

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL  
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

EDERSON FABIANO GRIEBLER

**PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIO PARA MONITORAMENTO DE  
*Microcystis aeruginosa* TOXIGÊNICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO  
2016

EDERSON FABIANO GRIEBLER

**PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIO PARA MONITORAMENTO DE  
*Microcystis aeruginosa* TOXIGÊNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para a  
conclusão do Curso de Bacharelado em  
Engenharia Ambiental da UTFPR,  
Câmpus Francisco Beltrão.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisabete Hiromi  
Hashimoto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisângela  
Dusman

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ticiane Sauer  
Pokrywiecki

FRANCISCO BELTRÃO  
2016



---

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**Trabalho de Conclusão de Curso - TCC2**

**PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIO PARA MONITORAMENTO DE  
*Microcystis aeruginosa* TOXIGÊNICA**

por

**Ederson Fabiano Griebler**

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às 15 horas e 30 min., do dia 16 de junho de 2016, como requisito para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

---

**Marcelo Bortoli**

Coordenador do Curso de Engenharia  
Ambiental

---

**Elisabete Hiromi Hashimoto**

Professor Orientador

---

**Elisângela Dusman**

Professor Co-orientador

---

**Ticiane Sauer Pokrywiecki**

Professor Co-orientador

---

**Denise Andréia Szymczak**

Professor do TCC2

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Orientadora Doutora Elisabete Hiromi Hashimoto por ter aceitado, dedicado e auxiliado na elaboração deste trabalho. Também agradeço as Professoras Doutoradas Elisângela Dusman e Ticiane Sauer Pokrywiecki que me co-orientaram. À Professora Doutora Sheila Oro pelo auxílio em estatística aplicada.

Agradeço ao colega e amigo Josemarque Lima da Rosa por ter me ajudado quando necessário.

Aos amigos de laboratório Naara, Aline, Michel, Bruna, Janice e Paola pelos momentos de brincadeiras.

Aos técnicos de laboratório Ronaldo, João, Magali, Camila, Poliane e Sinara pelo auxílio quando necessário.

Agradeço pelo dom da vida, a minha mãe Renata, irmão Edson, meus avós Odilon e Maria Sônia (*in memoriam*), e minha tia Maria Roseli, pelo apoio que me destes nos momentos bons e ruins. Além de outros familiares que me incentivaram a estudar e buscar uma vida melhor.

Agradeço de modo geral a todas as pessoas que contribuíram para minha formação, professores, colegas, amigos, entre outras pessoas que fizeram e continuam fazendo parte da minha vida.

Só quando a última árvore for derrubada,  
o último peixe for morto e o último rio for poluído  
é que o homem perceberá que não pode comer dinheiro.  
Provérbio Indígena

## RESUMO

GRIEBLER, Ederson F. **Padronização de bioensaio para monitoramento de *Microcystis aeruginosa* toxigênica**. 2016. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2016.

As cianobactérias são encontradas em ambientes aquáticos e suas florações ocorrem em decorrência da eutrofização provocada por atividades antrópicas. A espécie *Microcystis aeruginosa* é uma cianobactéria amplamente encontrada em corpos hídricos e produtora de microcistina capaz de promover intoxicações e tumores hepáticos. O monitoramento de cianotoxinas englobam análises cromatográficas, espectrofotométricas, imunoensaios, entre outros. Devido ao alto custo, estas análises não são disponíveis em todos os laboratórios de controle de qualidade de água para abastecimento público. Assim, o objetivo deste trabalho é padronizar o bioensaio *Artemia salina* visando sua aplicação no monitoramento de *Microcystis aeruginosa* toxigênica, devido à facilidade de execução e baixo custo. O bioensaio com *Artemia salina* foi padronizado, considerando a concentração celular de *Microcystis aeruginosa* (cepa BCCUSP232) dos seguintes níveis de monitoramento: até 10.000 células.mL<sup>-1</sup> (Nível de Vigilância), de 10.000 a 20.000 células.mL<sup>-1</sup> (Nível de Alerta 1), de 20.000 a 100.000 células.mL<sup>-1</sup> (Nível de Alerta 2) e maior que 100.000 células.mL<sup>-1</sup> (Nível de Alerta 3), preconizados pela OMS. Foi realizado em diferentes proporções: 2,0 mL da amostra teste (100%), 1,0 mL da amostra teste (50%), 0,5 mL da amostra teste (25%), 0,25 mL da amostra teste (12,5%), 0,124 mL da amostra teste (6,2%) e 0,062 mL da amostra teste (3,1%). O indicativo de efeito toxicológico está nas proporções da amostra teste entre 12,5% e 25%, onde a *Artemia salina* apresentou uma melhor resposta, considerando uma alternativa viável para o controle de qualidade de água para abastecimento público.

**Palavras-chave:** Eutrofização. Microcistina. *Artemia salina*. Toxicidade.

## ABSTRACT

Griebler, Ederson F. **Bioassay Standards for monitoring of *Microcystis aeruginosa* toxigenic**. 2016. 57 s. Work Completion of Course (Diploma in Environmental Engineering) - Environmental Engineering Course, Federal Technological University of Paraná. Francisco Beltrao, 2016.

Cyanobacteria are found in aquatic environments and their blooms occur as a result of eutrophication caused by anthropogenic activities. The *Microcystis aeruginosa* species is a cyanobacteria widely found in water bodies and producing microcystin able to promote poisoning and liver tumors. The monitoring cyanotoxins include chromatographic analysis, spectrophotometric, immunoassays, among others. Due to high costs, these analyzes are not available in all quality control laboratories of water for public supply. The objective of this work is to standardize bioassay *Artemia salina* aimed at application in the monitoring of *Microcystis aeruginosa* toxigenic due to ease of implementation and low cost. The bioassay *Artemia salina* was standardized, considering the cellular concentration of *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP232 strain) of the following levels of monitoring: up to 10.000 cell.mL<sup>-1</sup> (Supervisory Level), 10.000-20.000 cell.mL<sup>-1</sup> (Level Alert 1) 20.000-100.000 cell.mL<sup>-1</sup> (Level Alert 2) and greater than 100.000 cell.mL<sup>-1</sup> (Level Alert 3), recommended by the WHO. Was performed in different proportions: 2,0 mL of test sample (100%), 1,0 mL of the test sample (50%), 0,5 mL of the test sample (25%), 0,25 mL of the test sample (12,5%), 0,124 mL of the test sample (6,2%) and 0,062 mL of test sample (3,1%). The indication of toxicological is the proportions of the test sample between 12.5% and 25%, where the *Artemia salina* showed a better response considering a viable alternative for the quality control of water for public supply.

**Keywords:** Eutrophication. Microcystin. *Artemia salina*. Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema de distribuição de cianobactérias na coluna da água .....	15
FIGURA 2 - Estrutura química de Microcistina-LR .....	18

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Limite máximo permitido em diferentes países.....	21
TABELA 2 - Composição das quatro soluções estoque do meio ASM-1 .....	28
TABELA 3 - Proporções-teste para ensaio com <i>M. aeruginosa</i> .....	30
TABELA 4 - Média de organismos mortos/imóveis .....	32
TABELA 5 - Distribuição normal dos dados em cada proporção.....	35
TABELA 6 - Análise de variância (ANOVA) .....	35



## LISTA DE GRÁFICOS e QUADROS

GRÁFICO 1 - Número médio de organismos mortos/imóveis pelo ensaio de toxicidade com <i>A. salina</i> com <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP232 .....	31
GRÁFICO 2 - Comportamento da mortalidade na proporção 12,5% .....	34
GRÁFICO 3 - Comportamento da mortalidade na proporção 25% .....	34
GRÁFICO 4 - Distribuição normal da proporção 3,1% .....	49
GRÁFICO 5 - Distribuição normal da proporção 6,2% .....	49
GRÁFICO 6 - Distribuição normal da proporção 12,5% .....	50
GRÁFICO 7 - Distribuição normal da proporção 25% .....	50
GRÁFICO 8 - Distribuição normal da proporção 50% .....	51
GRÁFICO 9 - Distribuição normal da proporção 100% .....	51
GRÁFICO 10 - Distribuição normal do NV .....	53
GRÁFICO 11 - Distribuição normal do NA1 .....	53
GRÁFICO 12 - Distribuição normal do NA2 .....	54
GRÁFICO 13 - Distribuição normal do NA3 .....	54
QUADRO 1 - Número de <i>A. salina</i> mortas e vivas em contato com a <i>M. aeruginosa</i> nas diferentes proporções.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
3.1 EUTROFIZAÇÃO .....	13
3.2 CIANOBACTÉRIAS.....	14
3.2.1 Cianotoxinas.....	16
3.3 <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	17
3.4 MICROCISTINAS .....	17
3.5 LEGISLAÇÃO.....	20
3.6 MONITORAMENTO .....	21
3.7 BIOENSAIOS .....	23
3.7.1 Bioensaios com <i>Artemia salina</i> .....	23
3.7.2 Outros bioensaios .....	24
3.8 MÉTODOS BIOQUÍMICOS .....	25
3.8.1 Imunoensaio ELISA.....	25
3.9 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS .....	26
3.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE) .....	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE ESTUDO.....	27
4.1.1 Cultivo da Cepa Teste <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	27
4.1.2 Análise Quantitativa .....	28
4.2 BIOENSAIO PARA MONITORAMENTO.....	29
4.2.1 Teste de Toxicidade Aguda com <i>Artemia salina</i> .....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas afetam negativamente a qualidade da água, dentre essas, destacam-se a atividade industrial, agrícola, a crescente urbanização e a falta de tratamento de esgoto adequado. Essas atividades levam a um enriquecimento de concentrações de nutrientes na água, principalmente por nitrogênio e fósforo, tendo como resultado a eutrofização de corpos hídricos e, conseqüentemente, a floração de cianobactérias e algas, a diminuição da eficiência e custo do tratamento da água para abastecimento público (OLIVEIRA, 2005; SANTIAGO, 2008; VON SPERLING, 2005; FUNASA, 2003).

Grande parte das espécies de cianobactérias produzem toxinas afetando a saúde humana e animal (BRASIL, 2011). A espécie toxigênica *Microcystis aeruginosa* é mundialmente encontrada em corpos hídricos (CHORUS e BARTRAM, 1999). Tal espécie é produtora de microcistinas, com características hepatotóxicas, sendo a causadora mais comum de intoxicações e promover tumores (especialmente hepáticos). Essas toxinas também apresentam ações letais, podendo levar a morte de indivíduos em poucas horas (CETESB, 2013).

