX40) para a leitura. Partículas com uma cor e estrutura semelhante à cromatina, sem brilho ou refração, ao lado do núcleo principal mas sem tocá-lo e sem ponte ligando-os foram interpretados como micronúcleos. Foram consideradas também, segundo os critérios de Fenech (2003) as anormalidades nucleares (NA) encontradas em células binucleadas como a formação de pontes nucleoplásmicas e de gemas nucleares. Somente células íntegras foram consideradas para a análise, ou seja, com membrana celular e nuclear intactas além disso, para determinar a frequência da ocorrência de micronúcleos (MN) foram analisadas em teste cego, 2000 células mononucleadas por lâmina.

5.8.2 Testes de Citotoxicidade: Teste do MTT

Os testes do MTT foram realizados com as amostras LP Filtrada com filtro de seringa a 0,22 μ .

Logo após descrito por Mosmann (1983), o método tem sofrido pequenas alterações e tem sido constantemente aperfeiçoado por diversos pesquisadores, inicialmente por Gerlier e Thomasset (1986) e Denizot e Lang (1986) visando maior sensibilidade. A técnica utilizada neste trabalho segue o descrito por Freshney (2005) com adaptações.

A suspensão celular foi transferida da garrafa de cultivo para placas com 96 poços e incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C e atmosfera úmida por 24h para que haja o crescimento do tapete celular. Em seguida foram intoxicadas através da aplicação de um preparado de meio de cultivo em pó (RPMI) utilizando amostra filtrada como água de diluição, sendo novamente incubada sob as mesmas condições e tempo. Logo após esta etapa, o meio líquido foi descartado e uma solução de meio RPMI com corante MTT 3-4,5-dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide (Fluka) a 50 mg/ml foi adicionada à cada poço mantendo as células em incubadora por 4 horas. Adicionou-se então 150 μ l de solução solvente (DMSO) em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram brevemente agitadas e a leitura da absorbância foi feita por um espectrofotômetro leitor de microplacas (Biotek Elx 800) ao comprimento de onda de 570nm. Com os valores obtidos na leitura é possível calcular a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%) utilizando-se o software Gen5.

O controle negativo consistiu no tratamento de alguns poços com meio de cultivo e para o controle positivo foi utilizado Metil metanosulfonato a 2mM.

A Figura 5.10 apresenta um esquema com as principais etapas deste experimento:

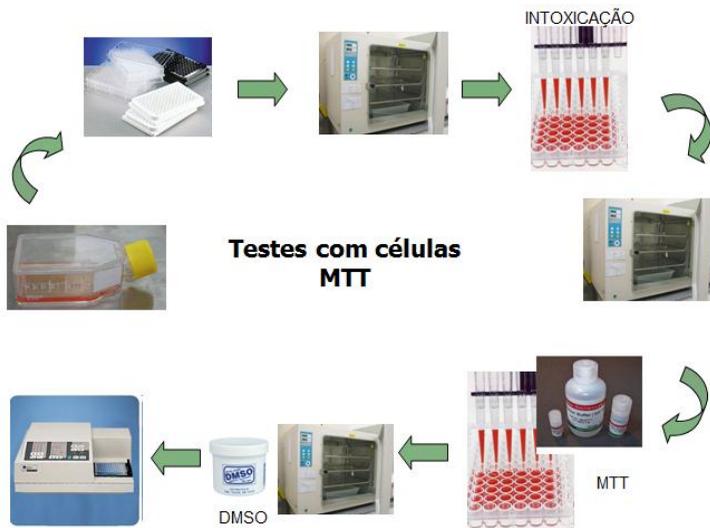


Figura 5.10 : Esquema do teste do MTT

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análises Quantitativas e Qualitativas de *C.raciborskii* na Lagoa do Peri

Os tricomas de *C. raciborskii* identificados nas análises qualitativas apresentam estruturas que permitem a fluvariabilidade denominadas aerótopos, não apresentaram acinetos e alguns exemplares continham heterocitos que são estruturas vegetativas de células modificadas que permite ao organismo a fixação de nitrogênio atmosférico quando da ausência deste no meio, sendo que a presença ou ausência desta estrutura pode ser considerada um indicativo da condição do ambiente.

Coral (2009) confirma estes resultados em seu trabalho, apresentando ainda um valor médio de 14 células para filamentos longos e 5 células para filamentos curtos de *C.raciborskii*. Os exemplares em sua maioria eram retos sendo alguns de forma espiralada (Figura 6.1) sendo as células das extremidades geralmente arredondadas, algumas vezes levemente afiladas. Bittencourt-Oliveira e Molica (2003) apontam que a ocorrência de cepas com exemplares espiralados é rara no Brasil, havendo registro de ocorrência frequente apenas no Nordeste do país. Quando ao procedimento de contagem, destaca-se que os fragmentos muito pequenos não foram considerados.



Figura 6.1: Exemplar de *C. raciborskii* encontrada nas amostras da Lagoa do Peri (MOSER)

Este trabalho não realizou a quantificação das cianotoxinas dispersas nas amostras, porém cabe ressaltar que Sens *et al.*, (2005),

Melo-Filho (2006), Mondardo (2009) entre outros, realizaram pesquisas em que foram detectados e quantificados os níveis de cianotoxinas dispersos no manancial a exemplo de Melegari (2008) que encontrou valores $< 3,0\mu\text{g/L}$ para a água da Lagoa do Peri após processo de ruptura celular por sonicacção (ultra-som), não encontrando valores para as amostras filtrada. A amostra foi coletada em 10/03/2008 e a quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FD) conforme Figura 6.2:

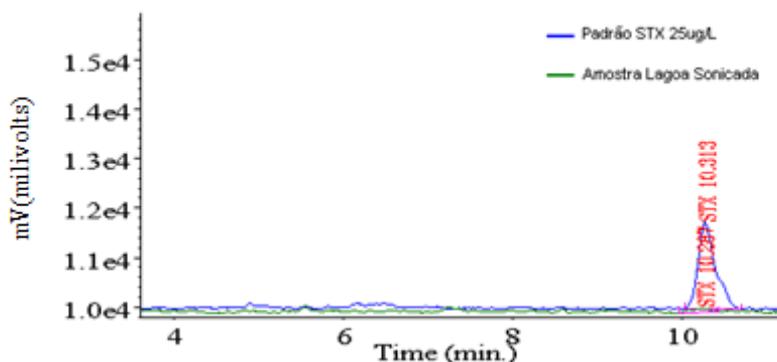


Figura 6.2: Cromatogramas sobrepostos do padrão da STX e da amostra de água da Lagoa do Peri sonicada.

Fonte: Melegari, 2008.

A Tabela 6.1 apresenta o resultado das análises quantitativas da *C. raciborskii* em algumas das coletas realizadas.

Tabela 6.1: Resultado das análises quantitativas de *C. raciborskii*

Data da coleta	Nº organismos por ml	Nº células por ml
20/5/2009	310.857	3.108.570
26/5/2009	152.375	1.523.750
01/06/009	318.111	3.181.110
16/9/2009	223.444	2.234.440
17/11/2009	199.700	1.997.000
26/6/2010	202.429	2.024.290

Nas análises qualitativas e quantitativas não foi realizada uma avaliação criteriosa das demais espécies presentes nas amostras, pois foram contados apenas os exemplares de *C.raciborskii*. No entanto, foi possível observar a presença de exemplares das espécies: *Limnothrix planctonica* e de *Planktolynghya sp* em maior quantidade, sendo que visualmente observou-se que *C.raciborskii* mostrou-se dominante em relação às demais cianobactérias presentes nas amostras coletadas.

A Figura 6.3 apresenta o perfil da densidade de fitoplâncton, cianobactérias e *C.raciborskii* na água bruta da Lagoa do Peri nos meses de fevereiro de 2005 a maio de 2008.

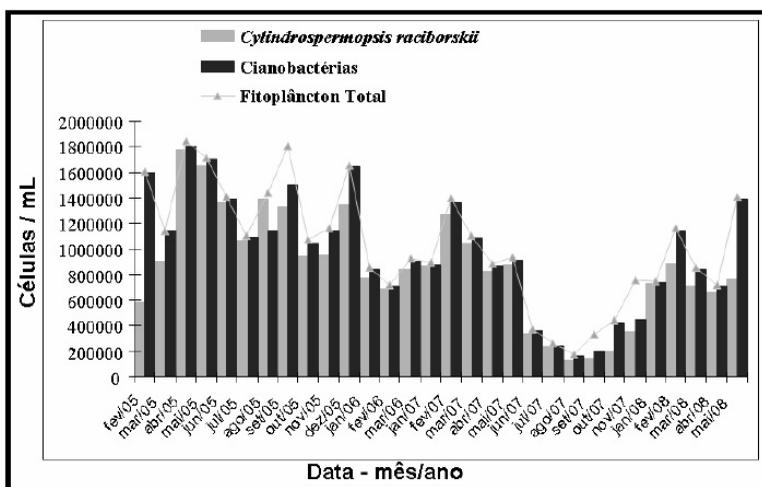


Figura 6.3: Perfil da densidade de fitoplâncton, cianobactérias e *C.raciborskii* na água bruta da Lagoa do Peri nos meses de fevereiro de 2005 a maio de 2008. Fonte: Mondardo, 2009

Alguns autores (LAUDARES-SILVA, 1999; MONDARDO, 2004; GRELLMANN, 2006) monitoraram a composição fitoplanctônica da Lagoa do Peri, manancial que abastece a costa Sul e Leste de Florianópolis durante diferentes ciclos anuais, e todos identificaram *C.raciborskii* como a espécie de cianobactéria mais importante, em função de sua constância e dominância em alguns meses e abundância nos demais. Sens *et al.* (2005) aponta a dominância desta espécie em 99% do número total

de cianobactérias e 97% do total do fitoplâncton do manancial. No entanto a dominância de *C. raciborskii* durante o ciclo anual na Lagoa do Peri configura-se como persistência e não como florações, uma vez que estas se caracterizam por serem eventos explosivos, autolimitantes e de curta duração (ACIESP, 1997). Grellmann (2006) constatou que no monitoramento de um ciclo anual esta espécie contribuiu com 45,05 a 85,35% da densidade total do fitoplâncton.

Os artigos da portaria 518/MS/2004 apontam que o monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/ml e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor. Analisando a Tabela 6.1 observa-se que em todas as contagens realizadas o número de células encontradas foi maior que 10.000 células/ml, o que exige um monitoramento semanal da água do manancial. Além disso, nota-se que com frequência, o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação ultrapassou o valor de 20.000 células/ml, devendo haver a análise semanal de cianotoxinas na água na saída do tratamento.

