

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

MONOGRAFIA DE FINAL DE CURSO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE
CIANOBACTÉRIA DO LAGO ORNAMENTAL DO
OURO MINAS GRANDE HOTEL E TERMAS
DE ARAXÁ - MG

Filipe Silveira Nascimento

Belo Horizonte
2011

Filipe Silveira Nascimento

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS DO
LAGO ORNAMENTAL DO OURO MINAS GRANDE HOTEL E
TERMAS DE ARAXÁ - MG**

Monografia apresentada ao programa de Pós Graduação
em Tecnologia Ambiental, do Departamento de
Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade
Federal de Minas Gerais.

Orientador: Marcelo Libânio

Belo Horizonte
2011

Nascimento, Filipe Silveira
Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias do Lago Ornamental
do Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá - MG, 2009.
Orientador: Marcelo Libânio
Monografia (Especialização) – Universidade Federal de Minas
Gerais, Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental.
Bibliografia
1. Cianobactérias. 2. Cianotoxinas. 3. Bioensaio.

Filipe Silveira Nascimento

Avaliação da Toxicidade de Cianobactéria do Lago Ornamental do Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá - MG

Monografia apresentada ao curso de Tecnologia Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte, 2011.

Nome da banca – UFMG

Nome da banca

Nome da banca

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem o apoio e disposição de todo o pessoal do laboratório de águas da COPASA-MG. Gostaria de agradecer-los pela grata companhia e aprendizado transmitido. Em especial, agradeço à Patrícia Couto pela ajuda, companheirismo e acima de tudo amizade. Agradeço também ao Fernando Jardim, Adriana e Cidinha pela excelente supervisão e disposição e por serem tão acessíveis.

Agradeço ao professor Marcelo Libânio por todo o apoio e disponibilidade.

Agradeço a meus pais por não medirem esforços em viabilizar todos meus sonhos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: “Blooms”. Exemplo de floração de Cianobactéria.....	14
Figura 02: Evidência de heterocito terminal em cianobactéria da espécie <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 400x.....	16
Figura 03: As diferentes morfologias de Cianobactérias	17
Figura 04: Fórmula da Saxitoxina.....	20
Figura 05:Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá.....	27
Figura 06: Coleta superficial do seston contendo a floração de cianobactérias.....	28
Figura 07: Ponto de coleta.....	29
Figura 08: Medição das células de <i>Anabaena plactônica</i>	30
Figura 09: Seston concentrado em pré filtros e triturados em água deionizada	32
Figura 10: Camundongos machos da espécie Swiss sp. utilizados para realização de bioensaios.....	33
Figura 11: Kit ELISA.....	34
Figura 12: Filamentos de <i>Anabaena planctônica</i> com bainha e heterocito evidenciados com tinta Nanquin. 400 X	35
Figura 13: Filamentos de <i>Anabaena spiroides</i> com bainha e heterocito evidenciados com tinta Nanquin. 400 X.	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Correlação entre as cianotoxinas e seus modos de ação.....	19
Quadro 02: Classes e densidade de Cianobactérias determinadas pela Resolução do Conama no 357/2005.....	24
Quadro 03: Valores de DL ₅₀ relacionados com níveis de toxicidade para amostras de seston.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Relação do peso corpóreo com a dose injetada do material liofilizado nos animais-teste	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

cél.	célula
et.al.	“and others”
g	grama
Hab.	habitantes
kg	quilograma
km	quilômetros
mL	mililitro
mg	miligrama
mm	milímetro
µg/L	micrograma por litro

LISTA DE SIGLAS

A.P.H.A.	American Public Health Association
CBMM	Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
DL ₅₀	Dosagem Letal para 50% dos animais testados
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorvent Assay
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.p.	Intra-peritoneal
MG	Minas Gerais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PE	Pernambuco
PSP	Paralytic shellfish poisoning
Portaria MS	Portaria do Ministério da Saúde
RS	Rio Grande do Sul

RESUMO

A ocorrência de florações de cianobactérias é relatada comumente em diversos países inclusive no Brasil, onde as diversas espécies podem causar impactos negativos sobre a qualidade da água podendo liberar toxinas, causar gosto e odor desagradáveis além de deteriorar sua qualidade. No presente trabalho foi avaliada, em julho de 2009, a presença de cianobactérias e cianotoxinas, por meio da metodologia ELISA e bioensaio em camundongos, no lago ornamental do Ouro Minas Grande Hotel de Termas de Araxá. Apesar de ser detectada a presença em grande número de *Anabaena planctônica*, a cepa não se mostrou tóxica após serem realizados ensaios de toxicidade. Entretanto, novas florações no local podem tornar a área um risco para a população uma vez que utilizam a água para pesca e recreação, com danos em curto prazo como irritação na pele ou em longo prazo no caso de pesca. A partir disso, é necessário realizar o monitoramento constante dessas florações.

Palavras-chave: Saxitoxina; ELISA; Bioensaio; Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá.

ABSTRACT

Several occurrences of cyanobacteria blooms are commonly reported in many countries including Brazil, where a large amount of species can cause negative impacts on the water quality, releasing toxins, causing bad taste and also some unpleasant smell. During the elaboration of this work, the water of Ouro Minas Grande Hotel Termas de Araxá lake's was analyzed with ELISA and mouse bioassay procedures. Despite the occurrence of a large amount of *Anabaena planctonica*, the strain was not toxic. Anyway, new local blooms can be a risk to the population, since that the water is used to fishing and recreation, causing damages like skin irritation and also long-term problems resulting from fish ingestion. With that in mind, a constant monitoring of the water would be the most prudent decision to make.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
CIANO BACTÉRIAS	15
CIANOTOXINAS.....	17
LEGISLAÇÃO ASSOCIADA À CIANOTOXINAS.....	21
GERAL 25	
ESPECÍFICOS	25
ÁREA DE ESTUDO.....	25
3.1.1 OURO MINAS GRANDE HOTEL E TERMAS DE ARAXÁ.....	26
LOCALIZADO A CINCO QUILOMETROS DO CENTRO DA CIDADE DE ARAXÁ E SITUADO NA ESTÂNCIA DO BARREIRO, O OURO MINAS GRANDE HOTEL E TERMAS DE ARAXÁ FOI INAUGURADO EM 1944, POR BENEDITO VALADARES, ENTÃO GOVERNADOR DE MINAS GERAIS, E PELO PRESIDENTE GETÚLIO VARGAS. O COMPLEXO DO GRANDE HOTEL ABRIU UMA NOVA ERA PARA ARAXÁ E TODO O INTERIOR MINEIRO, SENDO PALCO DE GRANDES ACONTECIMENTOS SOCIAIS, POLÍTICOS E CULTURAIS.....	26
COLETA E PRESERVAÇÃO DA AMOSTRA.....	27
ANÁLISE HIDROBIOLÓGICA	28
LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE CIANOTOXINAS.....	30
BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS.....	31
IMUNOENSAIO DO TIPO ELISA.....	33
A COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA.....	34
RESULTADO DE SAXITOXINA PELO KIT ELISA.....	35
O RESULTADO QUANTITATIVO DO KIT ELISA DETECTOU, NA FRAÇÃO PARTICULADA, 0,01 MG.L-1 DE SAXITOXINAS, O QUE DEMONSTRA NÃO SER UMA CEPA TÓXICA.	35
O BIENSAIO EM CAMUNDONGOS	35
COM A REALIZAÇÃO DO BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS FOI POSSÍVEL VERIFICAR ALGUNS SINTOMAS CARACTERÍSTICOS DE INTOXICAÇÃO POR HEPATOXINAS, QUAIS SEJAM: CONTRAÇÕES ABDOMINAIS, EREÇÃO PILÓRICA E FOTOFOBIA. NO PRIMEIRO GRUPO DE ORGANISMOS TESTADOS OS SINTOMAS FORAM MAIS ACENTUADOS E COM MAIOR DURAÇÃO ISSO PELO FATO DE TEREM RECEBIDO DOSAGEM DE MAIOR CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (100%). ENTRETANTO, APÓS TRÊS DIAS DE OBSERVAÇÃO O TESTE DE TOXICIDADE NÃO OBTVEU DOSAGEM LETAL PARA 50% DOS ANIMAIS TESTADOS (DL50), NÃO SENDO OBSERVADA A MORTE DESSES ANIMAIS. A TABELA 01 APRESENTA A RELAÇÃO DO PESO CORPÓREO COM A DOSE INJETADA DO MATERIAL LIOFILIZADO NOS ANIMAIS-TESTE.	36
5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

INTRODUÇÃO

Considerações iniciais

A água é um elemento essencial para que a vida exista na Terra, pois nenhum processo metabólico ocorre sem sua ação direta ou indireta. A qualidade da água está intimamente relacionada à manutenção da integridade biológica dos ecossistemas aquáticos. Assim como para os demais animais, o uso humano também depende da boa qualidade da água, que deve atingir condições mínimas para que possa ser ingerida (TONIETTO, FONSECA & GUIMARÃES, 2008).