No monitoramento de cianobactérias são considerados um programa proposto pela FUNASA (2003) baseado nas recomendações da World Health Organization (WHO, 1993, 1996) seguindo os níveis de monitoramento e manejo de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público. Nesse programa o nível de vigilância (NV) exige uma frequência de monitoramento mensal (porém é recomendável com frequências quinzenais), quando as concentrações de cianobactérias estão abaixo de 10.000 células.mL<sup>-1</sup>; o nível de alerta 1 (NA1) exige uma frequência de monitoramento semanal, quando as concentrações estão entre 10.000 e 20.000 células.mL<sup>-1</sup>; o nível de alerta 2 (NA2) exige uma frequência de monitoramento semanal, e dispõe de algumas medidas adicionais, quando as concentrações estão entre 20.000 e 100.000 células.mL<sup>-1</sup>; e o nível de alerta 3 (NA3) exige uma frequência de pelo menos três vezes por semana e ainda declarar a população que a água está imprópria para consumo humano e animal, quando as concentrações estão acima de 100.000 células.mL<sup>-1</sup>.

Quando os seres humanos ingerem águas provenientes de corpos hídricos que apresentam concentrações de microcistinas acima do valor máximo permitido de 1,0µg.L<sup>-1</sup>, estabelecido pela Portaria 2.914 (BRASIL, 2011), podem ser observados

efeitos adversos direto das mesmas. Portanto, para o monitoramento dessa cianotoxina é necessário utilizar análises cromatográficas, imunoenaios, espectrofotométricas, entre outros. Como essas análises apresentam custos elevados, muitas vezes não estão disponíveis em laboratórios que controlam a qualidade da água para abastecimento público. Assim, a avaliação desses níveis de monitoramento irá diagnosticar os efeitos adversos da microcistina na saúde humana, propondo a padronização de bioensaio com *Artemia salina*, visando o monitoramento toxicológico da *Microcystis aeruginosa*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo padronizar bioensaio utilizando *Artemia salina* visando a aplicação no monitoramento de *Microcystis aeruginosa* toxigênica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a sensibilidade do bioensaio nos diferentes níveis de monitoramento de florações de cianobactérias.
- Avaliar os efeitos da cepa tóxica *Microcystis aeruginosa* na sobrevivência do organismo-teste *Artemia salina*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 EUTROFIZAÇÃO

A origem da eutrofização de corpos hídricos provém do aumento excessivo de plantas ou micro-organismos aquáticos, podendo causar efeitos indesejáveis nos corpos hídricos. Sua estimulação é observada quando há um aumento excessivo de nutrientes na água, principalmente por nitrogênio e fósforo que se transformam em partículas orgânicas e inorgânicas, sendo o fator primordial para o aumento da floração de cianobactérias e algas, a depreciação da qualidade hídrica e podendo levar a morte de inúmeros seres vivos (BICUDO, TUNDISI e SCHEUENSTUHL, 2010; NUNES, 2012; VON SPERLING, 2005).

O controle da eutrofização nos mananciais de abastecimento público é de extrema importância, baseado principalmente no controle de fatores externos, como é o caso de lançamento de efluentes nos corpos hídricos. A seguir estão destacados algumas formas de eliminar ou diminuir o enriquecimento artificial de nutrientes nos corpos hídricos (CETESB, 2013):

- Planejamento da ocupação territorial, potencializando o aproveitamento de territórios existentes e assegurando a preservação dos recursos disponíveis;
- O uso e a ocupação do solo na bacia hidrográfica devem ser regulamentados, tomando medidas para evitar o transporte de partículas de solo aos corpos hídricos;
- Medidas de boas práticas na pecuária e agricultura;
- Tomar medidas de mitigação a erosão do solo mantendo a cobertura vegetal ou técnicas de preparo de solos adequados e também ter controle do uso de fertilizantes e herbicidas;
- A preservação das matas ciliares;
- O tratamento adequado de efluentes domésticos ou industriais antes de serem lançados aos corpos hídricos.

A eutrofização em corpos hídricos pode provocar a morte extensiva de animais aquáticos, a redução de oxigênio dissolvido, a perda das características estéticas do local e seu potencial de recreação, tendo consequências negativas na eficiência e custo do tratamento da água (FUNASA, 2003; CETESB, 2013).

### 3.2 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, tradicionalmente conhecidas como algas azuis, são micro-organismos aeróbicos fotoautotróficos, ou seja, são organismos que obtém energia para suas atividades metabólicas a partir da matéria orgânica sintetizada (FUNASA, 2003). Sua origem pode ter aproximadamente 3,5 bilhões de anos (CHARMICHAEL, 1992). As cianobactérias também são micro-organismos com características celulares procariontes, tendo a fotossíntese como seu principal meio de obtenção de energia para o seu metabolismo, encontrando condições boas de proliferação em ambientes eutrofizados (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003; MOTA, 2012; SANTIAGO, 2008).

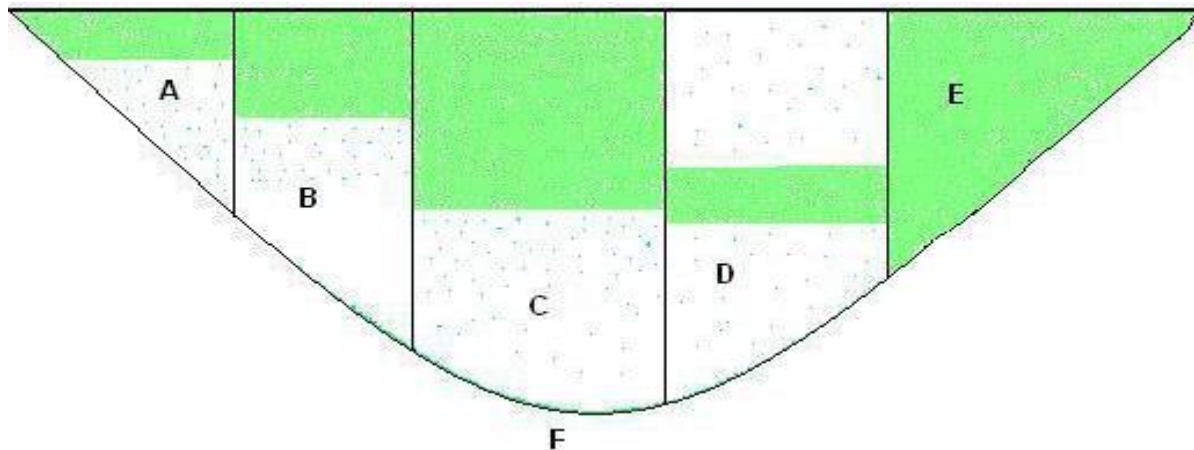
A reprodução de cianobactérias ocorre de forma assexuada, a sua divisão celular é estabelecida pela invaginação e crescimento da parede celular. Esta reprodução pode ocorrer de duas formas: a primeira é um processo designado de fissão binária, ou seja, quando uma célula dá origem a duas células filhas; ou a segunda é um processo designado de fissão múltipla, ou seja, quando uma célula dá origem a mais de duas células filhas. Existem também outras formas de reprodução de cianobactérias chamadas de brotamento e fragmentação (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006).

O monitoramento de florações de cianobactérias é desafiador, pois estes micro-organismos tem a capacidade de se multiplicar no ambiente onde estão inseridos e podem avançar facilmente para outros corpos hídricos. É mais comum em ambientes lênticos (lagos e represas), onde as cianobactérias encontram melhores condições para o seu desenvolvimento (CETESB, 2013).

Já em ambientes lóticos, a floração de cianobactérias não apresenta uma condição ideal para seu desenvolvimento, pois sua dinâmica hidrológica é intensa e seu tempo de residência é baixo. O monitoramento das florações de cianobactérias e suas cianotoxinas é um caso que demanda de limitação de tempo, pois estes organismos são capazes de se multiplicar rapidamente no ambiente em que estão inseridos pela ação do vento. Portanto, podem ser dispersos em poucos dias ou em poucas horas (CETESB, 2013).

Para fins de abastecimento público, o monitoramento deve ser rigoroso na coluna da água acompanhando o deslocamento das cianobactérias. A Figura 1, mostra um esquema de distribuição de cianobactérias na coluna da água, onde elas

podem ser encontradas em diferentes pontos dessa coluna, ou seja, podem estar acumuladas nas margens, na superfície, em profundidades específicas, em sedimentação ou também dispostas em toda a coluna do corpo d'água, dependendo principalmente das características antrópicas do local.



**Figura 1 - Esquema de distribuição de cianobactérias na coluna da água**

**Notas:** "A": Acúmulo das cianobactérias nas margens. "B": mesma distribuição em toda zona fótica ou limnética. "C": profundidade específica na zona fótica, principalmente em locais rasos onde a luz penetra até o fundo. "D": florações metalimnéticas. Florações metalimnéticas são evidenciadas pelos fortes aumentos do oxigênio em profundidade. "E": distribuição em toda a coluna da água. "F": cianobactérias no sedimento.

**Fonte:** CETESB (2013) adaptado GRAHAM et al. (2008).

As cianobactérias são localizadas em diversos ambientes, com condições ideais para sua floração. Grande quantidade de espécies de cianobactérias se desenvolve em águas neutroalcalinas, entre temperaturas ótimas que variam de 15°C a 25°C e pH de 6,0 a 9,0, com vasta quantidade de nutrientes, principalmente de nitrogênio e fósforo (OBERHOLSTER, BOTHA e GROBBELAAR, 2004, FUNASA, 2003).

Segundo Sanches et al. (2012) é necessário o monitoramento e controle contínuo da qualidade da água para abastecimento público, em especial atenção às cianobactérias. O carvão ativado em pó e também outros métodos alternativos são indicados para remover toxinas produzidas por cianobactérias em água.



### 3.2.1 Cianotoxinas

As cianotoxinas são toxinas naturais produzidas pelas cianobactérias e apresentam efeitos altamente tóxicos para outros seres vivos (BERTOLETTI e ZAGATTO, 2008). Segundo a origem e forma de proliferação em ambientes, as cianotoxinas podem ser divididas em: endotoxinas - constituídas de parede celular com grande diversidade de cianobactérias e quando sofrem lise as toxinas são liberadas no ambiente; e exotoxinas – são proteínas que tem ação muito tóxica, liberadas em baixas concentrações (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; FUNASA, 2003). As endotoxinas são mais predominantes entre as cianotoxinas. Através de condições normais uma determinada concentração dessa toxina é liberada para a água. Porém, quando em condições perturbatórias, através da ação de agentes químicos como o sulfato de cobre e outros oxidantes ou mesmo pelo decaimento natural da cianobactéria, é liberado para a coluna d'água toda a toxina intracelular (ALVES, 2011).