Assim como na Lagoa do Peri, um trabalho realizado em Lagoa Santa, um reservatório do Estado de Minas Gerais (FIGUEREDO *et al.*, 2007) mostra que *C. raciborskii* mantém florações durante todos os períodos do ano, fazendo com que as outras espécies fitoplanctônicas sejam menos abundantes neste corpo d'água também, sendo exceção a presença constante da cianobactéria, *Planktolyngbya sp.* Esta associação de *C. raciborskii* com membros da ordem Oscillatoriales foi anteriormente observada em uma série de lagos temperados europeus (MCGREGOR e FABBRO, 2000).

C. raciborskii tem sido relatada como formadora de blooms e assim parece diminuir a biodiversidade local, eliminando outras espécies do fitoplâncton (BOUVY *et al.*, 2001). A possibilidade de uma vantagem alelopática poderia ser utilizada para explicar a expansão geográfica da espécie, sendo que estudos comprovaram este mecanismo de ação sob a atividade fotossintética de diversas espécies fitoplanctônicas de Lagoa Santa, por exemplo (FIGUEREDO *et al.*, 2007).

Trabalho desenvolvido por Mohamed (2006) relata que os efeitos tóxicos causados pela *C. raciborskii* encontrada nos corpos d'água do Egito pode ter maior relação com os compostos totais

presentes nos extratos brutos desta alga do que somente na cilindrospermopsina, por exemplo. Neste contexto e considerando que o fenômeno da alelopatia consiste na liberação de produtos químicos / toxinas de plantas ou microorganismos, que afetam seus potenciais concorrentes para recursos (LAMPERT e SOMMER, 1997), cabe lembrar que estudos realizados para avaliar as condições que favorecem o surgimento de blooms de cianobactérias, a alelopatia ainda é bastante inexplorada, embora tenha já sido relatadas para algumas espécies de fitoplâncton. Considerando que os resultados apontados por Figueredo *et al.*, (2007) que sugerem que as interações alelopáticas podem ser consideradas um possível fator para explicar a estabilidade das florações de *C.raciborskii* na Lagoa Santa, cumpre registrar o questionamento: a dominância na Lagoa do Peri de *C.raciborskii* sob outras espécies por longos períodos de tempos, de forma até permanente, poderia estar associada à produção de substâncias alelopáticas? Investigações para a identificação de compostos não identificados neste trabalho e em outros já realizados, e que podem ser liberados ao meio por esta cianobactéria, podem abrir novas frentes de estudo e elucidar seu mecanismo de ação.

O trabalho mostra, portanto, que a simples contagem de organismos pode reforçar a importância de um controle apurado das técnicas de tratamento da água para que esta possa ser oferecida à população com controle dos potenciais riscos ambientais e à saúde pública.

6.2 Teste com *Daphnia magna*

Para garantir as condições dos testes adequadas aos organismos foram realizadas medidas dos índices de pH e de Oxigênio dissolvido das amostras testadas apresentando valores de OD de 6,5 a 8,8 e de pH de 6,23 a 8,3 ajustados para valores entre 7 a 7,5.

Os resultados obtidos com os testes de toxicidade aguda utilizando *D.magna* estão apresentados na Tabela 6.2. Foram expressos através do cálculo da CE50 e a quantidade de amostra (em %) responsável pela toxicidade da amostra. Para facilitar o entendimento dos resultados, deve-se lembrar que quanto menor a CE50 obtida em um teste, maior é a toxicidade da amostra testada,

pois até mesmo uma pequena quantidade de amostra é capaz de resultar na imobilidade de 50% dos organismos expostos.

Tabela 6.2: Valores de CE50

Lagoa do Peri - Amostra de água Bruta		
Teste	CE50 %	[%]Amostra
25/08/2010	Não definido	Não definido
16/09/2010	>100	Não tóxica

Para o teste do dia 25/08/2010 não foi possível determinar a CE50 pois os resultados observados nas diferentes diluições da amostra não apresentaram a configuração esperada e aceita pelo software que realiza este cálculo. No entanto foi apresentada toxicidade até a diluição de 8,33% da amostra.

Pereira dos Santos (2007), Moser (2007) e Cristiano (2009) encontraram valores semelhantes para a CE50 da amostra bruta, em testes realizados num período anterior ao estudado (Tabela 6.3), o que indica que os resultados apresentados estão de acordo com a série histórica:

Tabela 6.3: Valores de CE50 encontrado na bibliografia:

Lagoa do Peri - Amostra de água Bruta		
Teste	CE50 %	[%]Amostra
19/9/2006	24,8	Não registrada
17/10/2006	19,7	Não registrada
1/11/2006	>100	Não tóxica
06/11/06	76,7	33,33
04/12/06	>100	Não tóxica
11/12/06	21,59	16,66
06/02/07	8,33	12,5 ou <
13/02/07	6,2	6,25
07/03/07	6,97	6,25
30/03/07	4,6	4,16 ou <

17/04/07	2,84	3,12
12/05/08	8,54	Não registrada
19/05/08	18,84	Não registrada
26/05/08	18,68	Não registrada
16/06/08	<12,5	Não registrada
23/06/08	9,15	Não registrada
30/06/08	7,91	Não registrada
09/07/08	15,93	Não registrada

Fonte: Pereira dos Santos (2007), Moser (2007), Cristiano (2009)

A diferença entre os resultados apresentado provavelmente pode estar relacionada a uma grande variabilidade do grau de toxicidade que a amostra pode apresentar no decorrer do tempo, ora se apresentando com alta toxicidade, ora com baixa toxicidade, e até mesmo não tóxica.

Há diversas pesquisas que evidenciam a influência de culturas ou extratos de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas sobre microcrustáceos comumente utilizados em testes de toxicidade aguda, em especial o gênero *Daphnia* (GUO e XIE, 2006, SOTERO-SANTOS *et al.*, 2006). Pela exposição à saxitoxina e à neosaxitoxina, Sasner *et al.* (1984 *apud* SIQUEIRA e OLIVEIRA-FILHO) observaram movimentos erráticos e paralisia da segunda antena de *D.magna*, levando os organismos a afundarem. *C.raciborskii* pode afetar o potencial de crescimento de juvenis de *D. magna* em testes agudos: quando submetidas a duas cepas de *C.raciborskii*, uma produtora de toxinas e outra não, o índice de sobreviventes foi de 10,00% e 93,33%, e houve aumento no tamanho do corpo em 2,54% e 38,14%, respectivamente (Nogueira *et al.*, 2004). Estudos realizados por Padisak (1997) mostram que, apesar de não ser letal a *D.magna* em alguns testes, pode promover uma redução no tamanho dos organismos.

Cabe ressaltar também que estudos realizados por Nogueira *et al.* (2006) apontam que a estrutura intestinal e digestiva de *D. magna* alimentadas com *C.raciborskii* produtora de cylindrospermopsina mostraram uma dissociação generalizada das células epiteliais, associadas à desorganização intracelular grave. No

entanto o trabalho aponta a possibilidade de que estas alterações sejam causadas por outro metabólito ativo produzido pela cianobactéria ainda não identificado. O trabalho aponta que *C.raciborskii* é inadequada como alimento para *D. magna*, devido ao baixo valor nutricional e conteúdo tóxico.

Por outro lado estudos de toxicidade aguda submetendo 3 espécies de *Daphnia* a cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3) provenientes de um reservatório do Rio de Janeiro produtoras de saxitoxina apontam que há diminuição do número de indivíduos com capacidade natatória apresentando progressiva imobilização e recuperação dos movimentos natatórios quando transferidos para suspensões de alimentos sem células tóxicas (FERRÃO-FILHO *et al.*2007).

Gustafsson e Hansson (2004) por sua vez, utilizaram uma cepa tóxica de *Microcystis* para provar que a habilidade e sucesso de *D. magna* para lidar com a presença de *Microcystis* no meio é melhorada se os animais tiveram exposição prévia a *Microcystis* tóxicas. Isto sugere que a toxina pode afetar menos as populações de *D. magna* que estão repetidamente expostas ao cianobactérias tóxicas em seu habitat natural em relação às populações sem exposição prévia.

Testes realizados por Trabeau *et al.*, (2004) mostram que a espécie *Microcystis aeruginosa*, por exemplo, causa diversos efeitos em uma espécie de *Daphnia* (*D.pulicaria*), alterando comportamento alimentar mandibular e aumentando as taxas de rejeição ao alimento, aumentando significativamente as taxas de respiração destes organismos quando comparados com indivíduos alimentando-se de clorófitas. De forma semelhante, um trabalho realizado por Dao *et al.*(2010) ao submeter exemplares de *D. Magna* por duas gerações (teste crônico) ao extrato da mesma cianobactéria ou à microcistina pura, observou diversas alterações nos organismos como diminuição da sobrevivência, cessação de produção de ovos / embriões e má formação de recém-nascidos. Okumura *et al.* (2007) observaram efeito dose-resposta na reprodução de dafnídeos submetidos a microcistina, o que não foi observado em estudo realizado por Takenaka *et al.* (2007), no qual a reprodução dos dafnídeos foi estimulada nas menores concentrações dos extratos brutos, sendo, muitas vezes, superior à do controle. Chen *et al.* (2005) observaram que baixas concentrações de microcistina não tiveram efeitos

deletérios sobre *Daphnia*, mas sim efeitos estimuladores, sendo a reprodução significativamente superior à do controle.

Os efeitos observados dos extratos brutos de cianobactérias sobre os daftnídeos revelam que diversos fatores interferem na toxicidade. Outras variáveis modificam a toxicidade, fazendo com que amostras com menor concentração de toxinas possam ser mais tóxicas do que outras com maior concentração, ou vice-versa (TAKENAKA *et al.*; 2007). Os resultados apontados por estas pesquisas evidenciam a influência que amostras contendo cianobactérias podem causar sob microcrustáceo, em especial *D.magna*. Alguns dos efeitos causados estão consolidados na comunidade científica como as alterações no trato digestivo, na reprodução, tamanho. No entanto é possível constatar que há diversas incógnitas acerca deste assunto, o que requer aprofundamento das pesquisas científicas, como por exemplo, a possibilidade de que as alterações observadas nos organismos sejam causadas por outro metabólito ativo produzido pela cianobactéria ainda não identificado e a hipótese de que as toxinas possam afetar menos as populações de *D. magna* que estão repetidamente expostas à cianobactérias tóxicas em seu habitat natural em relação às populações sem exposição prévia.