Nos últimos anos, entretanto, vários ecossistemas aquáticos encontram-se eutrofizados devido, dentre outras causas, ao rápido e desordenado crescimento e ocupação populacional (TONIETTO, FONSECA & GUIMARÃES, 2008). Segundo Azevedo e Brandão (2001) a utilização extensa de fertilizantes na agricultura, a descarga de esgotos industriais e domésticos sem nenhum tratamento causa mudanças na qualidade da água, tais como: redução de oxigênio dissolvido, aumento do custo de tratamento da água para consumo humano quando se trata de manancial de abastecimento público, morte extensiva de peixes, decréscimo na diversidade de espécies da comunidade fitoplanctônica e aumento da incidência de floração de microalgas, especialmente de cianobactérias gerando a chamada eutrofização. (TUNDISI & TUNDISI, 1992).

Eutrofização é o aumento da produção primária em sistemas aquáticos como consequência da elevação dos níveis de nutrientes, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados. Este pode ser um processo natural ou artificial (ação antrópica). Quando natural, é lenta e contínua e resulta do aporte de nutrientes trazidos pelas chuvas e pelas águas superficiais que lavam a superfície terrestre. O processo é dinâmico e leva a modificações qualitativas e quantitativas na comunidade aquática, nas características químicas e físicas do meio e, principalmente, no nível de produção. Quando ocorre artificialmente pelas diversas maneiras já citadas anteriormente, pode indicar um problema de poluição na água. Uma das consequências da eutrofização é o crescimento exacerbado de cianobactérias nos corpos d'água, fenômeno conhecido como floração ou *blooms* (ESTEVES, 1998).

Florações de cianobactérias representam um dos impactos negativos sobre a qualidade da água, podendo causar gosto e odor desagradáveis e liberação de toxinas, deteriorando sua qualidade (TONIETTO, FONSECA & GUIMARÃES, 2008).



Fig. 01: Exemplo de floração de Cianobactéria em manancial - MG.
Foto: Fernando Jardim

Intoxicações de populações humanas pelo consumo de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países de todo o mundo como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (FALCONER, 1994). No Brasil, já foram registrados inúmeras ocorrências de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento, nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul (FERNANDES *et al.*, 2005). JARDIM *et al.* (2000), verificaram a ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas em vários mananciais do Estado de Minas Gerais.

O primeiro caso confirmado cientificamente sobre a toxicidade das cianobactérias ocorreu em Caruaru (PE) em 1996, quando aproximadamente 60 pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise faleceram em decorrência da intoxicação hepática por uma cianotoxina denominada microcistina (AZEVEDO, 1998). Outro episódio que se destacou, foi a ocorrência de 2000 casos de gastroenterite, sendo que 88 resultaram em morte, na região de Paulo Afonso, BA (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

Para o manejo dos recursos hídricos, o conhecimento da quantidade e distribuição de cianobactérias tóxicas e não tóxicas é essencial. Florações destes organismos podem causar danos à qualidade da água, como a depleção de oxigênio dissolvido e conseqüentemente

morte de peixes, prejuízos estéticos (lazer), e impalatabilidade e/ou não potabilidade da água (VICENT *et al.*, 2004).

Cianobactérias

Cianobactérias ou cianofíceas são microorganismos autótrofos, procariontes sendo a fotossíntese sua principal fonte para obtenção de energia e manutenção metabólica. Seus processos vitais requerem água, gás carbônico e substâncias inorgânicas como nitrogênio e fósforo (CARNEIRO & LEITE, 2008).

O nome popular desses organismos, “algas azuis”, vem da coloração verde-azulada das células quando vistas ao microscópio. Isso acontece porque suas células contêm diferentes pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila *a* – que dá coloração esverdeada-, ficocianina que é azul e algumas espécies possuem também um pigmento vermelho, a ficoeritrina (SANT’ANNA *et al.*, 2006). Sua reprodução é assexuada, por simples divisão da célula.

Cianobactérias são representantes de um grupo de seres vivos muito antigos, provavelmente, são os primeiros organismos fotossintetizantes com clorofila-*a*. De acordo com registros fósseis, surgiram na Terra há mais de 3,5 bilhões de anos sendo que sua grande proliferação ocorreu há cerca de dois bilhões de anos. Possivelmente, foram as responsáveis pelo acúmulo de O₂ na atmosfera primitiva, o que possibilitou o aparecimento da camada de Ozônio (O₃), que retém parte da radiação ultravioleta, permitindo a evolução de organismos mais sensíveis à radiação UV (CHORUS & BARTRAM, 1999).

As cianobactérias podem viver em diversos ambientes e condições extremas. Podem ser terrestres, de água doce, salobra ou marinha, além de aparecerem em habitats como fontes termais (em temperaturas de até 74°C), neve (em temperaturas próximas e abaixo de 0°C) e deserto (SANT’ANNA *et al.*, 2006).

A morfologia básica das cianobactérias compreende formas unicelulares, coloniais e multicelulares filamentosas, podendo estas serem ou não ramificadas e portadoras ou não de células especializadas, os heterocitos que são responsáveis por armazenar nitrogênio do ar (Figura 02). Muitas espécies de cianobactérias possuem vesículas de gás que são inclusões citoplasmáticas capazes de proporcionar regulação na flutuação e são estruturas cilíndricas

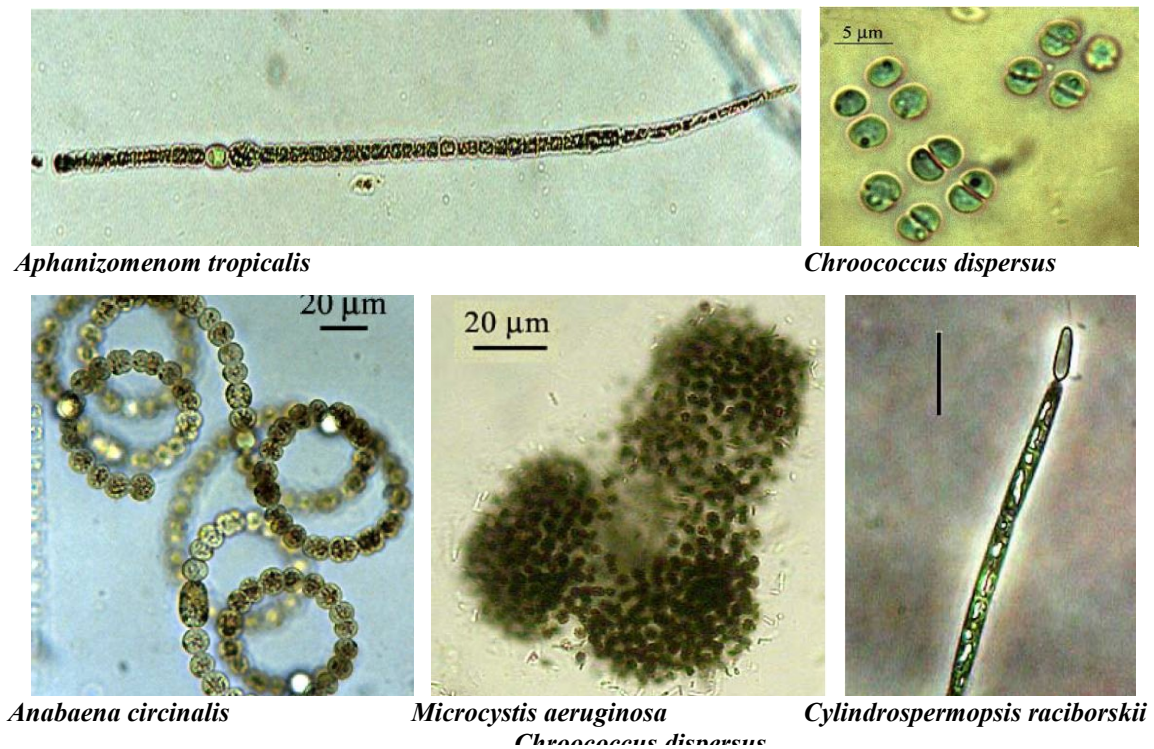
que se enchem de gás. A sua função é dar às espécies planctônicas um importante mecanismo ecológico de serem capazes de ajustar a sua posição vertical na coluna de água (MUR *et al.* 1999).