Desde os anos 1950 a eutrofização é preocupante, pois desde o reconhecimento das toxinas de cianobactérias esta foi relacionado como causa de sérios problemas a saúde humana. A ingestão de água contaminada com altas concentrações de cianotoxina, acidentalmente ou não, podem resultar em consequências negativas a saúde humana (CHORUS e BARTRAM, 1999).

O monitoramento de cianotoxinas deve prevenir ou diminuir o risco de contaminação de cianotoxinas presentes na água para irrigação ou para consumo humano (HASHIMOTO, 2007). Os avanços nas últimas décadas em tecnologias de tratamento de água têm-se mostrado satisfatórios para a remoção de toxinas, porém essas tecnologias, na maioria das vezes, têm elevado custo e dependendo das condições eutróficas a eficiência pode ser reduzida (ALVES, 2011).

As cianotoxinas podem ocorrer de diversas formas quanto a exposição humana: contato com a pele, ser inalado, ingerido oralmente, intravenosa e também através do acúmulo na cadeia alimentar (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; FUNASA, 2003).

Em relação a toxicidade, as cianotoxinas são divididas em classes denominadas de neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas, porém o tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é provocado por hepatotoxinas (FUNASA, 2003; POMPÊO et al., 2015).

Entre as hepatotoxinas as microcistinas (MCs) são produzidas principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa*, comumente encontrada em corpos hídricos brasileiros (BERTOLETTI e ZAGATTO, 2008).

### 3.3 *Microcystis aeruginosa*

Existem inúmeras espécies de cianobactérias que podem causar danos aos seres vivos e ao meio ambiente.

Existem aproximadamente 150 gêneros e 2000 espécies de cianobactérias, das quais 40 gêneros são toxigênicos com destaque para *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Aphanizomenon flos aquae*, *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., produtora de microcistinas (MC), uma classe de toxina hepatotóxica (CHARMICHAEL et al., 2001 apud HASHIMOTO, 2007).

Dentre elas a espécie toxigênica *Microcystis aeruginosa* é mundialmente encontrada em corpos hídricos, com uma grande capacidade adaptativa em diversos ambientes (CHORUS e BARTRAM, 1999). Tal espécie é produtora de microcistinas, apresentando características hepatotóxicas que inibem a proteína fosfatase, e como consequência acarretará em intoxicações, necrose e promover tumores (especialmente hepáticos). Essas toxinas apresentam ações lentas, podendo levar a morte de indivíduos em poucas horas (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

A característica celular da *Microcystis* é unicelular ou ainda colonial, permanecendo juntas devido à existência de mucilagem. Sua reprodução ocorre de forma assexuada. Sua célula tem formato esférico, possui membrana externa, citoplasmática e tilacoidal, além de camada de glicocálice e peptidoglicano (TONIETTO, 2009).

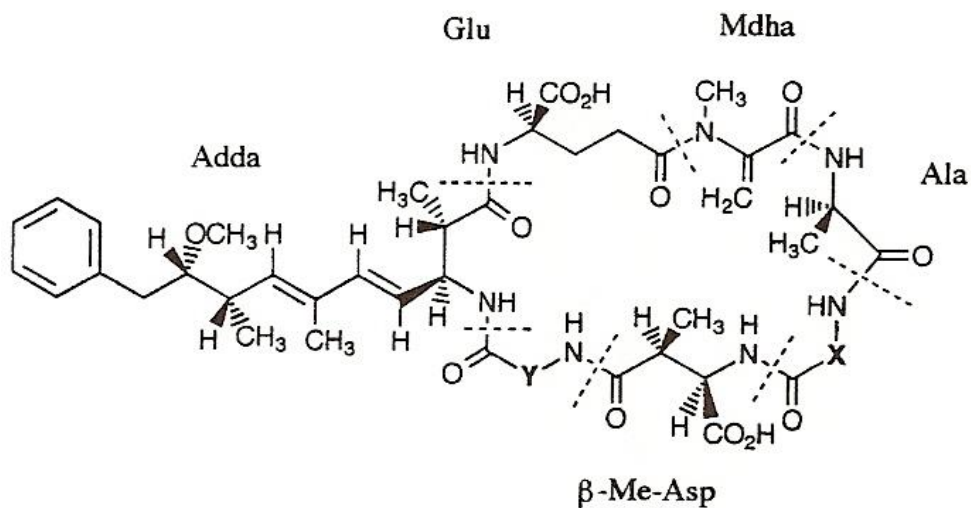
### 3.4 MICROCISTINAS

A lixiviação do solo, a contaminação por efluentes domésticos e indústrias induzem o fenômeno da eutrofização e florações de cianobactérias, produzindo, conseqüentemente, a microcistina (HASHIMOTO, 2007).

As microcistinas (MC) são as mais comuns cianotoxinas produzidas pelas cianobactérias, são hepatotoxinas heptapeptídicas cíclicas, compostos por sete aminoácidos (três D-aminoácidos, dois L-aminoácidos e dois raros) (Figura 2), tendo

como efeito principal a promoção de tumores, especialmente hepáticos, sendo considerada um fator de risco à saúde humana, quando esta for por exposição prolongada (FUNASA, 2003; BOTES, et al., 1982 apud HASHIMOTO, 2007; BRASIL, 2011).

Dois resíduos de aminoácidos podem se combinar, sendo isoladas mais de 80 análogos atualmente, como exemplo, a leucina (L) e arginina (R) forma a MCLR, sendo o análogo mais tóxico e mais frequente (CHARMICHAEL, 1992 apud HASHIMOTO, 2007; FALCONER e HUMPAGE, 2005; HOEGER, HITZFELD e DIETRICH, 2005).



**Figura 2 - Estrutura química de Microcistina-LR**  
 Fonte: HASHIMOTO (2007).

Geograficamente, as microcistinas são amplamente distribuídas em águas doces. Embora se fale muito sobre os riscos e efeitos maléficos que essas cianotoxinas causam em humanos, há poucos casos documentados de que as cianotoxinas causam doenças em humanos (CHORUS e BARTRAM, 1999). Devido a esses fatores a Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca que deve ser necessário o monitoramento de microcistinas, garantindo, portanto a qualidade da água (POMPÊO et al., 2015).

A microcistina é capaz de resistir a vários fatores dentre eles a oxidação (pH 7), hidrólise química e fervimento. Além disso, pode perdurar em ambientes onde a

iluminação estiver ausente, pelo fato da microcistina possuir estrutura peptídica cíclica (HARADA e TSUJI, 1998 apud HASHIMOTO, 2007).

O processo de degradação das microcistinas tem maior resistência com relação às neurotoxinas, devido à complexidade das moléculas de microcistinas. Sua degradação em ambientes aquáticos tem bastante variabilidade, podendo levar semanas a meses, dependendo do pH e temperatura da água, da disponibilidade de nutrientes e de sua concentração (ALVES, 2011).

Dentre esses poucos casos, no Brasil há dois principais relatos de efeitos adversos que as cianotoxinas causam na saúde humana.

O primeiro foi o evento ocorrido na Bahia em 1988, porém não teve associação comprovada com cianotoxinas, no qual resultou em 88 mortes de pessoas que vieram a consumir a água advinda do reservatório Itaparica Dam (TEIXEIRA et al., 1993).

O segundo caso e, porém mais grave, que foi comprovadamente associado à cianotoxinas tendo efeitos adversos diretos a saúde da população, foi a chamada “Síndrome de Caruaru”, ocorrido na cidade de Caruaru, estado de Pernambuco, em 1996. Neste foi verificado a presença de microcistinas e cilindrospermopsina no carvão ativado, utilizado no sistema de purificação de água para abastecimento de uma clínica de hemodiálise. O resultado disso foi que 76 pacientes da clínica foram a óbito, sendo expostos a água contaminada por cianotoxinas a uma concentração de  $19,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (JOCHIMSEN et al., 1998), concentração muito acima do estabelecido pela Portaria 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) que é de  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistina presente na água para o consumo humano.

Mundialmente, as confirmações de danos à saúde humana causadas por cianotoxinas ingeridas (oriundas de águas de abastecimento público) surgiram e continuam a surgir, como resultado de uma má administração pública ou privada, sendo assim difícil determinar as circunstâncias reais desses relatos (LEAL e SOARES, 2004).

As MCs causam a morte de seres vivos em poucos dias ou até mesmo em poucas horas. O mecanismo de ação das hepatotoxinas, inicia pela inibição da proteína fosfatase, desestruturando o citoesqueleto e promovendo perda da estrutura celular, vacuolização de hepatócitos resultando em um aumento no volume do fígado (WATANABE et al., 1996).

Efeitos nas proteínas fosfatases tipo 1 e tipo 2A, têm sido relacionado ao efeito promotor tumoral hepático das microcistinas, muito mais que apenas a inibição das fosfatases, as microcistinas podem causar problemas no sistema de reparação do DNA e na forma de como são expressos os genes. A exposição à microcistina em tilápias-do-nilo teve efeitos que diminuiram a taxa metabólica e também aumentou a tensão crítica de oxigênio. Constatou ainda que houve lesão no tecido cardíaco da tilápia, que apresentou anormalidade no funcionamento do coração, reduzindo as chances de sobrevivência da tilápia-do-nilo (MARTINS, 2010).

### 3.5 LEGISLAÇÃO

A Constituição Federal Brasileira de 1988 (BRASIL, 1988), em seu capítulo VI do Meio Ambiente, institui em seu artigo 225:

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

A Política Nacional de Recursos Hídricos – Lei 9.433 (BRASIL, 1997), em seu capítulo I dos Fundamentos, institui em seu artigo 1º:

Art. 1º - A Política Nacional de Recursos Hídricos baseia-se nos seguintes fundamentos:  
 I – A água é um bem de domínio público;  
 II – a água é um recurso natural limitado, dotado de valor econômico;  
 III – em situações de escassez, o uso prioritário dos recursos hídricos é o consumo humano e a dessedentação de animais;  
 IV – a gestão dos recursos hídricos deve sempre proporcionar o uso múltiplo das águas;  
 V – a bacia hidrográfica é a unidade territorial para implementação da Política Nacional de Recursos Hídricos e atuação do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos;  
 VI – a gestão dos recursos hídricos deve ser descentralizada e contar com a participação do Poder Público, dos usuários e das comunidades.