Com os testes realizados neste trabalho não é possível responder a algumas das inquietações existentes na comunidade científica, porém apontam que num dado momento efeitos em *D.magna* são observados e em outro não. Para melhor acompanhamento da toxicidade causada ao organismo-teste torna-se necessário realizar um acompanhamento intensivo com testes realizados periodicamente em curtos intervalos de tempo.

6.3 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é um método citogenético simples, rápido e capaz de detectar quebras e perdas cromossômicas (aneuploidia) tanto *in vivo* como *in vitro*. O micronúcleo (MN) se constitui em pequena massa de cromatina separada do núcleo principal, formada durante a telófase da mitose ou meiose, e resultante de fragmentos de cromossomos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (FENECH, 1997).

6.3.1 Teste do micronúcleo utilizando peixes

O tamanho dos peixes utilizados nos testes foi registrado no momento da retirada do material sanguíneo e preparo das lâminas:

Tabela 6.4: Média dos comprimentos dos peixes utilizados no ensaio do Micronúcleo

Tamanho dos peixes	
Amostra	Comprimento (cm)
Controle Positivo	16
Controle Negativo	16
LB Bruta	16
LP Filtrada	13
LP Gelo	13

Os organismos utilizados estavam na mesma fase de desenvolvimento e apresentaram tamanho médio aproximado, evitando variabilidade nestes índices.

A Tabela 6.5 e as Figuras 6.4, 6.5 e 6.6 apresentam os resultados encontrados para o teste do MN realizado com peixes:

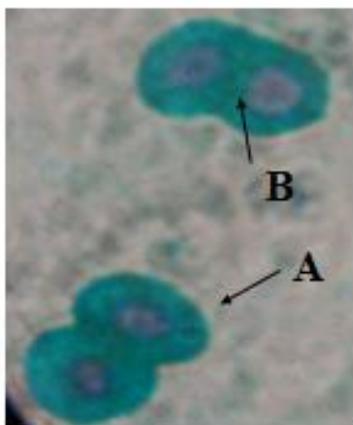


Figura 6.4: a) célula com dois MN e b) célula binucleada com um MN.

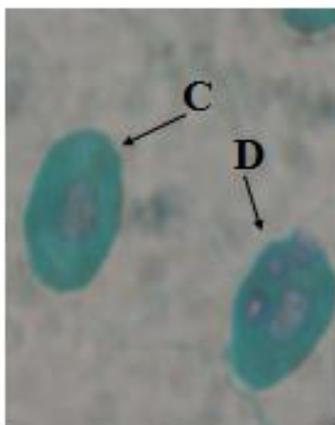


Figura 6.5: c) célula com um MN e d) célula três MN.

Tabela 6.5: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com peixes

Ensaio do Micronúcleo (MN) utilizando peixes				
Amostra	Cél. com MN	Cél. com mais de 1 MN	Gemas nucleares	Ponte Nucleoplásmica
Controle Pos.	85	10	0,3	N.A.
Controle Neg.	0,7	N.A.	N.A.	N.A.
LB Bruta	5,3	N.A.	N.A.	N.A.
LP Filtrada	3,5	N.A.	N.A.	N.A.
LP Gelo	0,6	N.A.	N.A.	0,5

Controle Positivo = Dicromato de Potássio

N.A. = Não apresentou

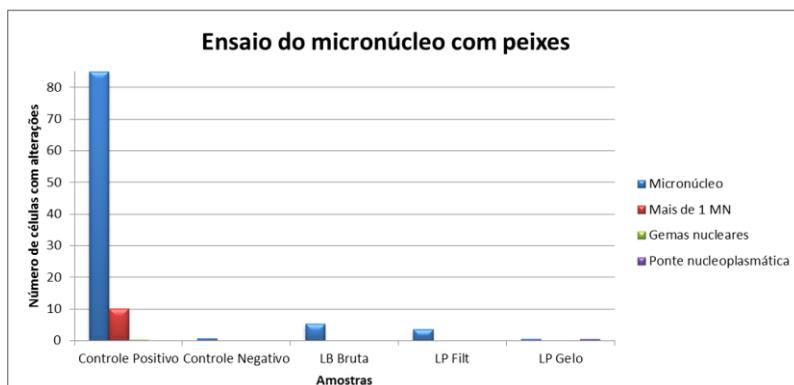


Figura 6.6: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com peixes

Na figura 6.6 e tabela 6.5 pode ser observado o índice de formação de micronúcleos de forma mais acentuada e de outras má formações apresentadas pelos peixes expostos à água do manancial indicando efeito mutagênico dessas amostras. O efeito foi observado com mais ênfase e semelhança nas amostras bruta e filtrada. A amostra submetida a gelo/degelo apresentou resultados semelhantes ao controle negativo, indicando que este processo pode interferir na manutenção das características das amostras. Brentano, 2006 já

apontou esta possibilidade ao realizar testes crônicos e agudos com *D.magna* expostas a efluentes. A quantidade de micronúcleos encontrada no peixe exposto à água desclorada (controle) é o esperado para análise em 2.000 células, assim como o controle positivo.

Resultados apresentados por Moser (2007) (Tabela 6.6) apresentam resultado semelhante para o peixe submetido à água da Lagoa do Peri. Este estudo apresenta ainda maior incidência de MN para peixes nativos deste manancial, confirmando os resultados encontrados neste teste, ou seja, o potencial mutagênico da amostra testada.

Tabela 6.6: Ocorrência de eritrócitos micronucleados (MN)

Origem do Peixe	Número de MN
Nativo da Lagoa (<i>in situ</i>)	7
Peixe de cultivo, exposto à água da Lagoa	5
Peixe de cultivo (controle)	2

Fonte: Moser, 2007

O teste do micronúcleo cada vez mais vem sendo utilizado na avaliação do potencial mutagênico de amostras naturais, em laboratório ou *in situ* (CHAUDHARY *et al.*; 2006). Deste modo já em 1998, Hayashi *et al.* realizaram estudos com o objetivo de desenvolver e avaliar sistemas de monitoramento que utilizam organismos aquáticos para avaliar a genotoxicidade de água em campo e em laboratório. Seus estudos de campo constataram que o teste do micronúcleo é aplicável à água doce e peixes marinhos e que as células branquiais são mais sensíveis que as células hematopoiéticas para agentes indutores de formação de micronúcleo por exemplo. Em 2007, Hayashi *et al.* apresenta as discussões do grupo de trabalho do Workshop Internacional sobre Testes de genotoxicidade (IWGT) acerca da utilização do teste do micronúcleo *in vivo* e seus aspectos associados como a aceitação regulamentar de dados provenientes de contagem automatizada, especialmente no que diz respeito à utilização da citometria de fluxo e o uso do ensaio em outros tecidos da medula óssea e do sangue (por exemplo, fígado, pele, cólon, células germinativas).

A aplicação deste ensaio em peixes tem sido cada vez mais frequente citando como exemplo a avaliação da genotoxicidade de rios que recebem contribuição de descarga de efluentes contendo metais pesados ou outras substâncias nocivas como evidencia estudo realizado por Ergene *et al.* (2007) e Lemos *et al.* (2007).

6.3.2 Teste do micronúcleo utilizando células VERO

Os testes realizados com células VERO submetidas à amostra da Lagoa do Peri também apresentaram efeitos mutagênicos através da formação de micronúcleos e de má formações nucleares. Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos similares utilizando amostras da Lagoa do Peri aplicando o ensaio do micronúcleo à cultura celular. As Figuras 6.7 e 6.8 apontam imagens dos resultados encontrados neste trabalho:

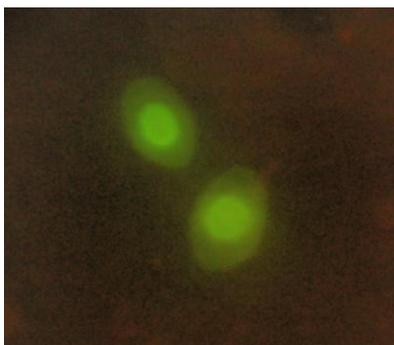
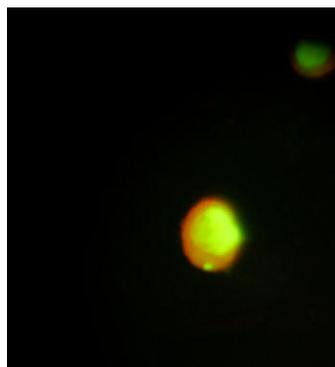
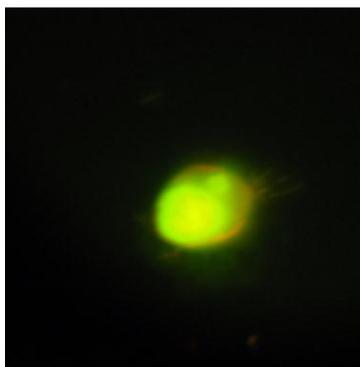


Figura 6.7: células VERO sem alterações



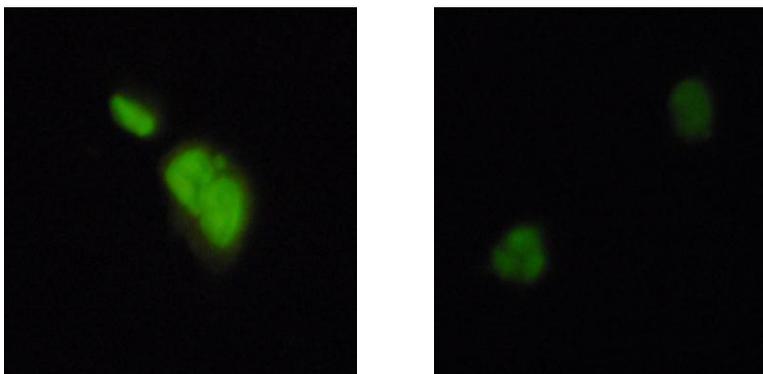


Figura 6.8: Micronúcleos e má formações apresentadas em células VERO

As figuras acima apresentam os efeitos causados pela amostra da Lagoa do Peri ao cultivo de células VERO. As duas primeiras figuras apresentam células mononucleadas com micronúcleo e a terceira figura apresenta uma célula binucleada também com formação de MN. Já a última figura apresenta uma célula trinucleada.

Tabela 6.7: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com célula VERO.