Fig. 02: Evidência de heterocito terminal em cianobactéria da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* 400x.
Foto: Patrícia Couto

Florações de cianobactérias além de provocar desequilíbrios ecológicos, podem produzir gosto e odor desagradável (metabólitos como a geosmina e o 2-methylisoborneol) na água e também produzir toxinas (SANT'ANNA *et al.*, 2006). A liberação de toxinas é uma importante preocupação sanitária, uma vez que as toxinas não podem ser retiradas pelos sistemas de tratamento de água tradicionais e nem pela fervura. A produção de tais substâncias possui um caráter de defesa contra a predação, mas com a proliferação das cianobactérias nos mananciais de água potável das cidades, estas passaram a ser uma grande preocupação para as companhias de tratamento de água.

Atualmente são conhecidos cerca de 150 gêneros e 2.000 espécies de cianobactérias – alguns exemplificados na figura 3 - dos quais aproximadamente 40 gêneros são descritos como produtores de cianotoxinas, o que torna o estudo da morfologia e fisiologia desses microorganismos extremamente importante (CARMICHAEL & FALCONER, 1993).



Aphanizomenon tropicalis

Chroococcus dispersus

Anabaena circinalis

Microcystis aeruginosa

Cylandrospermopsis raciborskii

Chroococcus dispersus

Fig. 03: As diferentes morfologias de Cianobactérias.
Fonte: Atlas de Cianobactérias e Microalgas de Águas Continentais Brasileiras.

Cianotoxinas

As cianotoxinas são substâncias que se enquadram entre as mais letais aos organismos pluricelulares. São produzidas por linhagens de espécies de alguns gêneros de cianobactérias, incluindo *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylandrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria* de acordo com Carmichael (1992). Os casos de envenenamento começaram a surgir no final do século XIX, envolvendo enfermidades e mortes em gado, animais de estimação e animais selvagens, seguidos da ingestão de água contaminada com as células de algas tóxicas ou com as toxinas liberadas (CARMICHAEL, 1992).

Como resultado da exposição às cianotoxinas, mamíferos aves e peixes têm sido envenenados mundialmente por ocasiões de florações de cianobactérias (FERREIRA, 2004). Registros de sintomas alérgicos em banhistas de águas com massivo desenvolvimento de cianobactérias são amplamente conhecidos (CHORUS & BARTRAM, 1999), incluindo relatos de sintomas como conjuntivites, dermatites e distúrbios gastrintestinais.

As toxinas biossintetizadas por cianobactérias constituem um grupo quimicamente heterogêneo apresentando, portanto, diferentes propriedades toxicológicas (SANT'ANNA *et*

al., 2006). Segundo Jardim *et al.* (2001) as cianotoxinas são classificadas em hepatotoxinas, neurotoxinas, endotoxinas (lipopolissacarídeos) e dermatotoxinas. Essa classificação é realizada de acordo com o modo de ação das mesmas nos órgãos e tecidos animais. Cunha e Bittencourt-Oliveira (2000) salientam que as duas principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são as neurotoxinas e hepatotoxinas, por suas ações farmacológicas.

A princípio, todas as cianobactérias são consideradas potencialmente tóxicas, entretanto, é necessário salientar que mesmo a exposição a níveis baixos de microcistina (a mais comum das cianotoxinas) é também considerada um risco para a saúde humana, uma vez que microcistinas (e nodularinas) são promotores de tumores hepáticos (SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Em ambientes aquáticos, as cianotoxinas normalmente permanecem contidas nas células das cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre durante a fase de senescência (morte natural), estresse celular, uso de algicidas, como sulfato de cobre ou cloração. Contudo, a ocorrência de espécies potencialmente tóxicas em ambientes aquáticos precisa ser muito bem investigada e monitorada a fim de evitar danos à saúde animal e humana e ao ecossistema como um todo.

QUADRO 01: Correlação entre as cianotoxinas e seus modos de ação.Fonte: SANT'ANNA *et al.*, 2000.

Modo de Ação	Cianotoxina	Sintomatologia	Gênero	Bibliografia
Hepatotoxinas	1) Microcistinas	Diarréia, vômitos, piloereção, fraqueza, palidez (A morte ocorre por choque hemorrágico - a relação entre pesos fígado/peso corpóreo aumenta de 5 para 8-10%)	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Aphanocapsa</i> e <i>Oscillatoria</i>	Miura et al, (1991); Rineheart et al (1994); Yoo et al (1995); Sivnem (1996); Dawson (1998); Nascimento & Azevedo (1999); Domingos et al (1999); Brittain et al (2000)
	2) Nodularinas	Semelhantes a das microcistinas	Nodularia	Rineheart et al, (1994); Saito et al, (2001)
Nerotoxinas	Saxitoxinas, Anatoxinas e Homoanatoxina	Paralisia progressiva dos músculos, diminuição dos movimentos, exagerada respiração abdominal, cianose, convulsões, parada respiratória e morte. Resposta muito rápida à toxina, podendo ocorrer a morte do animal-teste em poucos minutos	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Mahmood & Carmichael (1986); Sivonem et al (1989); Carmichael et al (1990); Lagos et al (1999); Kuiper-Goodman et al (1999)
Dermatotoxinas	(Pigmentos e lipopolissacarídeos de cianobactérias em geral)	Irritação nos olhos, na pele, febre, tontura, fadiga e gastroenterite aguda	(Cianobactérias em geral)	Kaye (1996); Kuiper-Goodman et al (1999)
Outros	Cilindrospermopsina	A toxina age de forma lenta e progressiva, atingindo órgãos como rins e fígado, sobrevivendo a morte em até 7 dias.	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Ohtani et al, (1992); Terao et al, (1994); Banker et al, (1997)

1.3.1 Neurotoxinas

As neurotoxinas têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos de ação rápida, que inibem a condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio, afetando a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas. Os sinais clínicos de intoxicação

humana incluem tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia, podendo causar a morte após poucos minutos de exposição. São produzidas por espécies incluídas nos gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1992).

Dentre as toxinas presentes neste grupo, se destacam as Saxitoxinas que são produzidas por algumas cianobactérias, mas foram primeiramente isoladas de dinoflagelados marinhos responsáveis pela ocorrência de marés vermelhas. A intoxicação por Saxitoxina é designada como envenenamento por Toxina Paralisante (PSP- Paralytic Shellfish Poisoning), sendo-lhe atribuídos vários sintomas característicos que podem culminar na morte por paralisia respiratória.

Devido à toxicidade, a Saxitoxina é alvo de contínuos estudos com o objetivo de facilitar a sua detecção, evitar futuros surtos de PSP e estabelecer uma terapia adequada.