A Portaria 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) “dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.”

Em seu Capítulo I das Disposições Gerais, institui em seu artigo 3º:

Art. 3º. Toda água destinada ao consumo humano, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água, deve ser objeto de controle e vigilância da qualidade da água.

Grande parte de espécies de cianobactérias produzem toxinas, chamadas de cianotoxinas, que podem afetar a saúde humana e animal (BRASIL, 2011).

Segundo a Portaria 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), recomenda-se obrigatoriamente a análise e o monitoramento dessas cianotoxinas, estabelecendo, em seu anexo VIII, valor máximo permitido de  $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistinas presentes na água para consumo humano.

Diversos países adotam concentrações de cianotoxinas discriminadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1993, 1996). Na Tabela 1 está descrito essas concentrações de cianotoxinas de alguns países.

**Tabela 1 – Limite máximo permitido em diferentes países**

País	Cianotoxina	Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Brasil	MCs	1,00
Canadá	MCLR	1,50
Espanha	MCs	1,00
China	MCLR	1,00
França	MCLR	1,00
Noruega	MCLR	1,00
Japão	MCLR	1,00
Austrália	MCLR	1,30
Itália	MCs	0,84

Fonte: BURCH (2008), apud POMPEO et al. (2015).

Legenda: Microcistinas (MCs); Microcistina-LR (MCLR).

### 3.6 MONITORAMENTO

O monitoramento de florações de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público contemplam ações e gerenciamento de monitoramento, essas ações são adaptadas para cada local. Estima-se que muitas das toxinas de cianobactérias ainda não foram identificadas, e que podem trazer consequências negativas a saúde da população. É dessa forma que os níveis de monitoramento são importantes para o esclarecimento dos riscos que essas toxinas podem trazer, quando assim expostas (CETESB, 2013).

A World Health Organization (WHO, 1993, 1996), juntamente com a Fundação Nacional da Saúde (FUNASA, 2003) e a Portaria 2.914 (BRASIL, 2011), estabelecem níveis de monitoramento de cianobactérias em reservatórios de

abastecimento público (CETESB, 2013; FUNASA 2003), estes níveis de monitoramento são divididos em:

- **Nível de Vigilância:** sua instalação ou detecção está em estágios iniciais do afloramento de cianobactérias. Os valores que indicam esse nível de monitoramento de florações de cianobactérias está correspondendo até um valor de 10.000 células.mL<sup>-1</sup>. Estabelecendo que a frequência de monitoramento de cianobactérias neste caso deve ser mensalmente, porém pode ser recomendável em frequências quinzenais.
- **Nível de Alerta 1:** neste caso é confirmado o estabelecimento inicial da floração de cianobactérias. Os valores que indicam esse nível de monitoramento está correspondendo uma faixa de 10.000 a 20.000 células.mL<sup>-1</sup>. Neste caso, é recomendável a frequência de monitoramento de cianobactérias semanalmente.
- **Nível de Alerta 2:** a floração de cianobactérias é confirmada, acarretando problemas qualitativos da água. Seus valores que indicam esse nível de monitoramento está numa faixa de 20.000 a 100.000 células.mL<sup>-1</sup>. Recomenda-se a frequência de monitoramento de cianobactérias de pelo menos uma vez por semana. Neste caso, a floração já é visível na superfície da água. Também nessas condições, é confirmada a floração de diversas espécies potencialmente tóxicas, como por exemplo a *Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, entre outras.  
É recomendável que a partir deste nível de alerta, sejam realizadas medidas corretivas necessárias; realizar tratamento adequado para a remoção do gosto e odor; utilização de carvão ativado no tratamento de águas de abastecimento; intensificar o monitoramento, por pelo menos uma vez na semana; analisar a toxicidade por meio de bioensaios; informar os riscos potenciais à saúde para os órgãos de saúde pública.
- **Nível de Alerta 3:** neste nível a presença de toxinas é confirmada por meio de análises, como por exemplo bioensaios. O risco que a população pode apresentar de problemas sérios de saúde é extremamente alto. Os valores que indicam esse nível são maiores do que 100.000 células.mL<sup>-1</sup>. Deve ser estabelecido monitoramento semanal (de no mínimo duas vezes por semana) da presença de cianotoxinas presentes na água.

É recomendável que sejam tomadas medidas de informar ao público que a água está imprópria para consumo, quando não tiver uma análise eficiente; escolher outro manancial para abastecimento público; a população deve ser orientada.

### 3.7 BIOENSAIOS

Os métodos de monitoramento da *M. aeruginosa* caracterizam-se por bioensaios de análise da toxicidade, através disso, qualquer bioensaio ou outro método qualquer, que avalie danos em organismos aquáticos deverá ser investigado (BRASIL, 2005).

Como definição, bioensaio é qualquer procedimento biológico que avalia, monitora ou detecta efeitos adversos de uma determinada substância ou poluente (BATISTA, SUZUKI e KURODA, 2013).

Segundo Tucci e Marques (2001) a definição de bioensaios ou também chamados pelos autores de testes de toxicidade, são procedimentos ou ensaios de organismos vivos, onde podem ser obtidas informações adversas de agentes sobre outros seres vivos.

#### 3.7.1 Bioensaios com *Artemia salina*

O teste utilizando cistos de *Artemia salina* apresenta baixo custo, fácil execução, fácil adaptação em diversos tipos de ambientes, boa reprodutibilidade e fornecem resultados rápidos. Embora consigam viver em ambientes salinos onde outros não conseguem resistir (AMORIM, 1994; CAFFARO FILHO, 2011; FIGUEIREDO et al. 2013), é um método que está sendo cada vez mais popular, pois não exige manutenção da cultura e é muito simples de ser executado (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Os testes de toxicidade aguda com *A. salina* podem demonstrar ocorrências de efeitos indesejáveis em um período curto de tempo (24 horas de exposição) (AZEVEDO e CHASIN, 2003). A diferença da análise química e por sistemas biológicos de testes de toxicidade é que uma identifica e quantifica as concentrações de determinadas substâncias tóxicas e a outra avalia o efeito que essas substâncias tóxicas têm sobre o bioensaio, respectivamente (COSTA e OLIVI, 2008).



A toxicidade aguda é também chamada de DL<sub>50</sub> (dose letal), sua expressão é pela quantidade necessária de um composto químico (mg.kg<sup>-1</sup>) de peso corpóreo que poderá induzir a morte de 50% da *A. salina* submetidos aos níveis de monitoramento (BERTOLETTI e ZAGATTO, 2008; CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006).

Os pesquisadores Lee, Chen e Chou (1999) descobriram que cepas de *M. aeruginosa* tóxicas, apresentavam toxicidade em métodos com *A. salina* e com ratos, no entanto o bioensaio com ratos apresentou maior sensibilidade à toxicidade de microcistina em relação à *A. salina*. Por outro lado, os autores consideram o método com *A. salina* de boa confiança e de menor custo e, portanto é sugerido pelos autores para avaliação da sensibilidade toxicológica de microcistinas.

Segundo os autores Batista, Suzuki e Kuroda (2013), ensaios de ecotoxicidade em *A. salina*, utilizando concentrações de microcistinas presentes em quatro cepas tóxicas de *Microcystis* sp., foi a que melhor apresentou resposta satisfatória de toxicidade, com relação a outros organismos-teste como *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Entretanto, segundo Hisem et al. (2011) não é suficiente monitorar os efeitos toxicológicos de cianobactérias com apenas o uso do organismo-teste *A. salina* e, este não deve ser utilizado unitariamente para estimar efeitos adversos a saúde da população. Portanto, percebe-se assim a necessidade da utilização de métodos em inter-relacionamento.

### 3.7.2 Outros bioensaios

Há uma grande variedade de outros bioensaios que detectam e quantificam efeitos nocivos das cianotoxinas, tendo como destaque ensaios com camundongos. Os bioensaios com camundongos foram realizados pela injeção intraperitoneal de extrato de cianobactérias, em diversas concentrações (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Depois da injeção intraperitoneal, os camundongos passaram a ser observados de 15 em 15 minutos, para assim detectar sintomas toxicológicos. Este método ainda está sendo utilizado para a detecção da presença de cianotoxinas, porém, é um método mais qualitativo do que quantitativo e, ainda associações

protetoras dos animais vem questionado em muitos países este tipo de método, pois se trata de um teste com maus tratos ao animal (WATANABE et al., 1996).

O método com *Allium cepa* também tem sido amplamente utilizado para estudar a toxicidade de muitos contaminantes, sendo sensível para a detecção de toxicidade e mutagenicidade (ARRAES e LONGHIN, 2012).

Há poucos estudos científicos avaliando ou monitorando efeitos toxicológicos de microcistinas em ensaios com *A. cepa*. Segundo um estudo recente de El-Sheekh, Khairy e El-Shenody (2014), ensaios com raízes meristemáticas da *A. cepa* foram altamente influenciados pela toxicologia da *M. aeruginosa* em fase de crescimento e morte celular, apresentando aberrações cromossômicas e, também havendo significativamente inibição no índice mitótico.

Outros bioensaios já foram testados, como com: *Daphnia sp.*, *Daphnia pulex*, *Aedes aegyptii* e *Drosophila melanogaster*, porém apresentaram baixa eficiência na detecção de toxicidade de vários poluentes (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; TUCCI e MARQUES, 2001).

### 3.8 MÉTODOS BIOQUÍMICOS

#### 3.8.1 Imunoensaio ELISA

O ensaio do imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) é um método imunológico de grande sensibilidade que detecta cianotoxinas e outros poluentes (NICHOLSON e BURCH, 2001). Se baseia em anticorpos e antígenos, mono e policlonais. Os anticorpos mono e policlonais podem apresentar alta performance, capaz de detectar microcistinas e outras cianotoxinas (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; HASHIMOTO, 2007).

A amostra de microcistina é incubada, durante um período com anticorpos, e através disso, ocorrerá a ligação entre eles formando complexo de antígeno/anticorpo. Após é feito a lavagem e adicionado o conjugado de microcistina-enzima, que enfim ocasionará na degradação do substrato, produzindo uma cor azul, para a realização da leitura (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; HASHIMOTO, 2007).