Ensaio do Micronúcleo (MN) utilizando células VERO		
Amostra	Cél com MN	Más formações diversas
Controle Positivo	65,5	3,0
Controle negativo	1,3	1,3
LP Filt	9,3	2,3
LP Gelo/Filt	22,4	2,3
T3 Filt	23,7	3,7
T3 Gelo/Filt	14	1,7

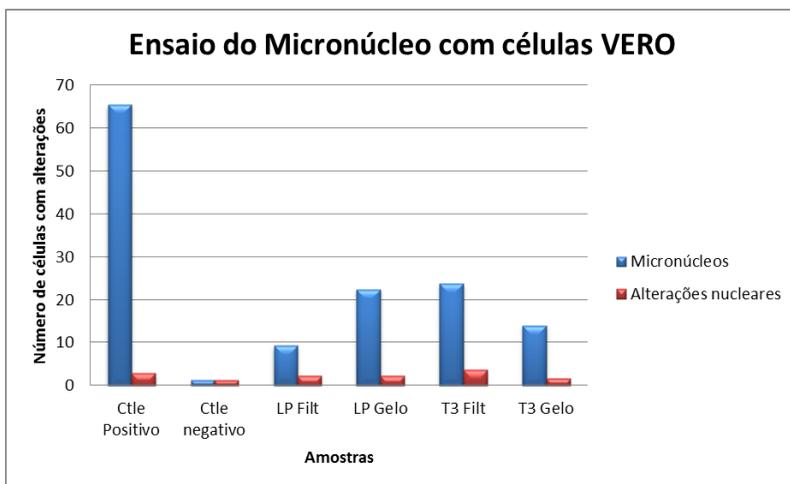


Figura 6.9: Ocorrência de MN e alterações nucleares nos testes com VERO.

Os testes realizados com células apresentam altos índices de ocorrência de MN e de má formações para as amostras filtradas e submetidas a gelo/desgelo também, diferentemente dos resultados apresentados nos testes com peixes. Isto mostra a complexidade da questão envolvendo a produção, liberação para o meio e degradação das cianotoxinas e os fatores externos que influenciam estes processos. Cabe ressaltar também que os testes realizados com peixes e com células foram realizados com amostras coletadas em datas diferentes podendo apresentar características um pouco diferentes.

Outros autores também registram a ocorrência de clastogênese e formação de micronúcleos em linhagem de células humanas cultivadas e incubadas com toxinas produzidas por fitoplâncton. Ensaios realizados por Humpage *et al*, (2000 a,b) sugerem que a cilindrospermopsina age induzindo uma perda de cromossomos inteiros (aneuploidia). Carvalho Pinto-Silva *et al*. (2006) avaliaram o potencial genotóxico do ácido domóico e ácido ocadáico sobre células Caco-2. Ambos demonstraram-se mutagênico, induzindo à formação de micronúcleos. Melegari (2010) por sua vez, aponta a formação de micronúcleo em células N2A e Vero expostas à diversas concentrações de saxitoxina utilizando a Colchicina como controle positivo :

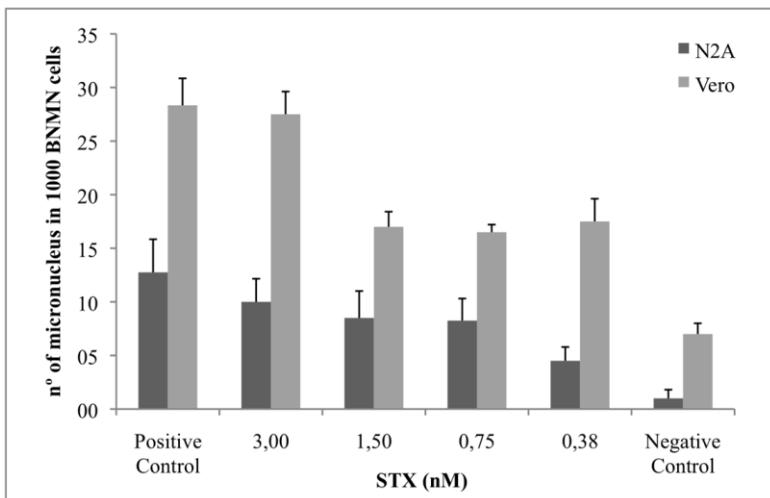


Figura 6.10: Número de células N2A e VERO micronucleadas induzidas por saxitoxina (0.38, 0.75, 1.50, 3.00 nM) após 24h de exposição.

Fonte: Melegari, 2010.

Desta forma, nos últimos anos, o teste do micronúcleo *in vitro* tem se tornado uma ferramenta atrativa para os testes de genotoxicidade devido à sua simplicidade de aplicação em diferentes linhagens celulares (Editorial, 2006). Da mesma forma, Lemos e Erdtmann (2000) apontam o ensaio do micronúcleo com linfócitos humanos, por exemplo, como um ensaio de grande sensibilidade citogenética e de grande viabilidade para estudos ambientais de amostras aquáticas.

A avaliação da indução de micronúcleos é o primeiro ensaio *in vivo* em uma bateria de testes genotoxicidade e é recomendado pelas agências reguladoras em todo o mundo a ser realizada como parte da avaliação da segurança dos produtos. Estudos sobre ensaios de genotoxicidade utilizando peixe indicam que estes organismos são adequados para estabelecer um modelo para o monitoramento de genotoxicidade aquática e da qualidade de águas devido às suas habilidades de metabolizar xenobióticos e poluentes. Desta forma o teste do micronúcleo pode ser considerado uma ferramenta fácil e simples de avaliação da genotoxicidade e pode ser aplicada para a avaliação de extensão do efeito mutagênico da água em corpos de água naturais.

6.4 Teste do cometa utilizando peixes

O tamanho dos peixes utilizados nos testes foi registrado no momento da retirada do material sanguíneo e preparo das lâminas. Os resultados estão na Tabela 6.8:

Tabela 6.8 : Média dos comprimentos dos peixes utilizados no ensaio cometa

Tamanho dos peixes	
Amostra	Comprimento (cm)
Controle Positivo	16
Controle Negativo	10
LP Gelo	10,3
T3	10

Os organismos utilizados estavam na mesma fase de desenvolvimento e apresentaram tamanho médio aproximado, o que é importante para garantir que estejam na mesma fase de desenvolvimento.

A Tabela 6.9 e a Figura 6.11 apresentam os resultados encontrados para o teste do cometa realizado com peixes, expressos no número de células que apresentaram danos nas classes de 0 a 4 e em Unidades Arbitrárias Totais (UAT) que consiste na multiplicação da classe do dano pelo número de células contadas. Quanto maior a UAT maior o dano causado.

Tabela 6.9: Danos ao DNA -Ensaio Cometa com peixes

Ensaio do Cometa utilizando peixes- Classe de dano ao DNA						
Amostra	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	U.A.T.
Controle Pos.	0	0	3	17	30	177
Controle Neg.	45	3	2	0	0	7
LP gelo	0	16	31	2	1	66
T3	0	17	27	4	2	91

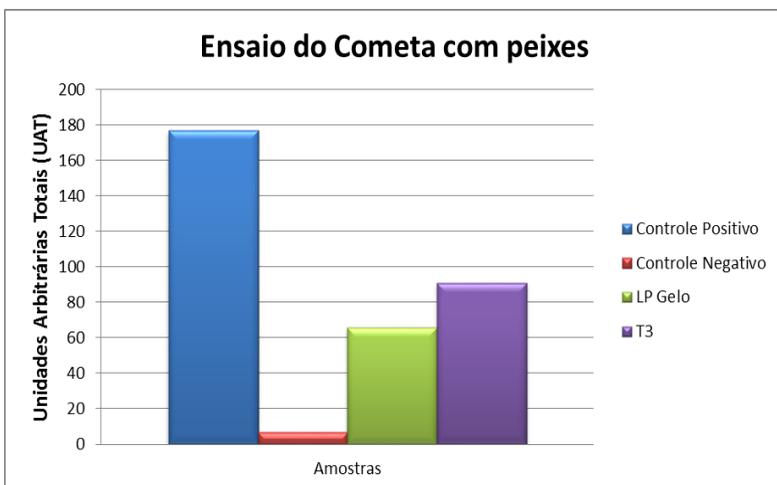


Figura 6.11: Danos causados ao DNA -ensaio Cometa com peixes

A Tabela 6.10 e a Figura 6.12, apresentam os resultados encontrados para o teste do cometa realizado com peixes, expressos na porcentagem (%) de células que apresentaram danos nas classes de 0 a 4 e em Unidades Arbitrárias Totais (UAT). Pode ser observada alta incidência de formação de cometas principalmente nas classes 1 e 2, indicando a genotoxicidade da amostra quando testada em peixes.

Tabela 6.10: Danos c ao DNA em (%) - ensaio Cometa com peixes

Ensaio do Cometa utilizando peixes- Classe de dano ao DNA (%)						
Amostra	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	U.A.T.
Controle Pos.	0	0	6	34	60	177
Controle Neg.	90	6	4	0	0	7
LP gelo	0	32	62	4	2	66
T3	0	34	54	8	4	91

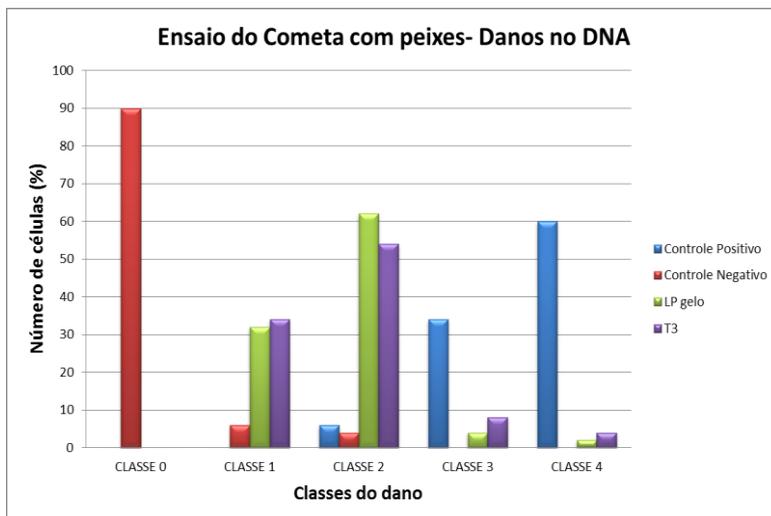


Figura 6.12: Danos ao DNA em (%) - ensaio Cometa com peixes

As tabelas 6.9 e 6.10 apresentam resultados com valores aproximados para as amostras LP gelo e T3. Estes valores indicam toxicidade com formação de cometa em sua maioria com classe 2 ou 3, indicando efeitos significativos. Considerando que a cepa T3 testada é produtora de toxinas, os resultados apresentados para a amostra LP gelo testada podem indicar que esta também produz compostos capazes de causar danos ao DNA dos organismos testados, neste caso o peixe *Geophagus brasiliensis*.