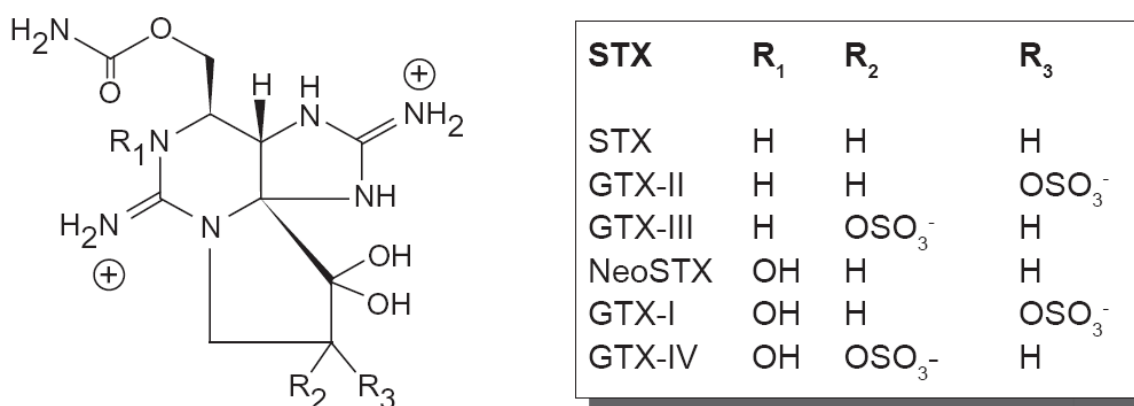


Fig. 04: Fórmula de Saxitoxina. As variantes das Saxitoxinas são formadas pela substituição dos radicais R₁, R₂ e R₃.

Fonte: Carmichael (1988).

1.3.2 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas são produzidas por espécies e cepas de cianobactérias, incluindo os gêneros: *Anabaena*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis*. Sendo o tipo mais comum de intoxicações envolvendo cianobactérias e apresentam uma ação mais lenta,

causando a morte entre poucas horas e poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. Os sinais observados após a ingestão dessas hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia (CARMICHAEL, 1992). Após a ingestão oral da toxina, ela chega ao sistema digestivo e é levada ao íleo, passando via sistema porta para o fígado. A exposição crônica da toxina pela ingestão de água pode aumentar o índice de câncer hepático (CHORUS & BARTRAM, 1999).

1.3.3 Dermatotoxinas

Segundo Sant'anna (2006), algumas substâncias sintetizadas por algas causam severas dermatites de contato: são os lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede celular de todas as bactérias Gram-negativas, incluindo as cianobactérias; são agentes pirogênicos, capazes de induzir irritação na pele e alergias. As moléculas das LPS são formadas por carboidratos (normalmente hexoses) e lipídeos (ácidos graxos de cadeias C₁₄ a C₁₈), delas existindo muitas variantes.

Se ingeridas, essas toxinas induzem, tanto em humanos quanto em animais de experimentação, uma série de efeitos que incluem neutropenia, trombocitopenia, níveis anormais de glicose e mudanças metabólicas, como acidose e alcalose. Os primeiros estudos sobre essas cianotoxinas foram realizados com os gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Anacystis* (SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Legislação associada à cianotoxinas.

Em um cenário de risco potencial a saúde, cianobactérias e cianotoxinas vêm ganhando espaço em normas relacionadas à saúde e qualidade ambiental, em todo o mundo.

Poucas referências propõem valores limites para cianobactérias e cianotoxinas. A Organização Mundial da Saúde, por meio do adendo da segunda edição do “Guidelines for drinking-water quality” (WHO, 1998), concluiu que não havia dados suficientes que possibilitassem a definição de valores de referência para qualquer outra cianotoxina, além da microcistina-LR. Who (1998), recomendou o valor limite máximo para microcistina-LR total (livre mais intracelular) de 1µg/L, considerando a exposição através da água de consumo humano. A terceira e mais recente edição do “Guidelines for drinking-water quality” manteve

o mesmo valor para microcistina-LR e não apresentou valores para as demais cianotoxinas (WHO, 2003).

O Guia “Australian Drinking Water Guidelines”, (ADWG, 1996) apresentou valor de referência para microcistina-LR total de 1, 3µg/L, diferindo do proposto por WHO para a água de consumo humano. A investigação para definição de ambos os valores foi semelhante (FALCONER *et al.*, 1999), utilizando o estudo de bioensaio de camundongos. Entretanto, o valor de referência difere devido a incorporação de pesos corporais médios diferentes para adultos (média de 70Kg para ADWG e de 69Kg para WHO) e a diferença na proporção de ingestão diária de microcistina atribuída ao consumo da água.

Atualmente o Brasil é o único país que estabelece limites para densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas em norma nacional, como força de lei. A Portaria 2914 do Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011 e a Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) regem a presença, os impactos, os limites e os riscos que as cianobactérias podem promover aos organismos humanos por balneabilidade ou por ingestão.

A Portaria MS n.º 2914, de 12 de dezembro de 2011 estabelece as responsabilidades por parte de quem produz a água, no caso, os sistemas de abastecimento de água e de soluções alternativas, a quem cabe o exercício de “controle de qualidade da água” e das autoridades sanitárias das diversas instâncias de governo, a quem cabe a missão de “vigilância da qualidade da água para consumo humano”. Também ressalta a responsabilidade dos órgãos de controle ambiental no que se refere ao monitoramento e ao controle das águas brutas de acordo com os mais diversos usos, incluindo o de fonte de abastecimento de água destinada ao consumo humano.

Como um dos padrões de potabilidade, para substâncias que representam risco a saúde, esta a microcistina como análise obrigatória e tendo valor máximo permitido de 1µg/L. Cilindrospermopsina e saxitoxinas são parâmetros recomendáveis, observando, respectivamente, os valores limites de 15,0 µg/L e 3,0 µg/L de equivalentes STX/L.

A análise de cianobactérias e cianotoxinas e comprovação de toxicidade por bioensaios em camundongos, até o estabelecimento de especificações em normas nacionais ou internacionais que disciplinem a matéria, devem ser adotadas as metodologias propostas pela Organização

Mundial da Saúde (OMS) em sua publicação *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*.

O plano de amostragem estabelecido pela Portaria 2914 determina 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 (ou 1mm³/L de biovolume). Quando exceder 20.000 células/ml (2mm³/L de biovolume) será exigido 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.

Portanto, devem ser submetidas a uma análise mais apurada, sendo a Cromatografia em CLAE e o Imunoensaio do tipo ELISA, que permite uma detecção apurada em µg/L de toxina encontrada, além de permitir a detecção de outras toxinas que também podem estar presentes juntamente com a microcistina. O bioensaio é também recomendado no caso de florações de cianobactérias.

É também vedado o uso de algicidas para o controle de crescimento de cianobactérias ou qualquer intervenção no manancial que promove a lise das células desses microorganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder 20.000 células/mL, sob pena de comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados às cianotoxinas.

Com relação às normas ambientais, o Conselho Nacional de Meio Ambiente, através da resolução do CONAMA dispõe sobre a classificação dos corpos de água doce, salina e salobra do Território Nacional e cita diretrizes para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A citação sobre a densidade de cianobactérias define que as águas doces de Classe 1 tenham como valor máximo permitido de 20.000 cél./mL. Para classe 2 o valor máximo permitido é de 50.000 cél./mL. Para águas de Classe 3, existe uma peculiaridade, pois, separa o valor máximo permitido para dessedentação de animais com valor não excedendo 50.000 cél./mL, e para o enquadramento deste corpo d'água um outro valor máximo na tabela III, deste artigo, de 1000.000 cél./mL.

QUADRO 02: Classes e densidade de Cianobactérias determinadas pela Resolução do CONAMA 357/2005.

Fonte: Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA).

CLASSE 1	Densidade de Cianobactéria
As águas podem ser destinadas a: A) Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado. B) À proteção das comunidades aquáticas. C) À recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático, mergulho, conforme Resolução CONAMA n 274, de 2000 D) À irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e E) À aquicultura e a atividade de pesca.	20.000 céls/mL
CLASSE 2	
As águas podem ser destinadas a: A) Ao abastecimento para consumo humano. B) À proteção das comunidades aquáticas. C) À recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático, mergulho, conforme Resolução CONAMA n 274, de 2000 D) À irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e E) À aquicultura e a atividade de pesca.	50.000 céls/mL
CLASSE 3	
As águas podem ser destinadas a: A) Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado. B) À irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras. C) À pesca amadora. D) À recreação de contato secundário; e E) A dessedentação de animais.	100.000 céls/mL
CLASSE 4	
As águas podem ser destinadas a: A) À navegação B) À harmonia paisagística.	—

1.1 Métodos de identificação e quantificação de cianotoxinas

Os métodos analíticos hoje disponíveis para a detecção e quantificação de cianotoxinas se dividem em físico-químicos (HPLC-UV; HPLC-PDA; eletroforese capilar; LC/MS); bioquímicos (ensaio de inibição de fosfatase; ensaio de inibição de acetilcolinesterase; ELISA) ou biológicos (bioensaios; testes de toxicidade: estes somente para detecção).