Esse método apresenta vantagens pela alta sensibilidade e necessidade baixa de quantidade de anticorpos diluídos. Por outro lado, o custo de aquisição

desses kits e do leitor de placa são altos, além de um período maior de tempo para a análise e possibilidade de falsos positivos e falsos negativos (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; HASHIMOTO, 2007). Destaca-se ainda outros métodos bioquímicos para monitoramento de cianotoxinas que podem ser realizados, como o ensaio de inibição de fosfatase, ensaio de inibição de acetilcolinesterase, entre outros (NICHOLSON e BURCH, 2001).

### 3.9 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

#### 3.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/CLAE) é um método comumente utilizado para se determinar a microcistina e outras cianotoxinas (NICHOLSON e BURCH, 2001), sendo considerado um método rápido, reproduzível e sensível, porém é um método com custo relativamente elevado de instrumentação e manutenção. Têm por objetivo separar os componentes de uma amostra qualquer, podendo posteriormente ser determinado e empregado uma análise qualitativa dos mesmos (CALIJURI, ALVES e SANTOS, 2006; HASHIMOTO, 2007).

De acordo com Cienfuegos e Vaitsman (2000) apud Calijuri, Alves e Santos (2006) existe três meios de serem detectados os componentes da amostra, por meio de comparações com padrões puros, adição de padrão e índice de retenção.

Após ser determinado e separado as cianotoxinas, o próximo passo é a detecção, podendo ser comumente detectado por UV, fotodiodo e espectroscopia de massa. Além também de outros métodos físico-químicos de monitoramento de cianotoxinas podem ser utilizados, como eletroforese capilar, método MMPB: método do 2-metil-3- metoxi-4-ácido fenilbutírico, entre outros (NICHOLSON e BURCH, 2001).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Microbiologia, Biologia e Águas e Resíduos Líquidos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Francisco Beltrão. O bioensaio de monitoramento da *M. aeruginosa* toxigênica foram baseados nos níveis de monitoramento descritos pela FUNASA (2003).

### 4.1 PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE ESTUDO

#### 4.1.1 Cultivo da Cepa Teste *Microcystis aeruginosa*

Para os ensaios foi utilizada a cepa de cianobactéria da espécie *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232, produtora de microcistinas. A cepa de cianobactéria foi mantida no laboratório de Microbiologia da UTFPR – Francisco Beltrão, em meio de cultura líquida ASM-1 (Tabela 2) (GOHRAM, 1964, modificado BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003).

Preparou-se da seguinte maneira o meio de cultura líquida ASM-1: preparo das soluções estoque A, B, C e D, descritos na Tabela 2; feito isso, foi usado de cada solução estoque um volume específico, para o preparo de 1,0L do meio de cultura. Em seguida o meio de cultura líquida ASM-1 foi autoclavado a 121°C, por 15 minutos. Para a manutenção da cultura, a cepa foi mantida em triplicata, em erlenmeyers de 300 mL, com 90 mL do meio de cultura líquida ASM-1 e 10 mL da cepa teste *M. aeruginosa* BCCUSP232 (processo chamado de repicagem), sendo mantido em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand), com duração de 15 dias, a 25°C, fotoperíodo de 12 horas e agitado uma vez ao dia.

Tabela 2 - Composição das quatro soluções estoque do meio ASM-1

Constituintes	Concentração (g/100 mL)	Volume de solução estoque para 1L de meio ASM1 (mL)
<b>Solução estoque A</b>		20
NaNO <sub>3</sub>	0,85	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,205	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,245	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,145	
<b>Solução estoque B</b>		2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ou	0,87	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	1,14	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O ou	1,78	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,33	
<b>Solução estoque C</b>		0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,08	
ZnCl <sub>2</sub>	0,335	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,019	
CuCl ou	0,0014	
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0013	
<b>Solução estoque D</b>		0,4
Na <sub>2</sub> EDTA	1,86	
Ajustar pH para 8,0		

Fonte: GOHRAM (1964), modificado BITTENCOURT-OLIVEIRA (2003).

#### 4.1.2 Análise Quantitativa

A cultura de *M. aeruginosa*, apresentou valor de pH 8,0, com condutividade de 438,4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , sob uma temperatura de 25°C. Foram estabelecidas as concentrações em número de células. $\text{mL}^{-1}$  cujo os valores representaram os limites dos níveis de monitoramento da cianobactérias toxigênicas, preconizados pela FUNASA (2003), sendo o nível de vigilância (NV) concentração igual a  $1 \times 10^4$  cél. $\text{mL}^{-1}$ , para os níveis de alerta: NA1 concentração igual a  $2 \times 10^4$  céls. $\text{mL}^{-1}$ , para o NA2 concentração igual a  $1 \times 10^5$  céls. $\text{mL}^{-1}$  e para o NA3 concentração igual a  $2 \times 10^5$  céls. $\text{mL}^{-1}$ . Para chegar a estas concentrações partiu-se da concentração celular do cultivo da cepa *M. aeruginosa* BCCUSP232, cuja leitura na câmara de Neubauer (com o auxílio de um microscópio biológico binocular com aumento de 40x) resultou em  $1,15 \times 10^7$  céls. $\text{mL}^{-1}$ .

A equação 1 dispõe do cálculo utilizado para determinar a densidade celular:

$$D = \frac{a}{b} * 25 * f \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$D$  = densidade de células da *Microcystis aeruginosa* (células.mL<sup>-1</sup>).

$a$  = número de células contadas.

$b$  = número de malhas contadas.

$f$  = fator de correção da câmara ( $1 \times 10^4$ ).

25 = quadrante central, onde será realizada a contagem celular, com 25 quadrados.

## 4.2 BIOENSAIO PARA MONITORAMENTO

### 4.2.1 Teste de Toxicidade Aguda com *Artemia salina*

*A. salina* foi utilizada como organismo-teste para realizar o teste de toxicidade aguda, proposto por Guerra (2001), com modificações.

Primeiramente cistos de *A. salina* foram incubados em solução de sal marinho sintético (30 g.L<sup>-1</sup>), aerados, com luminosidade e temperatura de 25°C por 48 horas, para promover a eclosão. Após a eclosão, 10 náuplios foram transferidos por tubo de ensaio, contendo diferentes proporções, das amostras de microcistina (teste) dos quatro níveis de monitoramento da *M. aeruginosa* BCCUSP232. Tais proporções (Tabela 3) tiveram modificações baseada na norma brasileira NBR 13.373 (ASSOCIAÇÃO..., 2010), onde estão descritas: 2,0 mL da amostra teste (100%), 1,0 mL da amostra teste (50%), 0,5 mL da amostra teste (25%), 0,25 mL da amostra teste (12,5%), 0,124 mL da amostra teste (6,2%) e 0,062 mL da amostra teste (3,1%), conservando-se as concentrações de cada nível de monitoramento (Tabela 3).

O grupo controle negativo continha 2 mL de solução salina. Foram realizadas triplicatas de cada grupo amostral, e após 24 horas foi contabilizado os náuplios

mortos, considerando aqueles que permaneceram 20 segundos de observação imóveis.

A média  $\pm$  desvio-padrão da quantidade de náuplios mortos de cada amostragem foi comparada por meio do teste de Tukey (nível de significância de 5%), pelo software MINITAB 14.1 (2003), onde os experimentos foram analisados em blocos casualizados (nas proporções) e também nos níveis de monitoramento, para verificar se o meio de cultivo ASM-1 interferiu na mortalidade da *A. salina*.

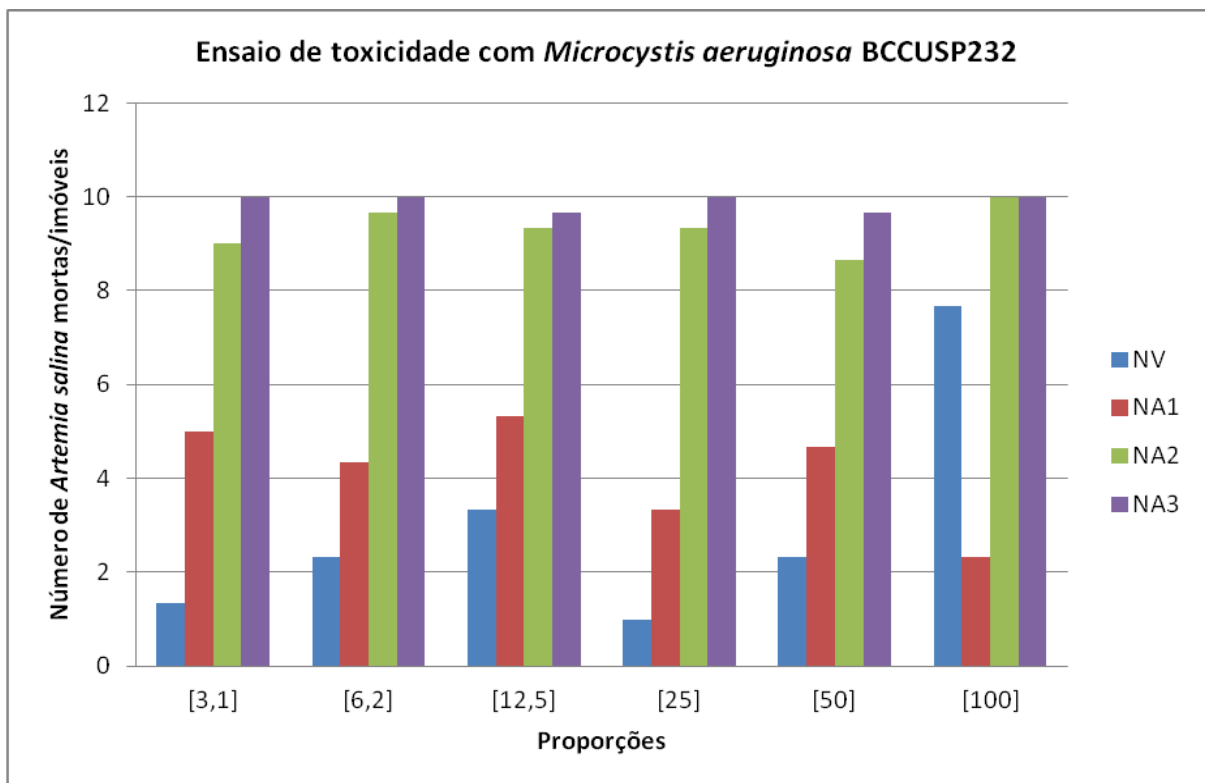
**Tabela 3 - Proporções-teste para ensaio com *M. aeruginosa***

<b>Proporção-teste (%)</b>	<b>Fator de diluição</b>	<b>Volume de amostra (mL)</b>	<b>Volume de solução salina de diluição (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>
100	1	2,0	-	2,0
50	2	1,0	1,0	2,0
25	4	0,5	1,5	2,0
12,5	8	0,25	1,75	2,0
6,2	16	0,124	1,876	2,0
3,1	32	0,062	1,938	2,0

**Fonte: NBR 13373 (ASSOCIAÇÃO ..., 2010, p. 7-8), com modificações.**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos ensaios de toxicidade com *A. salina* foram avaliados os efeitos de mortalidade/imobilidade após 24 horas de exposição à *M. aeruginosa* BCCUSP232 produtora de microcistina, cuja as respostas estão apresentadas no Gráfico 1 e na Tabela 4.