Cada vez mais o teste do cometa vem sendo utilizado na avaliação genotóxica de amostras naturais sendo aplicado a organismos nos diversos níveis. No entanto, durante as pesquisas bibliográficas não foi encontrado registro de experimentos aplicando o teste do cometa a organismos submetidos à água da Lagoa do Peri. Este trabalho aplicou o teste a peixes apresentando formação de cometa em todos os níveis, porém em maior quantidade nos níveis de danos intermediários (Classe 1 e 2).

Devido a dificuldades de cultivo e de estabelecimento de metodologias não foi realizado ensaio cometa aplicado à cultura celular, impossibilitando comparação com efeitos causados em estruturas diferenciadas.

É importante considerar que diversos já trabalhos realizados e que envolvem a aplicação deste teste a diferentes

culturas celulares, apresentam informações importantes e orientativas. Com relação à genotoxicidade da cilindropermopsina, por exemplo, ensaios realizados por Humpage *et al.* (2000) e Shen *et al.* (2002) sugerem que a indução de quebras de fitas do DNA é um dos principais mecanismos de genotoxicidade desta toxina. Podem-se citar também estudos realizados por Fessard e Bernard (2003) apontando que as células de ovário de hamster chinês (CHO) K1 tratadas com cilindropermopsina não apresentaram danos no ensaio cometa, no entanto, houve inibição do crescimento celular e alterações morfológicas das células. Este estudo concluiu que a cilindropermopsina pode não reagir diretamente com o DNA em células CHO K1, e que a hipótese de sua metabolização em um produto genotóxico deve ser mais explorada.

Resultados como estes, se comparados aos encontrados neste trabalho indicam a variabilidade de respostas que os compostos podem apresentar quando testados em diferentes linhagens de cultura celular e em organismos complexos por exemplo. Deve-se considerar as complexas interações com as atividades metabólicas por exemplo, que diferem ao tratarmos de organismos superiores e de sistemas celulares.

6.5 Ensaio de citotoxicidade: Teste do MTT

Os testes com cultura celular ocorreram durante o ano de 2009. Durante este período foram enfrentadas diversas situações críticas e dificuldades. Nos primeiros períodos de manutenção das culturas celulares e estabelecimento de metodologias ocorreu uma persistente contaminação das culturas celulares causada por fungos, prejudicando assim o andamento das atividades. Após descontaminação do laboratório de cultura celular, melhoria das práticas de assepsia e reinício da rotina de cultura utilizando novas cepas houve considerável redução das contaminações ao ponto de se tornarem ausentes durante a manutenção e repicagens. Mesmo após todas as medidas diversos testes realizados ainda manifestaram contaminações causadas por bactérias na fase de inoculação das microplacas ou na fase de intoxicação com as amostras-teste. As diversas tentativas mostraram que a contaminação pode estar relacionada à metodologia de preparação das soluções de intoxicação.

As últimas tentativas realizadas apresentaram ausência ou pouca contaminação, no entanto os resultados apresentados não foram satisfatórios, não havendo coerência entre os resultados apresentados entre as células tratadas com as amostras e os controles, além de alterações morfológicas apresentadas pelas culturas celulares em teste, indicando algum problema não identificado. Admitem-se duas possibilidades para a origem destes problemas. A primeira hipótese aponta problemas na metodologia utilizada no preparo das soluções-teste. Esta não foi considerada adequada uma vez que o preparo do meio de cultivo em pó utilizando as amostras líquidas filtradas como água de diluição podem causar desequilíbrio nas funções celulares devido a presença de nutrientes que podem estar sendo oferecido às células causando desequilíbrio no seu metabolismo ou mascarando os resultados. A segunda hipótese aponta a possibilidade de ocorrência de contaminação por micoplasma. Segundo Miyaki (1989), desde que a introdução de antibióticos nos meios de cultivo de células minimizou o problema das contaminações bacterianas e fúngicas, os micoplasmas passaram a ser os contaminantes detectados com maior frequência em células animais cultivadas *in vitro*. Em 1989 a autora já realizou estudos apontando que, do total de 106 amostras testadas, provenientes de bancos de cultura de laboratórios de pesquisa, 48 apresentaram-se contaminadas por micoplasma (45,28%), o que constitui elevado índice de contaminação. O fato indica que testes periódicos para a determinação da presença de micoplasma nas culturas em utilização é recomendável.

Com relação à aplicabilidade dos testes de citotoxicidade, em especial o MTT, pode-se citar estudos realizados por Bain (2007) mostram que através deste ensaio é possível verificar que a cilindropermopsina causa decréscimo no crescimento de células das linhagens HepG2, Caco-2 e Hela, causando ruptura da membrana celular de fibroblastos após 72h de exposição a concentrações relativamente altas desta toxina. Buchli *et al.* (2009) apresentam a ocorrência de alteração morfológica de células Vero, tais como distensão e arredondamento, evoluindo para morte celular, indicando o potencial citotóxico do isolado de algas como *Pseudoanabaena sp.* Além disso, estudos realizados por Young *et al.* (2008) apontam que a cilindropermopsina é um potencial disruptor endócrino pois pode alterar a relação progesterona/estrogênio em mulheres.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre os organismos produtores e sobre as toxinas produzidas, assim como os mecanismos de atuação destas no organismo humano, tornam-se de grande relevância quando se considera a incidência de casos de intoxicação e morte registrados em todo o mundo, inclusive no Brasil.

A Lagoa do Peri, por constituir o maior manancial doce de superfície de Florianópolis, é uma fonte potencialmente explorável. Entretanto, sua utilização indiscriminada pode comprometer o equilíbrio do sistema ecológico em sua bacia hidrográfica e conseqüentemente a disponibilidade de seus recursos. Não obstante coloca-se em cheque até que ponto o consumo da água para abastecimento é seguro e não oferece riscos à saúde pública.

Com o passar do tempo, os diversos estudos realizados na Lagoa e na sua bacia hidrográfica geraram grande quantidade de informações técnicas que são instrumentos indispensáveis na elaboração de programas de gerenciamento, que visem a utilização e conservação dos recursos naturais ali disponíveis. Programas de monitoramento para alertar as autoridades sobre a presença de cianotoxinas e melhorias nas técnicas de tratamento de água que permitam a sua remoção da água tratada tornam-se essenciais na busca pela minimização dos potenciais riscos associados a esta problemática. Da mesma forma torna-se fundamental a importância do estabelecimento de um programa de prevenção da saúde pública com foco no monitoramento dos corpos d'água utilizados como mananciais de abastecimento (a exemplo do manancial da Lagoa do Peri) uma vez que, com dados históricos e com monitoramento periódico é possível prever florações fitoplanctônicas, compreender os fatores que podem estar promovendo a elevação na densidade destes organismos e possibilita a tomada de decisões para o manejo adequado do ecossistema.

Neste contexto e levando-se em conta as características regionais poderiam ser adotadas medidas como: convênios com centros de pesquisa que trabalhem com desenvolvimento de tecnologia para tratamento de águas, investimento na formação dos profissionais que atuam na ETA para que estejam preparados para a identificação e classificação das espécies de cianobactérias potencialmente tóxica, educação ambiental, visando a formação de

espírito crítico, que pressionaria os órgãos governamentais na busca por soluções.

Cabe registrar também que não foram encontrados na literatura consultada registros que indicando a produção de toxinas por outras espécies de cianobactérias identificadas na Lagoa do Peri, como *Limnothrix planctonica* e *Planktolyngbya sp.*, sendo que estas são consideradas potenciais produtoras de microcistinas. Considerando que há na Lagoa do Peri cepas de *C.raciborskii* produtoras de toxinas conforme indicado em diversos trabalhos consultados na realização desta pesquisa, há indicativos de que a *C.raciborskii* presente no manancial estudado seja a verdadeira responsável pelos resultados apresentados neste trabalho, mesmo ao considerar que esta pesquisa não contemplou a dosagem de cianotoxinas dispersas nas amostras durante o período estudado. Contudo, Bittencourt-Oliveira e Molica (2003) relatam que diversos estudos já realizados mostram a ocorrência de toxicidade de amostras de *C.raciborskii* em ratos e moluscos, mesmo quando não foi identificada a presença de cilindrospermopsina ou saxitoxina nas amostras testadas, apontando para a possibilidade de um novo composto cuja estrutura química e atividade toxicológica ainda precisam ser determinadas. Da mesma forma, Saker et al. (2003), relataram a ocorrência de *C. raciborskii* em ambientes aquáticos de Portugal e embora testes realizados para detectar a presença de cilindrospermopsina e PSP tenham sido negativos, as cianobactérias cultivadas em cultura pura apresentaram toxicidade nos bioensaios, sugerindo que um novo tipo de toxina deve estar presente. Embora a estrutura química do composto causador dos efeitos não tenha sido determinada, a pesquisa chama atenção para a necessidade de uma pesquisa detalhada sobre a variabilidade genética de *C. raciborskii* e a necessidade de um acompanhamento adequado da presença das cianobactérias em reservatórios de água doce.

Isto mostra a complexidade da questão estudada e sua interface com diversas hipóteses em estudo ou a serem estudadas. Calijuri *et al.*, (2006) por sua vez, aponta que a simples presença de uma substância tóxica no ambiente não a torna um risco para a população. Vários fatores podem influenciar o potencial tóxico e sua ação nos organismos após sua dispersão no ambiente: as interações com outras substâncias dissolvidas, os processos de degradação e biodegradação naturais, o transporte entre os compartimentos do ecossistema, as vias de contaminação e o tempo de contato com os

organismos, a dinâmica da substância tóxica nos organismos e sua ação nos sítios de ação .