2. OBJETIVOS

Geral

O principal objetivo desse projeto consiste em verificar o potencial tóxico da cepa de cianobactéria *Anabaena* do lago ornamental do Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá.

Específicos

- Avaliar o grau de toxicidade através do imunoenensaio do tipo ELISA e bioensaio em camundongos.
- Contribuir para o gerenciamento hídrico adequado do Ouro Minas Grande Hotel de Araxá.

3. METODOLOGIA

Área de estudo

Araxá é um município do estado de Minas Gerais, localizado a uma latitude $-19^{\circ} 35' 36''$ W e uma longitude $46^{\circ} 56' 26''$ W, situado na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Sua população estimada em 2007 foi de 87.772 habitantes. A área é de 1.165 km² e a densidade demográfica, de 67,80 hab/km² (IBGE, 2010).

A Estância Hidromineral de Araxá, no Sudoeste Mineiro, na Zona Geográfica do Alto Paranaíba, é propícia ao desenvolvimento dos diferentes ramos da atividade turística, devido a fatores históricos, geográficos e econômicos que definem o imenso potencial dessa região.

A mineração é a maior fonte geradora da economia de Araxá. A Vale Fertilizantes, produzindo minérios fosfatados, ao lado do nióbio que é explorado principalmente pela empresa CBMM, geram grande parte da economia de Araxá. Tem-se também grande contribuição do turismo, que possibilita em Araxá a exploração de suas águas medicinais, fabricação de sabonetes e cremes para a pele e possui um dos mais ricos artesanatos da região.

O município está localizado entre duas grandes Bacias Hidrográficas: Bacia do Rio Grande e Bacia do Rio Paranaíba, que possuem grande potencial hidrelétrico. O município possui uma área de proteção especial para fins de preservação de seus mananciais. Seus principais rios são: Rio Tamanduá, Rio Capivara (afluentes Rio Paranaíba).

Constituído de terras planas e colinas, a altitude máxima é de 1.359 metros e a mínima de 910 metros. O relevo do município mostra variações entre situações geológicas típicas do cerrado e de serras. Sua vegetação intercala campos de pastagens com pequenas matas naturais, compondo belas paisagens.

3.1.1 Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá

Localizado a cinco quilômetros do centro da cidade de Araxá e situado na Estância do Barreiro, o ***Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá*** foi inaugurado em 1944, por ***Benedito Valadares***, então governador de Minas Gerais, e pelo presidente ***Getúlio Vargas***. O complexo do Grande Hotel abriu uma nova era para Araxá e todo o interior mineiro, sendo palco de grandes acontecimentos sociais, políticos e culturais.

O Grande Hotel de Araxá se impõe pela magnitude de seu conjunto arquitetônico projetado por Luiz Signorelli com paisagismo de Burle Marx. Possui aproximadamente 43.000 m² de área construída.

O hotel mais tradicional de Araxá é também palco para muitas atividades de lazer. Além de toda estrutura disponível como piscinas, quadra de esportes, salões de jogos, etc. existem também os lagos ornamentais. Estes, além de complementarem a harmonia paisagística do local, são utilizados como diversão em atividades de pesca, pedalinho e caiaque.



Fig. 05: Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá.
Fonte: www.ourominas.com.br

Coleta e preservação da amostra

A amostra coletada no lago ornamental do Grande Hotel para teste de toxicidade foi feita próxima a sua margem, onde havia maior concentração de seston (nata sobrenadante de algas). A amostragem realizada em julho de 2008 se deu através da retirada de amostra da superfície do corpo lacustre com bombona de plástico de capacidade de 5 litros tendo sido medido no ponto de coleta os valores de temperatura e pH no momento. Duas bombonas foram recolhidas, dando um total aproximado de 10 litros de amostra coletada. Após a coleta, a amostra foi acondicionada em uma caixa de isopor com 15 litros de gelo, para manter a refrigeração. Posteriormente foi transportada para o laboratório de Hidrobiologia da COPASA em Belo Horizonte-MG.

A amostra de floração foi coletada para identificação, isolamento e obtenção de biomassa fitoplanctônica para liofilização e posterior determinação da toxicidade por bioensaios, da caracterização imunoquímica pelo imunoenensaio ELISA.



Fig. 06: Coleta superficial do seston contendo a floração de cianobactérias.
Foto: Fernando Jardim



Fig. 07: Ponto de coleta.
Fonte: Google Earth

Análise Hidrobiológica

As análises qualitativas e quantitativas das cianobactérias foram realizadas segundo os métodos CETESB (1978), COPASA - MG (1992) e A.P.H.A.(1995).

Até recentemente, a identificação de cianobactérias assentava em métodos taxonômicos tradicionais para análise de fitoplâncton, normalmente baseada em características morfológicas. Contudo, estes métodos nem sempre são suficientes, principalmente porque muitas cepas, quando em cultura, podem alterar as dimensões, forma ou características das colônias (NEILAN 2002). A informação obtida por análise microscópica pode, no entanto, ser importante para determinação de qual a melhor metodologia a usar (APELDOORN *et al.* 2007).

Para a determinação qualitativa do fitoplâncton, pequenas alíquotas da amostra viva foram depositadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínula, sendo analisadas em Microscópio AXIOSKOP 40/40 FL da CARL ZEISS e observadas nos aumentos de (10 x 25), (10 x 40) e (10 x 100) utilizando-se neste último, óleo de imersão. O microscópio apresentava ainda objetivas com contraste-de-fase e dispositivo de epifluorescência.

Para análise quantitativa do fitoplâncton, 10 mL da amostra foi separado após homogeneização da mesma. Posteriormente, foi adicionado uma gota de Solução de Lugol para fixação da amostra e então, com auxílio de pipeta, colocado 1 mL na câmara de Sedgwick-Rafter para contagem dos organismos segundo distribuição de poisson.

Dois recursos foram utilizados para auxiliar na correta avaliação taxonômica. O primeiro foi a epifluorescência, o qual possui lâmpada de mercúrio de alta pressão equipado para autofluorescência de ficobilinas. Este pigmento está presente no grupo de Cyanophyceae e, portanto, as diferencia dos demais grupos planctônicos morfologicamente semelhantes. A tinta nanquim também foi utilizada para evidenciação de bainhas mucilaginosas que são de complicada observação. A taxonomia foi baseada em BOURRELY (1968, 1972 e 1985); ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK (1988); KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989); KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999) e SANT'ANNA & AZEVEDO (2000).

3.1 Identificação taxonômica da cepa de Cianobactéria

A espécie de *Anabaena* foi identificada segundo Sant'anna (1991). Para tal identificação foram analisados: coloração, divisão celular, mucilagem, habitat, distribuição geográfica e tamanho das células.

Cerca de 20 células, 20 heterocitos e 20 aerótopos foram mensurados com auxílio do microscópio LABORLUX da marca LEICA, de onde surgiu uma média correspondente a uma determinada espécie descrita no trabalho consultado.



Fig. 08: Medição das células de *Anabaena plactonica*.
Foto: Filipe Silveira

3.2 Isolamento de *Anabaena planctônica*

No laboratório da COPASA, foi realizada a triagem das espécies de cianobactérias e de acordo com Costa & Azevedo (1994), realizou-se o isolamento dos filamentos de *Anabaena planctonica* por capilaridade em uma pipeta de Pasteur com ponta afilada. Os filamentos foram deixados em tubos de ensaio imersos no meio de cultura ASM1 C/10% (CETESB, 1993). Essas colônias ficaram no cultivo por 4 semanas e de 15 em 15 dias observou-se o crescimento do cultivo e novos repiques também foram realizados. Após dois meses obteve-se a certificação da pureza de uma das amostras repicadas. Este cultivo foi então selecionado e levado a um Erlenmeyer de 4 litros de meio ASM1 para aumentar sua biomassa. Quando o número de células alcançou a ordem de grandeza de 1×10^6 células/mL, o cultivo foi então interrompido e levado para extração de toxinas.