**Gráfico 1: Número médio de organismos mortos/imóveis pelo ensaio de toxicidade com *A. salina* com *M. aeruginosa* BCCUSP232**

Os dados da análise estatística de Tukey ( $\alpha=5\%$ ), onde foi comparado o efeito toxicológico de cada proporção (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100%) de solução salina, com os níveis de monitoramento (NV, NA1, NA2 e NA3) de cianobactérias e também, o efeito toxicológico de cada nível de monitoramento de cianobactérias em cada proporção de solução salina, mostrou que o efeito toxicológico das proporções em cada nível de monitoramento de cianobactérias foi proporcional às concentrações de microcistinas.

O Controle Negativo (CN) apresentou resultado médio de *A. salina* mortas de 3,0 sendo um valor considerado alto, onde se verificou em outros trabalhos a



mortalidade média de 0,3 (HOLLAS, 2015). Este resultado considerado alto pode ter interferência de que não houve a correta higienização das vidrarias utilizadas, onde também análises com outras bactérias e fungos são realizadas no laboratório de microbiologia ou ainda ter ocorrido à transferência de *A. salina* mortas para o grupo CN.

**Tabela 4 - Média de organismos mortos/imóveis**

Proporções	Níveis de monitoramento			
	NV	NA1	NA2	NA3
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
3,1%	1,33 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>	9,00 <sup>abc</sup>	10,00 <sup>c</sup>
6,2%	2,33 <sup>a</sup>	4,33 <sup>a</sup>	9,67 <sup>b</sup>	10,00 <sup>b</sup>
12,5%	3,33 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	9,33 <sup>c</sup>	9,67 <sup>cd</sup>
25%	1,00 <sup>a</sup>	3,33 <sup>b</sup>	9,33 <sup>c</sup>	10,00 <sup>cd</sup>
50%	2,33 <sup>a</sup>	4,67 <sup>a</sup>	8,67 <sup>b</sup>	9,67 <sup>b</sup>
100%	7,67 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>	10,00 <sup>ab</sup>	10,00 <sup>ab</sup>

**Notas: Letras diferentes diferem estatisticamente, letra minúscula comparado na linha. Legenda: Desvio Padrão (DP); (NV = Nível de vigilância, NA1, NA2 e NA3 = Nível de alerta 1, 2 e 3, respectivamente).**

Sabe-se que para o desenvolvimento da *A. salina* é importante a presença de sais no meio, neste sentido foram testados diferentes proporções de cultivo e de solução salina para o teste, sem alterar as concentrações de *M. aeruginosa* em cada nível de monitoramento.

Na proporção de 3,1% de cultivo observa-se que não há diferença entre o número de indivíduos mortos dos níveis de vigilância (NV) até o nível de alerta 2 (NA2). Para as proporções de 6,2% e 50% é possível observar diferença a partir entre os níveis de alerta NA1 e NA2. Sendo que entre estes dois níveis há uma diferença de 5 vezes da concentração celular ( $2 \times 10^4$  céls.mL<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^5$  céls.mL<sup>-1</sup>) de *M. aeruginosa*.

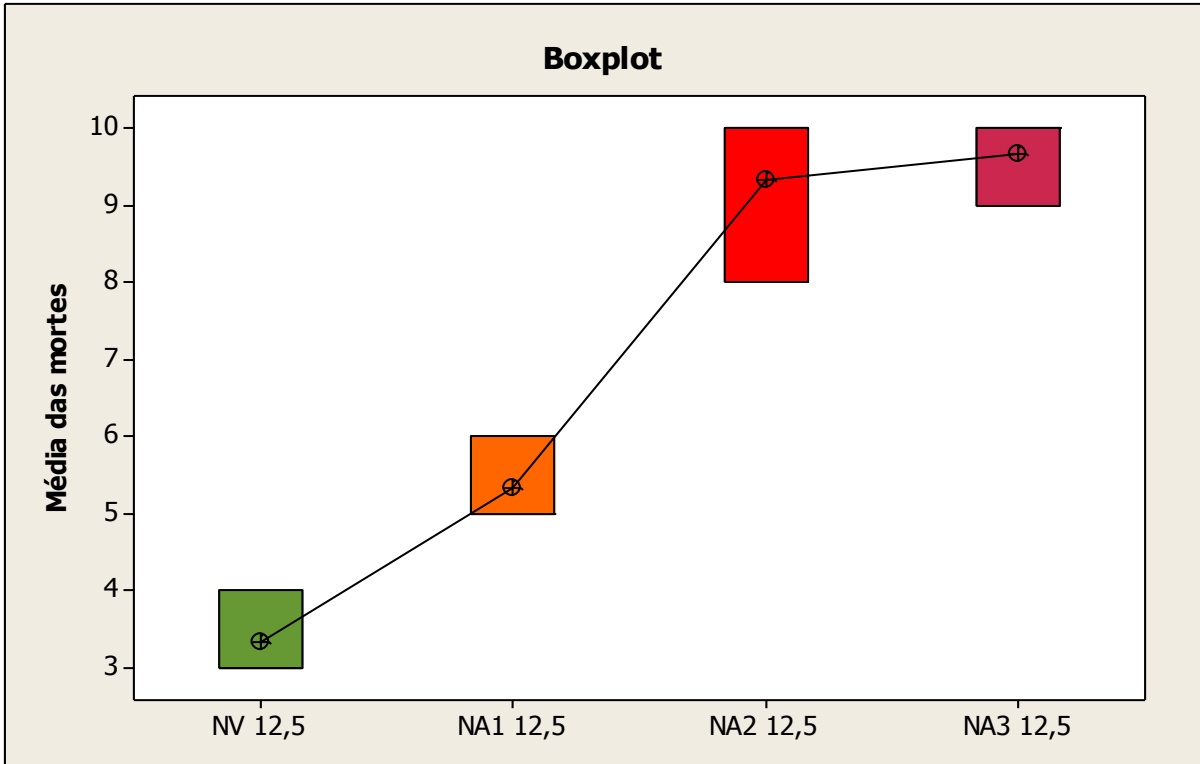
As proporções de 12,5 e 25% apresentaram o mesmo comportamento entre os níveis de monitoramento, sendo que foi possível observar diferenças entre o nível de vigilância (NV), e os níveis de alerta NA1 e NA2. Sendo que os níveis de alerta NA2 e NA3 não se diferiram em relação ao número de indivíduos mortos. Cabe

ressaltar que em relação a concentração celular entre NA2 e NA3 há uma diferença de apenas 2 vezes (de  $1 \times 10^5$  para  $2 \times 10^5$  céls.mL<sup>-1</sup>). Para os níveis de monitoramento a FUNASA determina para o nível de alerta 3 (NA3) uma contagem de celular maior ou igual a  $1 \times 10^5$  céls.mL<sup>-1</sup>. Sendo assim, poderia ser utilizada uma concentração celular maior para NA3. No entanto, considerando que o número de mortos de *A. salina* foi muito próximo ao número total de indivíduos, o teste mostrou que *A. salina* é sensível à exposição a *M. aeruginosa* e a microcistina por esta produzida, sendo possível, em um monitoramento detectar os riscos de contaminação desde os níveis de vigilância até o nível de alerta 2. Embora deva-se considerar que o teste foi realizado em condições laboratoriais, e que a concentração do agente tóxico (microcistina) ainda não foi determinada, e que em condições ambientais pode haver uma variação entre as espécies quanto a toxicidade e outros fatores que podem interferir na toxicidade.

Com relação à proporção de 100% de amostra teste, sem adição de solução salina, obteve apenas diferença estatística do NA1 com relação ao NA2 e NA3, com maior morte no NA3 com 10,0, porém o NA1 teve menor morte com 2,33. Os Gráficos 2 e 3 apresentam o comportamento da mortalidade das *A. salina* em razão dos níveis de monitoramento nas proporções de 12,5 e 25%, onde nessas proporções pode-se observar diferença estatística com melhor valor de P e Fcrítico entre os dados.

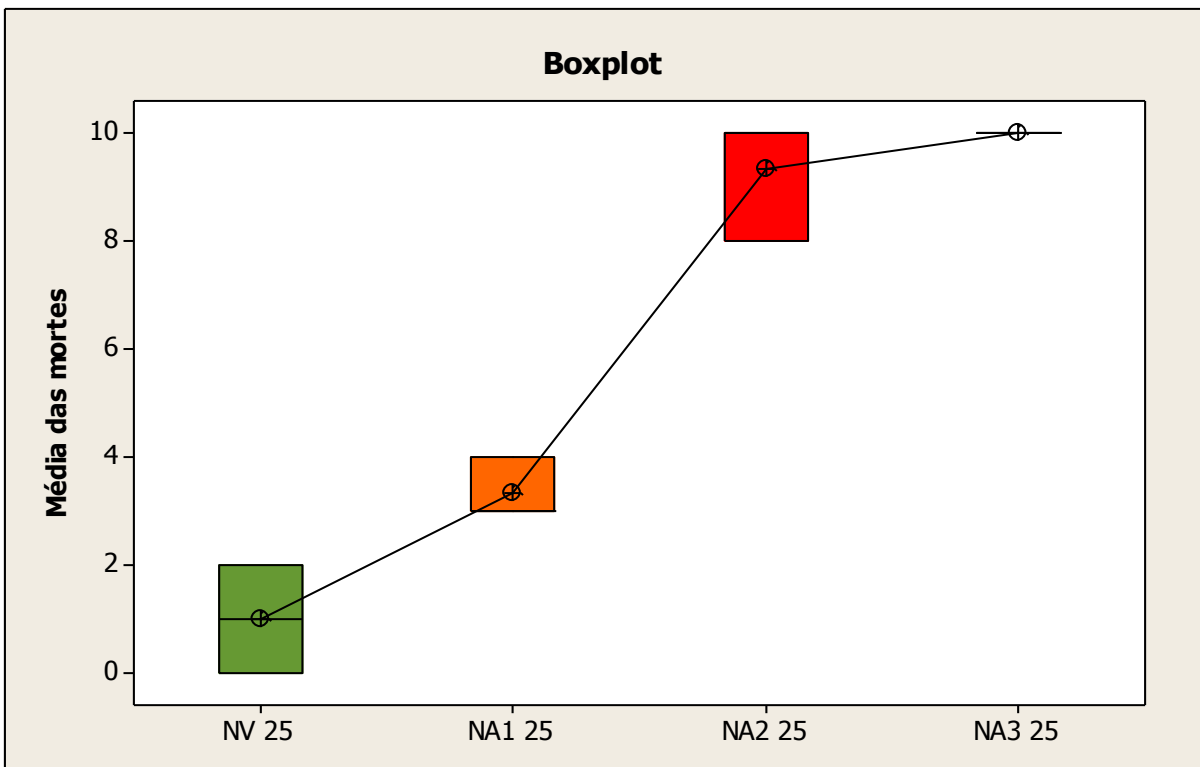
Em alguns casos não foi possível contabilizar 10 indivíduos de *A. salina* por erros na etapa de coleta no início do teste, para isso os dados foram extrapolados seguindo a proporcionalidade das mortes encontradas e da quantidade total que havia em cada análise.