Desta forma os resultados obtidos com este trabalho podem fornecer ao público e à comunidade científica informações preliminares que possam orientar seu gerenciamento, bem como fornecer subsídios para maiores estudos. Cabe aos profissionais de diversas áreas o desenvolvimento de tecnologia de remoção de algas e toxinas em água de abastecimento público, a pesquisa de predadores naturais e inibidores ao desenvolvimento de *C.raciborskii* (sua existência e dinâmica no meio natural), bem como o estudo do metabolismo da *C.raciborskii*, a fim de sanar dúvidas tais como: em que condições estes organismos liberam toxinas? Quais fatores ambientais influenciam na geração de stress? Há outros fatores que propiciam sua dominância e que precisam ser melhor elucidados?

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com os testes realizados neste estudo permitem concluir que:

- A água da Lagoa do Peri continua apresentando alta incidência de *C. raciborskii* inclusive como espécie dominante do ambiente em que está inserida, em consonância com trabalhos anteriormente realizados por diversos autores.
- A amostra na sua forma natural pode causar toxicidade aguda em microcrustáceos da espécie *D. magna*. Esta toxicidade pode ser alta ou baixa não seguindo um padrão de resultados com aumento ou diminuição gradativa da toxicidade e abrindo a possibilidade também para novas hipóteses a respeito da origem dos efeitos causados sobre os organismos.
- É viável o uso de testes de mutagenicidade e de genotoxicidade como o teste do micronúcleo aplicado a peixes e cultura celular e teste do cometa aplicado a peixes, sendo observado considerável índice de formação de micronúcleos e de danos ao DNA do material exposto às amostras da Lagoa do Peri em relação ao controle. Este resultado mostra que há a ação de agentes dispersos no meio sobre os processos biológicos dos organismos. O teste do micronúcleo, em especial é uma ferramenta fácil e simples de avaliação da genotoxicidade podendo ser aplicada para a avaliação de extensão do efeito mutagênico da contaminação das águas em corpos de água naturais. O trabalho mostra que é viável o uso deste ensaio para avaliação das amostras contendo cianobactérias tóxicas. Além disso, quando aplicado à cultura celular, esses estudos indicam que os métodos *in vitro* podem ser úteis na previsão da toxicidade aguda *in vivo*, fator comprovado por este trabalho. Outra vantagem apontada pelos testes *in vitro* é a possibilidade da condução de ensaios *in vivo* muito mais eficiente resultando em uma economia, tanto no número de animais e na quantidade de tempo necessário para obter os resultados finais
- A alta incidência de formação de cometas indica que a água da Lagoa do Peri pode ser genotóxica e que o peixe da espécie *Geophagus brasiliensis* pode ser um organismo bioindicador para este tipo de teste. O trabalho mostra que é viável o uso deste ensaio para avaliação das amostras contendo cianobactérias tóxicas, pois os resultados estão de acordo com as respostas obtidas nos outros ensaios realizados neste trabalho.

- É necessário o aperfeiçoamento das técnicas de execução e das metodologias dos testes de citotoxicidade a fim de evitar possíveis fatores de interferência que causem problemas aos testes, inviabilizando sua perfeita execução ou a confiabilidade dos resultados.
- Faz-se necessário um monitoramento freqüente da população de *C.raciborskii* presente na água, bem como monitoramento da quantidade de toxinas dispersas conforme Portaria 518/MS/2004.

Diante deste contexto e seguindo as determinações da legislação vigente conclui-se que é importante a realização de um monitoramento constante da água do manancial e da água tratada que é utilizada para o abastecimento público, a fim de avaliar a qualidade destas águas e que se possam tomar as medidas necessárias para minimizar os possíveis efeitos causados ao homem.

Os resultados obtidos com este trabalho poderão fornecer ao público e à comunidade científica informações preliminares que possam orientar seu gerenciamento, bem como fornecer subsídios para maiores estudos que visem a utilização e conservação dos recursos naturais ali disponíveis.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como complementação a esta pesquisa, recomenda-se que estudos científicos envolvendo os níveis de toxicidade e de toxinas presentes nas amostras sigam uma regularidade, abrangendo diferentes estações do ano, a fim possibilitar uma avaliação da toxicidade em um ou mais ciclos anuais completos.

Recomenda-se a realização de estudos toxicológicos utilizando culturas pura de *C.raciborskii* isoladas em laboratório, a fim de propiciarem novas abordagens a este tipo de estudo.

Estudos alelopáticos e também os que envolvam a pesquisa de novos compostos produzidos pelas cianobactérias podem ser interessantes a fim de elucidar algumas questões apontadas neste trabalho.

Além disso, recomenda-se a realização de uma maior bateria de testes em nível de dano celular e do DNA a fim de fornecer resultados mais completos. Pode-se complementar o estudo com a realização de testes de toxicidade crônica para *D. magna*, teste do cometa aplicado a células, testes de lipoperoxidação, metilação entre outros, possibilitando conhecer melhor os efeitos que as amostras causam aos organismos expostos.

Não obstante, torna-se muito importante que estudos de toxicidade como os apresentados sejam acompanhados de análises específicas, visando a detecção e quantificação das toxinas presentes nas amostras analisadas. Isto pode facilitar a compreensão e discussão dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

ACIESP - ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Glossário de Ecologia**. São Paulo: ACIESP, 1997. 352 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2003. 16 p.

AI-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research** v.343 p. 121-135, 1995.

AZEVEDO, S. M. F. Toxinas de Cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. **Medicina on line** v. 1, 1998.

AZEVEDO, S. M. F. O.; BRANDÃO, C. C. S. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2003, 56p.

AZIZ, D.M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. **Animal Reproduction Science** v.92 p. 1–8, 2006.

BAIN, P.A. **Gene expression profiling of *Cylindrospermopsis* toxicity**. Griffith University: Australia 2007.

BARDIENĚ, J.; DEDONYTĚ, V.; RYBAKOVASĪ, A.; ANDREIKĚNAITĒ, L.; ODD-KETIL A.; Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. **Ekologija** v.4 p. 1–7, 2005.

BERRY, J.P. ; GIBBS , P. D.L. ; SCHMALE, M.C; SAKER, M.L. Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Toxicon**, v. 53 p. 289–299, 2009.

BEYER, D.; SURANYI, G.; VASAS, G.; ROSZIK, J.; ERDODI, F.; M-HAMVAS, M.; BACSI, I.; BATORI, R.; SERFOZO, Z.; VEREB, Z.M. S.G.; DEMETER, Z.; GONDA, S.; *Cylindrospermopsis* induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. **Toxicon**, v. 54, p. 440–449, 2009.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora: Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2003.

BLÁHOVÁ, L.; ORAVEC, M.; MARSÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L.; SIMEK, Z.; BLÁHA, L.; The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin *cylindrospermopsin* in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. **Toxicon**, p. 1–6, 2009.

BOTHA, N.; GEHRINGER, M. M.; DOWNING, T. G.; VAN DE VENTER, M.; SHEPHARD, E.G.; The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. **Toxicon** v.4, p. 85–92, 2004.

BOUAZIZ, C.; ABID-ESSEFI, S.; BOUSLIMI, A.; EL GOLLI, E.; BACHA, H. Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. **Toxicon** v.48:343–352, 2006.

BOURKE, A.T.C.; HAWES, R.B.; NEILSON, A.; STALLMANN, N.D.; An outbreak of the hepatoenteritis (the palm island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. **Toxicon Suppl.**, v. 3, p. 45-48, 1983.

BOUVY, M.; PAGANO, M.; TROUSSELLIER, M.; Effects of a cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). **Aquatic microbial ecology**, v. 25, p. 215–227, 2001.

Brasil. Santa Catarina. **Decreto Municipal N° 091/82: Regulamenta a Lei Municipal No 1.828 de 04 de dezembro de 1981 que criou o Parque Municipal da Lagoa do Peri e instituiu seu Plano Diretor de Ocupação e Uso do Solo**. Florianópolis, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Cianobactérias tóxicas: **Impacto na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília, DF: FUNASA, 2003.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. **Potencial de florações de cianobactérias em um reservatório de abastecimento doméstico no estado do espírito santo (reservatório duas bocas – Cariacica – ES)** – Brasília: Funasa, 2007. 82 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 59, p.166–176, 26 março 2004. Seção I.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do meio Ambiente. **Resolução no 357, de 17 de março de 2005**. Brasília, DF: CONAMA, 2005.

BRENTANO, D. M.; LOBO, E. A. Biomonitoramento de caráter ecotoxicológico no Vale do Rio Pardo, RJ, Brasil. **Tecnológica**, v. 7, n. 2, p. 85-95, 2003.

BRIAND, J.F. ; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBERASC,C.; HUMBERTD, J.F. COUTEA, A. ; BERNARD, C. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, v. 36, p. 3183–3192, 2002.

BRIAND, J.F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERTD, J.F.; BERNARD, C. ; DUFOUR, P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or globalwarming?. **J. Phycol.**, v, 40, p. 231–238, 2004.

BÜCHLI, F. ; MARTINS, S. S. ; YANO, T. **Deteção de atividades citotóxicas de *Leptolyngbyasp* sobre culturas de células Vero**. UNICAMP

BÜCHLI, F. ; MARTINS, S. S. ; YANO, T. Deteção de atividades citotóxicas de pseudanabaena sp sobre culturas de células VERO

Instituto de Biologia. **XVII Congresso interno de iniciação científica da UNICAMP**, 2009.

CALIJURI, M.D.; ALVES, M.S.A.; DOS SANTOS, A. C. A.; **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. RIMA, 2006.

CAMPINAS, M.; TEIXEIRA, M. R.; LUCAS, H.; ROSA, M. J. Previsão da capacidade de remoção de cianobactérias e cianotoxinas na ETA de Alcantarilha. **Ata do 10º Encontro Nacional de Saneamento Básico**. Universidade do Minho, 2002. p. 1-14.

CARRANO, A. V.; NATARANJAN, S. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, v. 204, p. 379-406, 2002.

CARMICHAEL, W. Cyanobacteria Secondary Metabolites: The Cyanotoxins. **Appl. Bacteriology**, v. 72: 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K.; Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ. Health Perspect** v.109, p.663-668, 2001.

CARNEIRO, R.L.; SANTOS, M.E.V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M.F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research*, v. 31, p.481–488 , 2009.

CARRANO, A.V.; NATARANJAN, S. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research** v. 204, p. 379-406, 2002.

CARVALHO PINTO-SILVA, C. R. **Incidência de fitoplâncton tóxico na costa Catarinense: impacto na saúde pública e no meio ambiente**. 2005. Dissertação (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CECCA. **Unidades de Conservação e Áreas Protegidas da Ilha de Santa Catarina: Caracterização e Legislação.** Centro de Estudos, Cultura e Cidadania. Insular, 1987. 158 p.