Liofilização e extração de Cianotoxinas

A extração de toxinas foi baseada em metodologia proposta por Fastner *et al.* (2007). A amostra anteriormente purificada com cepas de *Anabaena planctônica* foi concentrada, liofilizada e solubilizada em água deionizada numa proporção de 18,3 mg/L, para a realização dos testes de toxicidade através de bioensaios em camundongos da espécie Swiss sp., e do KIT ELISA.

Inicialmente utilizou-se a filtração de toda a amostra de seston em pré filtros de fibra de vidro, pois por esse método obteve-se um volume maior de filtrado e, conseqüentemente, uma maior quantidade de peso seco por amostras tricomialis (JARDIM *et.al.*,2001). O seston concentrado nos pré-filtros de borosilicato (fibra de vidro com porosidade de 1,8 a 8,0 µm) foi triturado em água deionizada e, a papa formada seguiu para centrífuga NT-825 da marca Nova Técnica, a 3600rpm, refrigerado a 4°C, por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado. Todo o sobrenadante foi recolhido para posterior análise.

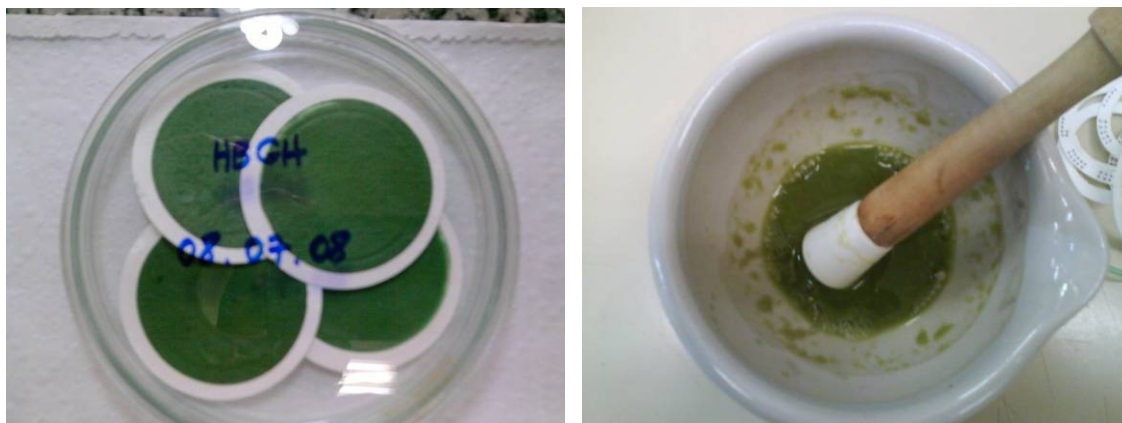


Fig. 09: Seston concentrado em pré filtros e triturados em água deionizada.
Foto: Patrícia Couto.

Bioensaio em camundongos

A realização de bioensaios através da injeção intraperitoneal em camundongos possui uma boa reprodutibilidade e distingue as classes de cianotoxinas, por exemplo, hepatotoxinas e diferentes tipos de neurotoxinas (JARDIM *et al.*, 1999).

Amostra da biomassa da floração é coletada, centrifugada, lavada, liofilizada; preparado um extrato com solução fisiológica e ultrasonificado para que ocorra a lise celular. Esse extrato é injetado intraperitonealmente em camundongos machos, em diferentes doses.

Por um período de 24 horas registra-se a mortalidade, e é observado o comportamento e registrado os efeitos hepatotóxicos e neurotóxicos nos organismos teste. Geralmente, uma floração hepatotóxica ou neurotóxica causa a morte dos animais em poucas horas ou minutos. Os resultados dos testes com camundongos são expressos em DL50.

Este método tem como principal desvantagem não permitir a determinação de baixas concentrações de cianotoxinas (MASANGO *et al.* 2008), além de ser pouco sensível, e acarretar problemas éticos (PEARSON e NEILAN 2008).

Chorus & Bartram (1999) propõem a seguinte escala de toxicidade para amostras de seston expressos no Quadro 03 :

QUADRO 03: Valores de DL₅₀ relacionados com níveis de toxicidade para amostras de seston.

Valores de DL ₅₀	Níveis de toxicidade
> 1.000 mg/kg de peso corpóreo	Não considerar como decorrentes de cianotoxinas
De 500 a 1000 mg/kg de peso corpóreo	Baixa toxicidade
De 100 a 500 mg/kg de peso corpóreo	Média toxicidade
< 100 mg/kg de peso corpóreo	Elevada toxicidade

Fonte: Chorus & Bartram, 1999.

Nos ensaios toxicológicos foram utilizados camundongos da espécie *Swiss ssp*, injetando-se doses de extratos de cianobactérias (liofilizados) proveniente do cultivo de *A. planctonica*. Nestes ensaios foram preparadas concentrações crescentes de extrato nas doses: 10%, 50% e 100%, diluídos com água deionizada. Para cada dose foram utilizados dois camundongos, machos, pesando entre 25 a 30g, tendo sido injetado um volume de 1 mL por meio de injeções intraperitoneais.

Os camundongos foram pesados em balança eletrônica e os sintomas observados durante sete dias após a (i.p.). Os animais ficaram em observação e avaliou-se a ocorrência de alguns sintomas característicos da intoxicação por cianotoxinas, quais sejam: isolamento, fotofobia, fortes contrações abdominais, diarreia, aceleração da respiração seguida de convulsão

Após as injeções, os animais foram mantidos em local arejado com alimento e água, sob observação durante 24 horas. Os sintomas e o tempo de ocorrência de possíveis mortes foram anotados em planilha previamente elaborada.



Fig. 10: Camundongos machos suíços utilizados para a realização do Bioensaio.

Foto:

Imunoensaio do tipo ELISA

Para a quantificação da Saxitoxina utilizou-se o método de imunoensaios do tipo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) proposto por CHU *et al.* (1990), sendo oferecido comercialmente sob a forma de um kit imunoenzimático através de placas ou de tubos. Para a presente avaliação utilizou-se o de placas da marca BIOO SCIENTIFIC SAXITOXIN (PSP) ELISA TEST KIT devido à precisão semi-quantitativa requerida, sendo realizado na fração particulada da amostra.

O ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) é uma técnica de detecção imunológica de fácil operação, rápido resultado e que confere grande sensibilidade por possibilitar a detecção de valores muito baixos (HARADA *et al.*, 1999).

A técnica baseia-se no uso de ensaios imunológicos com anticorpos mono ou policlonais (Sangolkar *et al.* 2006). O teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é rápido, de baixo custo, requer pouca quantidade de amostra (RIVASSEAU *et al.* 1999; MATHYS e SURHOLT 2004; SANGOLKAR *et al.* 2006), sendo ainda capaz de detectar quantidades dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Quando comparado com técnicas analíticas, como o HPLC, tem como principal vantagem ter um menor limite de detecção (METACALF e CODD 2003). Apesar destas vantagens, a elevada variação estrutural que ocorre, por exemplo, entre as microcistinas, pode levar a reações cruzadas entre os anticorpos com diferentes variantes da toxina ou com outros compostos que possam estar presentes nas amostras, podendo estas reações não exprimirem corretamente valores de concentração da toxina (RAPALA *et al.* 2002);



Fig. 11: Kit ELISA
Foto: Filipe Silveira

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comunidade fitoplanctônica

No resultado da análise hidrobiológica foi verificado o predomínio de *Anabaena planctonica*, com um número de células de 81.750 por mililitro. Esta cianobactéria é conhecida por produzir compostos como a geosmina e o 2 metil isoborneol que conferem à água um odor e um gosto de mofo ou até mesmo de compostos organoclorados. Em trabalhos realizados por Molica *et al.*, (2005) provaram que essa espécie no Brasil já produziu anatoxina *a* (S), uma potente neurotoxina (JARDIM *et al.*, 2001). Outra espécie de cianobactéria encontrada foi a *Anabaena spiroides*, espécie pouco comum na água das captações em estações de tratamento (Jardim & Azevedo, 2006).