CHAUDHARY,R.; PANDEY, S.; KUSHWAHA, B.; GAUR, K.; NAGPURE, N. Fish micronucleus assay: a sensitive tool for ecogenotoxicity studies. **Journal Ecophysiol. Occup. Health** v. 6, 2006.

CSGMT - Colaborative Study Group for the Micronucleus Test-Protocol recommended by the CSGMT/JEMS. MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 10, n. 3, p. 153-159, 1995.

CHASIN, A. A. da M.; PEDROZO, M. de F. M. (Org.) **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RIMA, 2003. 340 p.

CHAUDHARY, R.; PANDEY, S.; KUSHWAHA, B.; GAUR, K.K.; NAGPURE, N.S. Fish micronucleus assay: a sensitive tool for ecogenotoxicity studies. **J. Ecophysiol. Occup. Health**, v. 6, 2006.

CHEN, W., SONG, L., OU, D. & GAN, N. Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. **Environ. Toxicology** v.20, p. 323-330, 2005.

CHORUS, I., BARTRAM, J. (Eds.); **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.** London and New York: E & FN SPON, 1999, 416 p.

CODD, G.A. ; MORRISON, L.F. ; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 203, p. 264– 272, 2005.

COMPANHIA DE ÁGUA E SANAMENTO. **Mananciais da Ilha.** Disponível em: <<http://200.215.29.20/index.php?sys=346>>. Acesso: 29 maio 2008.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p.246-255, 1999.

COURA, G.S. **Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA.** 2004. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

CORAL, L.A. **Remoção de cianobactérias e cianotoxinas em águas de abastecimento pela associação de flotação por ar dissolvido e nanofiltração.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CRISTIANO, D.M. Estudo da Genotoxicidade da Saxitoxina no Manancial da Lagoa do Peri, Florianópolis-SC **Relatório de atividades do bolsista do programa PIBIC 2008/2009 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA- UFSC.**

DAO, T. S.; DO-HONG , L.C. ; WIEGAND, C. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicol.**v.55, p.1244–1254, 2010.

DARANAS, A. H.; NORTE M.; FERNANDEZ, J. J. Toxic Marine Microalgae. **Toxicol**, v. 39, p. 1101-1132, 2001.

DENIZOT, F.; LANG, R.; Rapid colorimétrico assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure living improved sensitivity and reability. **Journal of Immunological Methods**.v. 89, p.271-277, 1986.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 38412:** testverfahren mit Wasserorganismen (gruppeL) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen. 1989.

DI BERNARDO, L. **Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento.** Rio de Janeiro: ABES, 1995. p. 140.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology** . Wiley, 1998.

DUVAL, E.; COFFINET, S.; BERNARD, C.; BRIAND, J. **Effects of Two Cyanotoxins, Microcystin-LR and Cylindrospermopsin, on *Euglena gracilis*** .Chapter 60

EDITORIAL. **The *in vitro* micronucleus test: From past to future Mutation Research**. v.607, p. 2–4, 2006.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; CELIK, A.; KOLELI, N.; AYMAK, C.; Evaluation of River Water Genotoxicity Using the Piscine Micronucleus Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 48, p.421-429,2007.

FAIRBAIRN, D. W. ; OLIVE, P.L. ; O'NEILL, K. L. **The comet assay: a comprehensive review**. 1995.

FASTNER, J.; HEINZE, R.; CHORUS, I. Microcystin-content, hepatotoxicity and cytotoxicity of cyanobacteria in some German water bodies . **Water Science and Technology**. v.32, p. 165-170, 1995.

FASTNER, J.; HEINZE, R.; HUMPAGE, A.R.; MISCHKE, U.; EAGLESHAM, G.K. E CHORUS I; Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon** v. 42, p.313–321, 2003.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**. v.392, p.11-18, 1997.

FENECH, M.; CHANG W. P.; KIRSH-VOLDERS M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description on the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FERRÃO -FILHO, A. S.; COSTA, S. M. ; RIBEIRO, M.G.L; AZEVEDO, S.M. F. O.. Effects of a Saxitoxin-Producer Strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the Swimming Movements of Cladocerans. **Environ Toxicol.** v.23, p. 161–168, 2009.

FERRÃO -FILHO, A. S.; Soares, M.C.; Rocha. M.I.A.; Magalhães, V.F.; AZEVEDO, S.M. F. O.**Florações de Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: dinâmica sazonal e consequências para o zooplâncton** *Oecol. Bras.*, v.13, p. 346-365, 2009a.

FESSARD, V.; BERNARD, C. Cell Alterations But No DNA Strand Breaks Induced *In Vitro* by Cylindrospermopsin in CHO K1 Cells. *Environ Toxicol*, v. 18, p. 353–359, 2003.

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F.; Does Allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **J. Phycology** v. 43, p.256–265 , 2007.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters** v.160, p. 171–177, 2006.

FREITAS, J. C. **Toxinas de algas fitoplanctônicas. Manual de Métodos Ficológicos**, p. 311-327, 1995.

FRESHNEY R.I.; (Ed.): **Culture of Animal Cells- A Manual of basic technique**. 5ª Ed. Wiley, 2005.

FUJIKI, H.; SUEOKA, E.; KOMORII, A.; SUGANUMA, M. Tumor promotion and TNF- gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. **Environmental Carcinogenesis. & Ecotoxicological Research**, v. 15, p. 1-40, 1997.

GARCIA, T. V. **Tratamento de água eutrofizada através da ozoflotação**. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GEMELGO, M.C.P.; **Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica dos reservatórios Billings e Guarapiranga, SP, Brasil.** 2008. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2008.

GERLIER, D ; THOMASSET, N.; Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Jurnal of Immunological Methods**, v. 94, p. 57-63, 1986.

GIULIANO, M.; STELLAVATO, A.; CAMMAROTA, M.; LAMBERTI, M.; MIRAGLIA, N.; SANNOLO, N.; DE ROSA, M. Effects of low concentrations of benzene on human lung cells *in vitro*. **Toxicology Letters** v.188, p.130–136, 2009.

GOOGLE EARTH Version 4.1, 2007.

GRELLMANN, C. **Aspectos da morfologia e da ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszinska) Seenayya et Subba Raju e da produção de cianotoxinas na Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil.** 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I.C. R.; BARBOSA , A. C.; DOREA, J.G.; Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, 2009.

GUO, N.; XIE, P. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. **Environmental Pollution** v.143, p.513-518, 2006.

GUSTAFSSON, S.; HANSSON, L.A. Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. **Aquatic Ecology** , v.38, p. 37–44, 2004.

HARDING, W. B.; PAXTON, B. **Cyanobacteria in south Africa: a review :report to the water research commission.** 2001.

HAWKINS, P. R.; RUNNEGAR, M. T. C.; JACKSON, A. R. B.; FALCONER, I. R.; Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology** v. 50, p.1292-1295, 1985.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA Y.; Development of genotoxicity assay systems that use aquatic Organisms. **Mutation Research** v. 399, p. 125–133, 1998.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMAL, W.; GIBSON, D.; *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**. v.627, p.10–30, 2007.

HINKEL, R. **Aspectos da ciclagem de nutrientes de dois estádios sucessionais de floresta ombrófila densa do Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, SC.** 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R.; Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research** v.472, p.155–161, 2000.(a)

HUMPAGE, A. R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I. R.; Micronucleus induction and chromosome loss in WIL2-NS cells exposed to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, v. 472, p. 155-161, 2000. (b)

ISO - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 6341**: water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). USA, 1996. 7 p.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION . **ISO 8692** - Water quality: Fresh water algal growth inhibition test whit *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. USA, 1989.

IOC - INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION. **Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)** . HAB Publication Series, vol. 1, UNESCO, 1995.

JARDIM, F. A.; VIANA, T. H. Análise de algas – Cianobactérias e cianotoxinas como parâmetros de controle do tratamento da água para abastecimento. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, 2003, Joinville, SC.

JOCHINSEN, E. M.; WAYNE, M.D; CARMICHAEL, W.; AN, J.; CARDO, D.M; COOKSON, S.T.; HOLMES, C. E.M.; A NTUNES, B.C.; MELO FILHO, D.A.; L YRA, T. M.; BARRETO, V. S.T.; A ZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to Microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, 1998.

JONES, W.W.; SAUTER, S. **Distribution and Abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana Lakes and Reservoirs** .School of Public and Environmental Affairs, Indiana University , 2005.

KINNEAR, S.H.W; DUIVENVOORDEN, L.J. ; FABBRO, L.D. Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. **Harmful Algae**, v.6, p. 642–650, 2007.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

KOKOCINSKI, M.; DZIGA, D.; SPOOF, L.; STEFANIAK, K.; JURCZAK, T.; MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; MERILUOTO, J. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. **Chemosphere**, v. 74, p. 669–675, 2009.

LABTOX - **Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina**. Disponível em : <<http://www.ens.ufsc.br/labs/toxicologia.ambiental/index.html>>. Acesso dia 20 mar 2008.

LAMPERT, W., SOMMER, U., **Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams**. Oxford University Press, New York, 1997.

LAUDARES-SILVA, R. **Aspectos limnológicos, variabilidade espacial e temporal na estrutura da comunidade fitoplânctônica da Lagoa do Peri, Santa Catarina, Brasil**. 1999. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

LEMOS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. R.; OLIVEIRA, N.C.D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p.391–401, 2007.

LEMOS, C. T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured Lymphocytes. **Mutation Research**, v. 467, p. 1–9, 2000.

LEMOS, C. T.; IRANÇO, F. A.; OLIVEIRA, N. C. D.; SOUZA, G. D.; FACHEL, J. M. G.; Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. **Science of the Total environment**, v. 406, p.337-343, 2008.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; MAHAKHANT, A.; NOPARATNARAPORN, N.; YONGMANITICHAI, W. ; KAYA, K.; WATANABE, M.M.; Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon**, v. 39, p. 973 -980, 2001.

LI, Y; SHENG, J.; SHA, J.; HAN X.; The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats *in vivo* and *in vitro*. **Reproductive Toxicology**, v.26, p.239–245, 2008.

LUND, J.W.H.; KIPLING, C. & LECREN, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal number and statistical basis of estimating by counting. **Hydrobiologia**, v. 11, p. 143–170, 1958.

MACHADO, V.G. **Determinação do potencial tóxico e genotóxico de líquido percolado gerado em aterramento sanitário de resíduos sólidos urbanos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MARTINS, C.D.L., BARNECHE D.R., CORSO G., COSTA-ARAÚJO R., MACEDO-SOARES L.C.P., ZANK S.; FONTES, M.L.S. **A influência do incremento de nutrientes na produção primária em área marginal da Lagoa do Peri, SC in: Ecologia de Campo na Lagoa do Peri 2009** .Florianópolis Universidade Federal de Santa Catarina 2009.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M. A.; Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

MATSUZAKI, M.; MUCCI, J.L.N. ; ROCHA, A.A. **Comunidade fitoplânctônica de um pesqueiro na cidade de São Paulo** Revista de Saúde pública, 2004.

MATTHIENSEN, A. **Monitoramento de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas no corpo lagunar da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC**. Florianópolis: CASAN, 2001.p.18. Relatório Final da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento.

MCGREGOR, G. B. e FABBRO, L.D; Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v.5, p.195–205, 2000.

MELEGARI, S.P. **Impactos da saxitoxina na qualidade da água destinada ao consumo humano: Estudos do Mecanismo de Ação Tóxica e Processo de Remoção por Adsorção em Diferentes Matrizes Químicas**. 2008. Relatório de Qualificação- Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MELEGARI, S.P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água**. 2010. . Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MELO- FILHO, L.C. **Avaliação da ozonização como pré ou pós tratamento à filtração direta descendente na remoção de cianobactérias e saxitoxinas**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

MENDONÇA, J.M. S. **Avaliação da toxicidade de florações naturais e de cultura de cianobactérias: efeitos sobre *Ceriodaphnia silvestrii* (crustácea, cladocera)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

MENDOZA-VERA, J. M.; KÂ, S.; CUOC, C. ; BOUVY, M.; PAGANO, M.; Decline of *Pseudodiaptomus hessei* (Copepoda, Calanoida) in two water bodies located in the Senegal River hydrosystem (West Africa): Hypotheses and perspectives. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, p.740–750, 2008.

METCALF, J.S.; LINDSAY, J.; BEATTIE, K.A.; BIRMINGHAM, S.; SAKER, M.L.; TOROKNÉ, A.K.; CODD, G.A. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons

with protein synthesis inhibitors and microcystins. **Toxicon**, v. 40, p.1115-1120, 2002.

MIELLI, A.C.; MATTA, M. E.M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P.H.N.; UMBUZEIRO, G.A.; Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 2008.

MIYAKI, C.; PRAL, M.M.; GALLINA, N.M.F.; RIZZO, E. Micoplasma como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. **Rev. saúde pública**, v. 23, p.39-44, 1989.

MOHAMED, Z.A. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters' **FEMS Microbiology Ecology** , v. 59, p.749-761, 2006.

MONDARDO, R. I. **Influência da pré-oxidação na tratabilidade das águas via filtração direta descendente em manancial com elevadas concentrações de microalgas e cianobactérias**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MONDARDO, R. I. **Avaliação da filtração em margem como pré-tratamento à filtração direta descendente na remoção de células de cianobactérias e saxitoxinas**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

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

MOSER, M.C. **Avaliação toxicológica de cianobactérias presentes no sistema de abastecimento de água da Lagoa do Peri**. 2007. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em

Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

NOGUEIRA, I.C. G. ; SAKER, M.L. ; PFLUGMACHER, M.L. ; WIEGAND, C.; C.; C.; VASCONCELOS, V.M. Toxicity of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. **Wiley Periodicals, Inc.** , 2004

NOGUEIRA , I. C.G. ; CUNHA , A.L.; VASCONCELOS, V. M.; Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p.194–203, 2006.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K.; Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109–149, 2004.

OHTANI, I.; MOORE, R. E.; RUNNEGAR, M. T. C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 7941-7942, 1992.

OKUMURA, D. T., SOTERO-SANTOS, R. B., TAKENAKA, R. A. & ROCHA, O. Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. **Ecotoxicology**, v.16, p. 263-270, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; **Análise sedimentar em zonas costeiras** : subsídio ao diagnóstico ambiental da Lagoa do Peri - Ilha de Santa Catarina-SC, Brasil. 2002. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

PADISÁK, J.; *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium; worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv fur Hydrobiologie Supplement**. v. 107, p. 563–593, 1997.

PEREIRA DOS SANTOS, H. A. **Estudo da toxicidade de *Cylindrospermopsis raciborskii* na Lagoa do Peri, Florianópolis-SC: Subsídios para estratégias de manejo.** 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

RABELO, L. P. **Estudos preliminares para implantação da filtração em margem na Lagoa do Peri como pré-tratamento de água para remoção de fitoplâncton.** 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ROBERT, C.; TREMBLAY, H.; DeBLOIS, C. **Cyanobactéries et cyanotoxines au Québec : suivi à six stations de production d'eau potable (2001-2003).** Direction Générale des Politiques, 2005. 73 p.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados.** 6.ed.: Ed Roca. 1996 .

SAKER, M.L.; EAGLESHAM, G. K.; The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Toxicon**, v.37 , p. 1065-1077, 1999.

SAKER, M.L.; NOGUEIRA, I.C.G.; VASCONCELOS V.M.; Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) in portuguese freshwaters. **Limnetica**, v. 22, p. 129-136, 2003.

SANEVAS, N.; SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H.; Crude extract of the cyanobacterium, *Hapalosiphon sp.*, causes a cessation of root elongation and cell division in several plant species. **Weed Biology and Management**, p. 25-29, 2006.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras.** Rio de Janeiro: Interciência, 2006.

SANT'ANNA, C. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v.26, p. 251-265, 2008.

SAR, E.A., FERRARIO, M. E. & REGUERA, B., (Eds.), **Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano**. Instituto Español de Oceanografía, 2002, 311p.

SENS, M.L.; DALSSASSO, R.L.; MONDARDO, R.I.; MELO FILHO, L.C. Filtração em margem. **In: Pádua, V.L. (coord). Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano**. Rio de Janeiro: ABES- Prosab 4, 2006, 173-236p.

SENS, M.L.; MELO FILHO, L.C.; MONDARDO, R.I.; PROENÇA, L. A. O. Ozonização: uma alternativa para o tratamento de água com cianobactérias. **Revista de ciência & tecnologia**, v.13, p. 47-54, 2005.

SHEN, X.; LAM, P.K.S. ; SHAW, G.R. ; WICKRAMASINGHE, W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, Cylindrospermopsin. **Toxicon** , v.40, p.1499–1501, 2002.

SILVA, J. O USO DO ENSAIO COMETA PARA O ENSINO DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA. **Genética na escola**, 2007.

SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R, SPEIR, G.; ERDMANN, B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetic and molecular biology**, p. 241-345 , 2000.

SILVA, R.R.P. **Avaliação da toxicidade aguda e genotoxicidade de extrato de floração de *Microcystis ssp* para peixes de água doce**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia)- Universidade de Brasília, 2009.

SILVEIRA, A.A. **Remoção de algas da água da Lagoa do Peri através de filtração direta descendente com pré-filtração mecânica em micropeneiras**. 2003. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SIMONASSI, J.C.; **Caracterização da Lagoa do Peri, através da análise d parâmetros físico-químicos e biológicos, como subsídios ao gerenciamento dos recursos hídricos da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. 2001.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SINGH, N.P. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental.Cell Research*. v.175, p.184-191, 1988.

SIQUEIRA,, D.B.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciências da Saúde*, v.3,p.109-127.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health. Consequences, monitoring and management.** London: E&FN Spon, 1999. p. 41-91.

SOUID-MENSI, G.; MOUKHA, S.; MOBIO, T.A.; MAAROUFI, K. E ,CREPPY E.E.; The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicol*, v. 51, p. 1338– 1344, 2008.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2005. Standard Methods (APHA, AWWA, WPCF, 2005).

STIRLING, D. J.; QUILLIAM, M.A., First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zeland. *Toxicol*, v. 39, p.1219-1222, 2001.

TAKENAKA R. A.; . DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J; ROCHA, O. Toxicidade de Extratos de Florações de Cianobactérias de Reservatórios do Rio Tietê, SP, aos Dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea) *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, p. 147-156, 2007.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; ITO, E. & WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 32, p.833-843, 1994.

TICE, R. R. ; AGURELL, E. ; ANDERSON, D. ; BURLINSON, B. HARTMANN, ; A. KOBAYASHI, H. ; MIYAMAE, Y. ; ROJAS, E. ; RYU, J.-C. ; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing.

Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 35, p.206-221, 2000.

TRABEAU, M.; BRUHN-KEUP, R.; MCDERMOTT, C.; KEOMANY, M.; MILLSAPS, A.; EMERY, A.; STASIO JR, B. Midsummer decline of a *Daphnia* population attributed in part to cyanobacterial capsule production. **Journal of Plankton Research** , v.26, p. 949–961 , 2004.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 26, p. 97-112, 2003.

UNESCO - Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura. Disponível em: <<http://www.unesco.org/ioc>>. Acesso em 03 maio 2005.

VALÉRIO, E.; PEREIRA, P.; SAKER, M.L.; FRANCA, S.; TENREIRO, R. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. **Harmful Algae**, v. 4, p. 1044–1052, 2005.

VIDAL, L.; KRUK, C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* , v. 3, p. 142-151, 2008.

WHITE , S.H. ; DUIVENVOORDEN , L.J. ; FABBRO , L.D. ; EAGLESHAM, G.K. Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). **Toxicon** v. 47 , p. 497–509, 2006.

WHITE , S.H. ; DUIVENVOORDEN , L.J. ; FABBRO , L.D. ; EAGLESHAM, G.K. Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures . **Environmental Pollution**, v. 147 , p. 158-167, 2007.

WIEDNER, C.; RICKER, J.; STUKEN, A.; PREUBEL, K.; FASTNER, J.; CHORUS, I.; NIXDORF, B. ***Cylindrospermopsis raciborskii* and Cylindrospermopsin in Lakes of the Berlin area: Occurrence, Causes and Consequences**. Berlin, 2007.

WOOD, S. A. ; STIRLING, D. J. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium ***Cylindrospermopsis raciborskii*** in New Zealand *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 37, p. 821-828, 2003.

YOUNG, F. M.; MICKLEM, J.; HUMPAGE, A.R. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. **Reproductive Toxicology**, v. 25 , p. 374–380, 2008.

YUNES, J. S.; CUNHA, N. T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L. A. O.; MONSERRAT, J. M. Cyanobacterial neurotoxins from southern brazilian freshwaters. **Comments on Toxicology**, v. 9, p. 103-115, 2003.