A espécie *Anabaena spiroides* é apontada na literatura como produtora potencial de neurotoxinas e de hepatotoxinas (Carpenter e Carmichael, 1995). Florações de *Anabaena spiroides* tiveram sua toxicidade comprovada por Yunes (2003) no manancial de Santa Bárbara (Pelotas, RS), e em Alagoas no nordeste do Brasil.

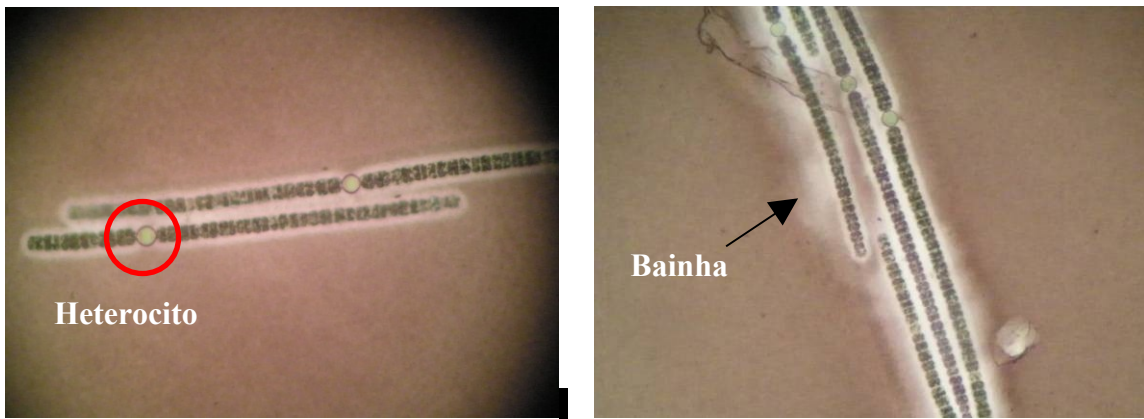


Fig. 12: Filamento de *Anabaena planctonica* com bainha e heterocito evidenciados com tinta Nanquim. 400X.

Foto: Patrícia Couto

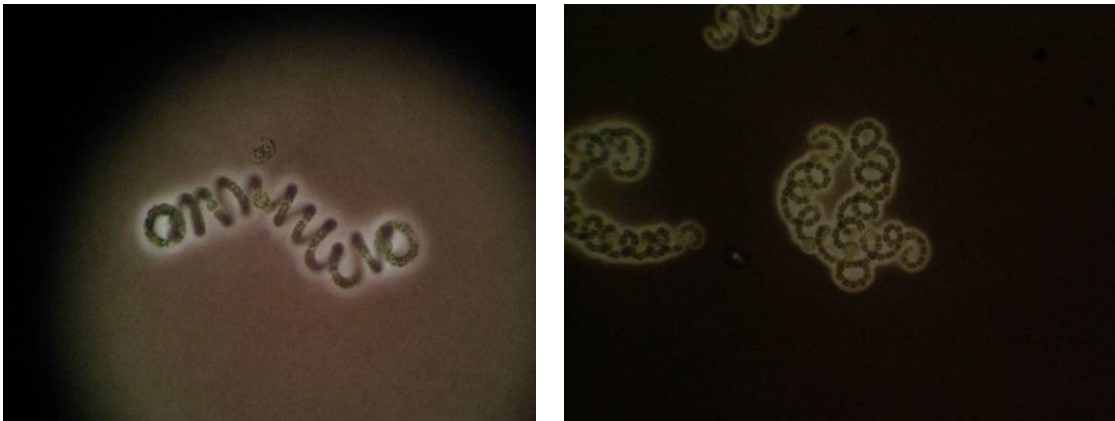


Fig. 13: Filamentos de *Anabaena spiroides* com bainha e heterocito evidenciados com tinta Nanquim. 400 X.

Foto: Patrícia Couto

Resultado de Saxitoxina pelo kit ELISA

O resultado quantitativo do Kit ELISA detectou, na fração particulada, 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Saxitoxinas, o que demonstra não ser uma cepa tóxica.

O biensaio em camundongos

Com a realização do bioensaio em camundongos foi possível verificar alguns sintomas característicos de intoxicação por hepatoxinas, quais sejam: contrações abdominais, ereção pilórica e fotofobia. No primeiro grupo de organismos testados os sintomas foram mais acentuados e com maior duração isso pelo fato de terem recebido dosagem de maior concentração da amostra (100%). Entretanto, após três dias de observação o teste de toxicidade não obteve dosagem letal para 50% dos animais testados (DL_{50}), não sendo observada a morte desses animais. A tabela 01 apresenta a relação do peso corpóreo com a dose injetada do material liofilizado nos animais-teste.

TABELA 01 - Relação do peso corpóreo com a dose injetada do material liofilizado nos animais-teste

Animais	Peso do animal (g)	Dose injetada (em mg/kg)	Tempo de ocorrência de morte
I	22,7	725	AUSÊNCIA
II	22	373	AUSÊNCIA
III	21,6	76,1	AUSÊNCIA

4.4 Parâmetros físicos

O resultado dos parâmetros aferidos de temperatura e pH da água no ponto de coleta da amostra demonstraram estar em faixa muito próxima dos valores médios da água para lagos na região sendo eles: pH – 7,5 e temperatura – 21,7°C.

5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

A análise de toxicidade da amostra coletada no lago ornamental do Ouro Minas Grande Hotel e Termas de Araxá, demonstrou através, do kit ELISA, o valor de 0,01 µg/L de saxitoxina e não se mostrou tóxica no bioensaio em camundongos da espécie Swiss sp..

Tendo em vista a gravidade do risco das cianobactérias e suas toxinas para a saúde pública e possíveis florações potencialmente tóxicas no lago ornamental do hotel, faz-se necessária a elaboração de planos de gerenciamento desse ambiente hídrico e também monitoramento constante desses parâmetros. Novas florações no local podem torna-se área de risco para a

população, uma vez que a mesma faz uso desta água para pesca e recreação, com danos em curto prazo como irritação na pele ou em longo prazo no caso de pesca.

De acordo com a portaria 2914 do Ministério da Saúde e da Resolução 357 do CONAMA (padrões de balneabilidade) deve-se continuar o monitoramento hidrobiológico com uma frequência mensal, uma vez que a contagem de células excedeu 10000cels./ml.

Tendo em vista uma complementação para o trabalho, poderia ter sido realizadas análises químicas da água a fim de se detectar a presença de alguns elementos. A análise do teor de nitrogênio e fósforo total seria de grande importância para basear discussões em relação à origem do processo de eutrofização instalado. E por outro lado, tendo em vista o uso primordial do lago, que se trata de recreação com contato direto, seria importante a realização de ensaios toxicológicos para dermatotoxinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (1998) **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington, APHA/WEF/AWWA.

ANAGNOSTIDIS, K., KOMÁREK, J.. **Modern approach to the classification system of cyanophytes**. 3. Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80, 1-4. Stuttgart. p. 327-472. 1988.

APELDOORN ME, EGMOND HP, SPEIJERS GJA, BAKKER GJI. 2007. **Toxins of cyanobacteria**. Molecular Nutrition & Food Research 51(1):7-60.

ATLAS DE CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS DE ALGAS CONTINENTAIS BRASILEIRAS. Seção de Ficologia. Instituto de Botânica. Secretaria do Estado do Meio Ambiente São Paulo.

AZEVEDO, S. M. F. O; BRANDÃO, C. C. S.. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano: Impactos na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. FUNASA/CENEPI - Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano, 2001.

AZEVEDO, Sandra. **Toxinas de Cianobactérias: Causas e conseqüências para a Saúde Pública**. Medicina On line - Revista Virtual de Medicina. Volume 1- Número 3 - 1998

BRASIL. Ministério da Saúde - Portaria no. 518/GM – 25/03/2004. Diário Oficial da União de 26/03/2004, seção I, p. 266.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – Conselho Nacional do Meio Ambiente-Resolução no. 357 17/03/2005 - Diário Oficial no. 53, 18/03/2005.

BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce: initiation à la systématique**, 2: les algues jaunes et brunes, les Crysoptocées, Phéoptocées, Xanthoptocées et Diatomées. Paris, Éditions N. Boubée. v. 2. 1968.

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

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

CARNEIRO, T. G.; LEITE, F. **Cianobactérias e suas Toxinas**. Revista Analytica- Ed 32 Ciano.indd 3. 2008.

CARMICHAEL, W. W. **A Status Report on Planktonic Cyanobacteria – Blue Green Algae and their Toxins**. EPA/600/R-92/079, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 1992.

CARMICHAEL, W.W. & FALCONER, I.R. **Diseases related to Freshwater Blue-Green Algae Toxins, and Control Measures**. Pp. 187-209. In: I.R. Falconer (ed.). *Algae Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Cambridge. 224p. 1993.

CARPENTER, E. J. & CARMICHAEL, W. W. **Taxonomy of cyanobacteria**. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (eds.). *IOC Manuals and Guides*. UNESCO, Paris. 33: 373-380. 1995.

CETESB, NT 06: L5. 025. **Teste para avaliação de toxicidade aguda de cianobactérias - método de ensaio**. São Paulo. 1993.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management**. Ingrid Chorus & Jamie Bartram Eds. E & FN Spon, London, 416p.1999.

CHU, FS., HUAN, X., WEI, R. D. **Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms**. J. Assoc. off Anal. Chem. 73:451-456. 1990.

COPASA Norma Técnica T. 126 (1992) Coleta de amostra de águas para análise hidrobiológica. Belo Horizonte.

COSTA, S.M.; AZEVEDO, M.F.O. **Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas**. Iheringia, 45: p.69-74. 1994.

CUNHA, M. C. C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. **Estudo genotípico de populações brasileiras de Microcystis spp. (Cyanobacteria) e sua relação com a origem geográfica**. In: Seminário Internacional Represa do Lobo-Broa 30anos de Pesquisa em Limnologia, Gerenciamento e Participação da Comunidade e Bases Científicas para o Gerenciamento da Eutrofização .São Carlos. Resumos, 2000.

ESTEVEZ, F.A.. **Considerações sobre a aplicação da tipologia de lagos temperados a lagos tropicais**. Acta Limnologica. Brás., 2:3-28. 1988.

FALCONER, I.R. **Potential impact on human health of toxic cyanobacteria**. *Phycologia*, 35(6). 1996.

FALCONER, I.R. **Health Implications of Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins**. In: Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management. STEFFENSEN, D.A.; NICHOLSON, B.C. Eds. Proceedings of International Workshop. Adelaide. Australian. 19p. 1994.

FERREIRA, A. H.; MINILLO, A.; SILVA, L. M. & YUNES, J. S. **Ocorrência de *Anabaena spiroides* (CIANOBACTÉRIA), no estuário da Lagoa dos Patos (RS, Brasil) no verão – outono de 1998**. Atlântica, Rio Grande. 2004.

FERNÁNDEZ, N. L.; RICHARD, D.J.A.; AMBELLA, A.D. **In vivo assays for phycotoxins**. In: manual on Harmfull Marine Microalgae. (HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M.; AMBELLA, A. D., eds). UNESCO Publising, Paris, p.347-388, 2004.

FASTNER, J. Neumann, U. Wirsing, B. Weckesser, J. Wiedner, C. Nixdorf, B. Chorus, I. *Environ Toxicol*. 1999.

FASTNER, J. et.al. **Occurrence of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Northeast Germany**. Wiley Perodicals, Inc. Environmental Toxicology. 2007.

HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWTON, L. **Laboratory analysis of cyanotoxins**. In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public heath. Consequences, monitoring and management (CHORUS, I. & BARTRAM, J. eds.). E & FN Spon, Londres, p.370-404, 1999.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <http://http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=310400>. Acesso em: 30 out 2010.

JARDIM, F. A. **Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA MG. Belo Horizonte**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Escola de Engenharia - Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

JARDIM, F.A; MACHADO, J.N.A.; SCHEMBRI, M.C.; AZEVEDO, S.; Von SPERLING, E. **A experiência da COPASA no monitoramento detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água - Minas Gerais - Brasil**; XVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...** Porto Alegre. p.1-4.2000.

JARDIM, F. A., FONSECA, Y. M. F., VIANNA, L. N. L., AZEVEDO, S. M. F. O. CISCOTTO, P. H. C. Primeira Ocorrência de Cianobactérias Tóxicas em um reservatório da COPASA - Minas Gerais - Brasil: **Revista Bios - Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas - PUC Minas**, v.9, n. 9, p. 83-91, 2001.

JARDIM, F. A. & AZEVEDO, S. M. F. O. **Cianobactérias em Águas para abastecimento público e o cumprimento da legislação brasileira**. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia, n. 35 (3), p. 86-91. ISSN: 1980-8976, 2006.

KOMÁREK, J. ANAGNOSTIDIS, K. **Modern approach to the classification system of cyanophytes**. 4. Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82,3. Stuttgart. p. 247-345. 1989.

KOMÁREK, J. ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales.** - In: Ettl, H., G. GARTNER, H. HEYNIG & D. MOLLENHAUER (eds): **Susswasserflora von Mitteleuropa** 19: 1-545. Gustav Fischer, Stuttgart. 1999.

MASSANGO M, MYBURGH J, BOTHA C, LABUSCHANGNE L, NAICKER D. 2008. **A comparison of *in vivo* and *in vitro* assays to assess the toxicity of algal blooms.** Water Research 42(13):3241-3248.

METACALF JS, CODD GA. 2003. **Analysis of cyanobacterial toxins by immunological methods.** Chemical Research in Toxicology 16(2):103-112.

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 na anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply.** *Harmful Algae*, v. 4, i. 4, 743-753. 2005.

MUR, L. R., SKULBERG, O. M., UTKILEN, H. - "**Cyanobacteria in the environment**", *in Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, editado por Ingrid Chorus e Jamie Bartram, London, E & FN SPON, 1999, pp 15-34.

NEILAN BA. 2002. **The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria.** Current Issues in Molecular Biology 4:1-11.

PEARSON LA, NEILAN BA. 2008. **The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk.** Current Opinion in Biotechnology 19(3):281-288.

RAPALA J, ERKOMAA K, KUKKONEM J, SIVONEN K, LAHTI K. 2002. **Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods.** Analytica Chimica Acta 466(2):213-231.

RIVASSEAU C, RACAUD P, DEGUIN A, HENNION M-C. 1999. **Evaluation of an ELISA kit for the monitoring of microcystins (cyanobacterial toxins) in water and algae environmental samples.** Environmental science & Technology 33(9):1520-1527.

SANT'ANNA, C. L. **Two new taxa of Anabaena and other Nostocaceae (Cyanophyceae) from State of São Paulo, southeastern Brazil.** Algological Studies 64- 527-545. Stuttgart, December 1991.

SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. P. **Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil.** Nova Hedwigia v. 71, n. 3-4, p. 359-385, Stuttgart, November. 2000.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, L.R. & SOUZA, R.C.R.. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras.** Interciência, Rio de Janeiro. 58p. 2000.

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; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia – SBFic, 2006.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S. & HAGE, E. **Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil.** Bulletin of PAHO, 27(3): 244-253. 1993.

TONIETTO, Ângela Oliveira; FONSECA, Barabara; GUIMARÃES, Melina. **O GÊNERO MICROCYSTIS (Cyanobacteria) Uma abordagem eco-fisiológica.** Ed. Universa. 2008.

TUNDISI, J.G. E MATSUMURA- TUNDISI. **Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives.** In: Cordeiro-Marino, M., E.M. (eds.) Algae and environment: a general approach. Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo. 131p. 1992.

VINCENT, R.K.; QIN, X., MICHAEL, R., MCKAY,L., MINER,J., CZAJKOWSKI, K., SAVINO, J., Bridgeman,T. **Phycocyanin detection from LANDSAT TM data for mapping cyanobacterial blooms in Lake Erie. Remote Sensing of Environment,** v. 89, p. 361-368, 2004.

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. 2003.