Em nenhuma proporção da amostra teste (*M. aeruginosa*) todos os níveis de monitoramento foram estatisticamente diferentes entre si, porém as proporções de 12,5% e 25% apresentaram maiores diferenças de mortes entre esses níveis de monitoramento. Portanto o indicativo dos efeitos toxicológicos está nas proporções de solução salina entre 12,5% e 25%, onde a *A. salina* apresentou uma melhor resposta.



**Gráfico 2: Comportamento da mortalidade na proporção 12,5%.**

**Legenda: (NV = Nível de vigilância, NA1, NA2 e NA3 = Nível de alerta 1, 2 e 3, respectivamente).**



**Gráfico 3: Comportamento da mortalidade na proporção 25%**

**(NV= Nível de vigilância, NA1, NA2 e NA3 = Nível de alerta 1, 2 e 3, respectivamente).**

A Tabela 5 representa a distribuição normal dos dados de cada proporção da amostra teste, onde o valor P maior ou próximo que o nível de significância de 5% é aceito a hipótese nula ( $H_0$ ), ou seja, os dados seguem distribuição normal.

**Tabela 5 - Distribuição normal dos dados em cada proporção**

Proporções	Valor-P (%)	$H_0$ ( $\alpha=5\%$ )
3,1%	4,3	Aceita-se $H_0$
6,2%	4,4	Aceita-se $H_0$
12,5%	> 15	Aceita-se $H_0$
25%	> 15	Aceita-se $H_0$
50%	> 15	Aceita-se $H_0$
100%	> 15	Aceita-se $H_0$

Através da distribuição normal dos dados de cada proporção da amostra teste, o valor da distribuição F de Snedecor a 5% ( $F_{crítico}$ ,  $\alpha=5\%$ ) é calculado (Tabela 6), indicando que há alguma diferença estatística em alguma proporção se o valor for maior que 5%, ou seja, neste caso rejeita-se  $H_0$ .

**Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA)**

Proporções	F crítico (%)	$H_0$ ( $\alpha=5\%$ )
3,1%	15,35	Rejeita-se $H_0$
6,2%	35,44	Rejeita-se $H_0$
12,5%	49,29	Rejeita-se $H_0$
25%	88,79	Rejeita-se $H_0$
50%	32,62	Rejeita-se $H_0$
100%	14,71	Rejeita-se $H_0$

Na comparação em cada nível de monitoramento de cianobactérias não houve diferença estatística com as proporções da amostra teste, ou seja, o meio ASM-1 não interferiu na mortalidade da *A. salina*.

Segundo Lee, Chen e Chou (1999) a *A. salina* não resistiu em níveis de concentrações mais elevadas entre 30, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de microcistinas

respectivamente, comprovando que quanto maior a concentração maior é sua toxicidade. Ressaltam ainda, que a ação tóxica da microcistina em *A. salina* é pouco relatada, mas que este bioensaio traz resultados coerentes e confiáveis, se comparados ao bioensaio com ratos. No presente trabalho, a toxicidade foi testada em relação ao número de células, em um estudo posterior será quantificada a concentração de microcistina o que fornecerá mais informações sobre a possibilidade de correlacionar os níveis de monitoramento com o teste com *A. salina*.

Em um trabalho com diferentes concentrações da microcistina em extratos da cepa de cianobactéria *M. aeruginosa*, resultou em toxicidade para a *A. salina* (BATISTA, SUZUKI e KURODA, 2013). O uso do extrato pode resultar nas concentrações máximas de microcistina que é uma endotoxina. Neste trabalho foi testado células de um cultivo celular, tentando mimetizar o que pode ocorrer no ambiente, com concentrações de toxina liberadas naturalmente no meio, embora resulte em menores concentrações de toxina, foi ainda possível observar que com aumento das concentrações e os níveis de monitoramento houve o aumento do número de mortos, comprovando elevada toxicidade. A *A. salina* é um microcrustáceo que apresenta sensibilidade à microcistina (DELANEY e WILKINS, 1995, apud D'ORS, BARTOLOMÉ e SÁNCHEZ-FORTÚN, 2013).

Segundo Akin-Oriola e Lawton (2006) o aumento da mortalidade da *A. salina* é comprovado com o aumento de concentrações ou doses maiores de microcistinas, indicando 100% de efeitos letais a concentração de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , comprovando a toxicidade a ela exercida. Ou seja, quanto maior o nível de monitoramento de cianobactéria maior será a o efeito tóxico. Também Amaral e Silva (2008) destacam a mortalidade da *A. salina* com o aumento de concentrações - chegando em 66,6% de letalidade na concentração de 100%, porém utilizando extrato de *Pyrostegia venusta*.

Os casos oriundos à saúde humana relatados no mundo destacam-se o quão nocivo e preocupante são os efeitos associados às florações de cianobactérias toxigênicas. Os autores também destacam que inúmeras toxinas podem não ser tóxicas aos herbívoros, mas podendo trazer consigo prejuízos a alguns organismos que tenham maior nível trófico, pelo fato das toxinas se bioacumularem em sua teia trófica (CASTRO e MOSER, 2012). Cabendo destacar-se os diversos estudos toxicológicos experimentais são imprescindíveis ferramentas nas avaliações e

monitoramentos dos riscos potenciais dessas toxinas para a população humana (SOARES, 2009).

Ferrão Filho (2009) destaca que os efeitos agudos se relacionam com a diminuição dos movimentos natatórios da *Daphnia*, um organismo com características semelhantes a *Artemia*, reduzindo as chances de sobrevivência e podendo chegar à completa paralisia.

O bioensaio *A. salina* é um teste preliminar para avaliação da toxicidade, sendo necessária a execução de novos estudos específicos quanto aos efeitos que a água doce interfere na mortalidade da *A. salina* (FIGUEIREDO et al., 2013). As propriedades físicas ou químicas de todo o sistema, e também as condições de vida no qual os organismos estão expostos, podem sofrer interações com outros componentes como é o caso da água salgada e água doce, se tornando quase que impossível identificar se apenas a microcistina é o responsável pelo efeito tóxico (COSTA e OLIVI, 2008).

É importante diferenciar os níveis de monitoramento de cianobactérias para esclarecer os riscos à saúde pública. Considerando que os Níveis de Vigilância (NV), de alerta 1 (NA1) e de alerta 2 (NA2) tiveram maiores efeitos de toxicidade entre eles, é necessário intensificar o monitoramento, informando os riscos potenciais a sociedade e realizar o tratamento adequado. Este trabalho pode ajudar os órgãos públicos ambientais e de saúde a tomar atitudes de monitoramento, urgência e emergência, caso a população entre em contato com alguma concentração da microcistina.

Com os resultados obtidos neste trabalho pode ser observado que este bioensaio é uma alternativa viável para o controle da qualidade de água para abastecimento público.

## 6 CONCLUSÕES

O bioensaio *Artemia salina* apresentou sensibilidade no monitoramento da *Microcystis aeruginosa* toxigênica, além de ser uma técnica simples, econômica e rápida. O comportamento da mortalidade ou imobilidade da *A. salina* foi coerente e proporcional aos diferentes níveis de monitoramento de cianobactérias, sendo gradativamente mais tóxico conforme aumenta as concentrações de microcistinas, mas a proporção da amostra é importante para o teste, sendo o efeito toxicológico melhor observado em 12,5% e 25%. Este trabalho serve como embasamento para estudos toxicológicos utilizando esta cepa isolada de cianobactéria e em condições laboratoriais, embora no ambiente possa ter variações de outros micro-organismos e condições ambientais.

## REFERÊNCIAS

- AKIN-ORIOLA, G. A.; LAWTON, L. A. **The Detection and Quantification of Cyanobacterial Toxins in Water Using the Brine Shrimp (*Artemia salina*) Assay.** West Africa Journal of Applied Ecology (WAJAE), v. 9, p. 16-18, 2006.
- ALVES, M. G. **Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água.** 2011. 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, 2011.
- AMORIM, Á. **Optimização de bioensaios para a avaliação da toxicidade de cianobactérias.** 1994. 113 f. Relatório (Estágio do Curso de Biologia) - Universidade do Porto, 1994.
- ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia**, v. 8, n. 14, p. 1958-2012, jun, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373:** ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2010.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RiMa, 2003.
- BATISTA, A. D.; SUZUKI, L. Y.; KURODA, E. K. Avaliação da toxicidade de extratos de cepas de cianobactérias com diferentes organismos-teste. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 09, n. 11, p. 186-201, 2013.
- BERTOLETTI, P. A; ZAGATTO, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações.** 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.
- BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHL, M. C. B. **Águas do Brasil: Análises Estratégicas.** São Paulo: Instituto de Botânica, 2010. Disponível em: <[http://abc.org.br/rubrique.php3?id\\_rubrique=150](http://abc.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=150)>. Acesso em: 09 ago. 2015.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. Cianobactéria Invasora. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 82-90, jan/jul, 2003.



BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. **Dispõe sobre a Constituição Da República Federativa Brasileira**. 35 ed. Brasília. 1988.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Lei nº. 9.433. **Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989**. Brasília. 08 jan. 1997.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº. 357. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Brasília. 18 mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria nº. 2914. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da União. Brasília. 12 dez. 2011.

CAFFARO FILHO, R. A.; ACIOLI, T. S.; MELO, K. S. Ecotoxicologia independente de cultivo e manutenção de organismos-teste: Utilização de bioensaios com *Artemia* para triagem de toxicidade em rios e lançamentos costeiros. **XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**. Nov/Dez, 2011.

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

CASTRO, N. O.; MOSER, G. A. O. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 235-264, jun., 2012.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientação para o monitoramento e aspectos ambientais**. São Paulo, SP, 2013. 56 p.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: F & FN Spon, 1999.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, set., 2008.

DELANEY, J. M.; WILKINS, R. M. Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. **Toxicon**, v. 33, ed. 6, p. 771-778, jun. 1995.

D'ORS, A.; BARTOLOMÉ, M. C.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on *Artemia franciscana* nauplii populations. **Chemosphere**, v. 90, p. 2187-2192, 2013.

EL-SHEEKH, M. M.; KHAIRY, H. M.; EL-SHENODY, R. Allelopathic Effect of Cell-Free Medium of *Microcystis aeruginosa* Kützing on the Chromosomal Changes in *Allium cepa* Root Tips and Plumule Formation of *Zea mays* Seedling. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. 622-629, mai, 2014.

FALCONER, I. R., HUMPAGE, A. R. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins Drinking Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43–50, abr. 2005.

FERRÃO FILHO, A. S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 272-312, 2009.

FIGUEIREDO, R. F.; OLIVEIRA, D. A. F.; DINIZ, S. N.; MENDONÇA, S.; OKUYAMA, C. E. Avaliação da toxicidade e análise microbiológica de águas minerais de Caxambu – MG. **Revista pesquisa inovação farmacêutica**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 23-30, 2013.

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde. **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. 56 pg.

GUERRA, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1737-1747, 2001.

HASHIMOTO, E. H. **Avanço Metodológico no Biocontrole de Cianobactérias Toxigênicas com Ênfase a Degradação de Microcistina-LR e Bioensaio na Qualidade de Água e Piscicultura**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2007.

HISEM, D.; HROUZEK, P.; TOMEK, P.; TOMSÍCKOVÁ, J.; ZAPOMELOVÁ, E.; SKÁCELOVÁ, K.; LUKESOVÁ, A.; KOPECKY, J. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. **Toxicon**, v. 57, ed. 1, p. 76-83, jan, 2011.

HOEGER, S. J., HITZFELD, B. C., DIETRICH, D. R. Occurrence and Elimination of Cyanobacterial Toxins in Drinking Water Treatment Plants. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 231–242, 2005.

HOLLAS, C. E. **Avaliação da qualidade da água subterrânea utilizada para abastecimento na zona rural do município de Francisco Beltrão – Paraná**. 2015. 165 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Francisco Beltrão, 2015.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, B. C.; MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JAVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

LEE, T.; CHEN, Y.; CHOU, H. Toxicity Assay of Cyanobacterial Strains Using *Artemia salina* in Comparison with the Mouse Bioassay. **Acta Zoologica Taiwanica**, v. 10, n. 1, 1999.

LEAL, A. C.; SOARES, M. C.P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37 (Suplemento II), 2004.

MARTINS, N. D. **Efeitos da microcistina-LR (*Microcystis aeruginosa*) sobre parâmetros cardio-respiratórios de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 54 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, 2010.

MOTA, S. **Introdução à Engenharia Ambiental**. 5. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2012.

NICHOLSON, B. C.; BURCH, M. D. **Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines**. Austrália: Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, 2001. Disponível em: <[http://www.nhmrc.gov.au/\\_files\\_nhmrc/publications/attachments/eh22.pdf](http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh22.pdf)>. Acesso em: 08 jun. 2015.

NUNES, J. A. **Tratamento biológico de águas residuárias**. 3. ed. Aracaju: J. Andrade, 2012.

OBERHOLSTER, P.J.; BOTHA, A-M.; GROBBELAAR, J.U. *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 159-168, 2004.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLIVEIRA, J. M. B. **Remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* por meio de sedimentação e de flotação: avaliação em escala de bancada**. 2005. 122 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Universidade de Brasília, 2005.

POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA, P. Y.; SILVA, S. C.; DOVAL, J. C. L. **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <[http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Livro\\_todo.pdf](http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Livro_todo.pdf) >. Acesso em: 10 ago. 2015.

SANCHES, S. M.; PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 2012.

SANTIAGO, L. M. **Remoção de células de cianobactérias por processos de sedimentação e flotação por ar dissolvido: avaliação em escala de bancada**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SOARES, R. M. Toxicologia de cianotoxinas: microcistinas as estrelas do tema. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 259-271, 2009.

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 Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of PAHO**, v. 27, n. 3, p. 244-253, 1993.

TONETTO, Â. **Investigação proteômica comparativa entre cepa tóxica *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e a cepa não tóxica *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 43 (Cyanobacteria)**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, 2009.

TUCCI, C. E. M.; MARQUES, D. M. L. M. **Avaliação e controle da drenagem urbana**. 1. ed. v. 2. Porto Alegre: ABRH, 2001.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

WATANABE, M. F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. **Toxic microcystis**. Florida: CRC Press, 1996.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for Drinking Water Quality. Recommendations**. Geneva: World Health Organization. v. 1. 1993.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for Drinking Water Quality. Health Criteria and other supporting information**. Geneva: World Health Organization. v. 2. 1996.

**APÊNDICE A – Dados dos testes toxicológicos**

**Quadro 1 - Número de *A. salina* mortas e vivas em contato com a *M. aeruginosa* nas diferentes proporções.**

Tratamento	Proporções	<i>A.salina</i> vivas			<i>A.salina</i> mortas		
<b>Controle negativo</b>	CN	6	8	7	4	2	3
<b>Nível Vigilância</b>	[3,1]	10	10	6	0	0	4
	[6,2]	7	8	8	3	2	2
	[12,5]	6	7	7	4	3	3
	[25]	8	9	10	2	1	0
	[50]	8	7	8	2	3	2
	[100]	4	0	3	6	10	7
<b>Nível Alerta 1</b>	[3,1]	6	7	2	4	3	8
	[6,2]	4	5	8	6	5	2
	[12,5]	5	5	4	5	5	6
	[25]	7	7	6	3	3	4
	[50]	7	5	4	3	5	6
	[100]	5	8	10	5	2	0
<b>Nível Alerta 2</b>	[3,1]	1	1	1	9	9	9
	[6,2]	0	1	0	10	9	10
	[12,5]	2	0	0	8	10	10
	[25]	0	2	0	10	8	10
	[50]	2	0	2	8	10	8
	[100]	0	0	0	10	10	10
<b>Nível Alerta 3</b>	[3,1]	0	0	0	10	10	10
	[6,2]	0	0	0	10	10	10
	[12,5]	0	0	1	10	10	9
	[25]	0	0	0	10	10	10

	[50]	0	0	1	10	10	9
	[100]	0	0	0	10	10	10



**APÊNDICE B** – Distribuição normal em cada proporção da amostra teste ( $\alpha=5\%$ )

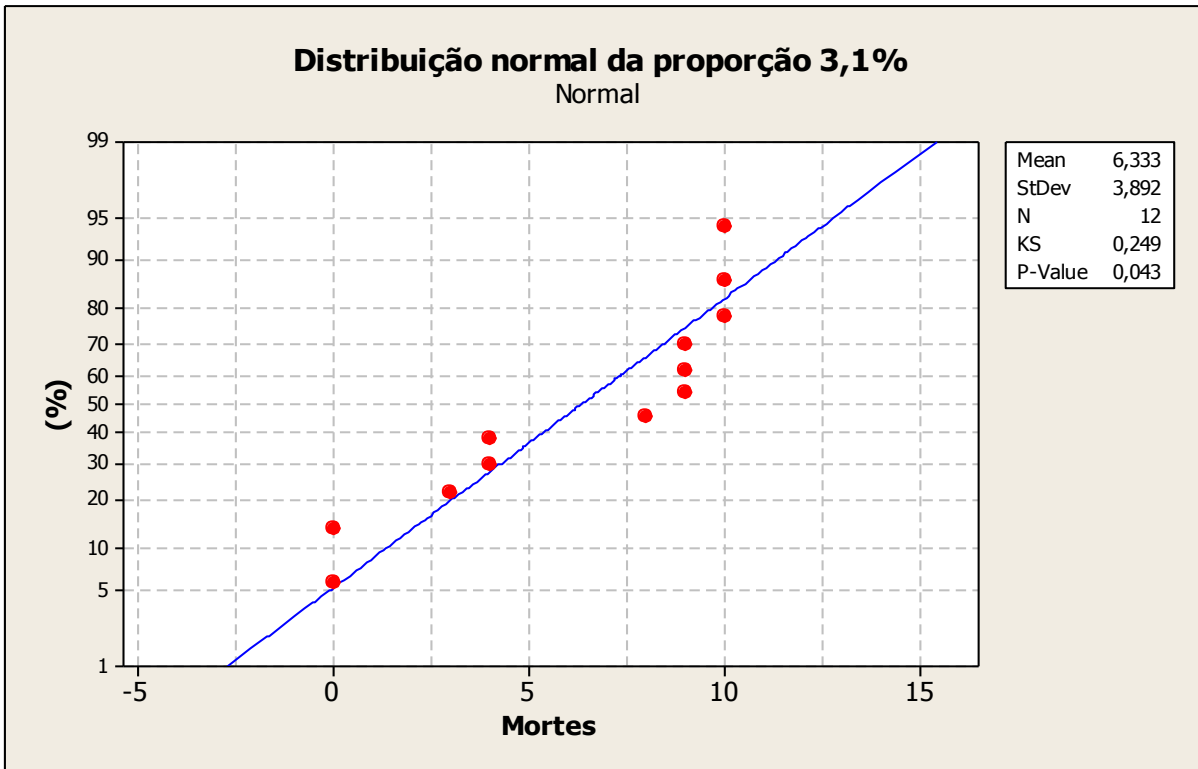


Gráfico 4 - Distribuição normal da proporção 3,1%

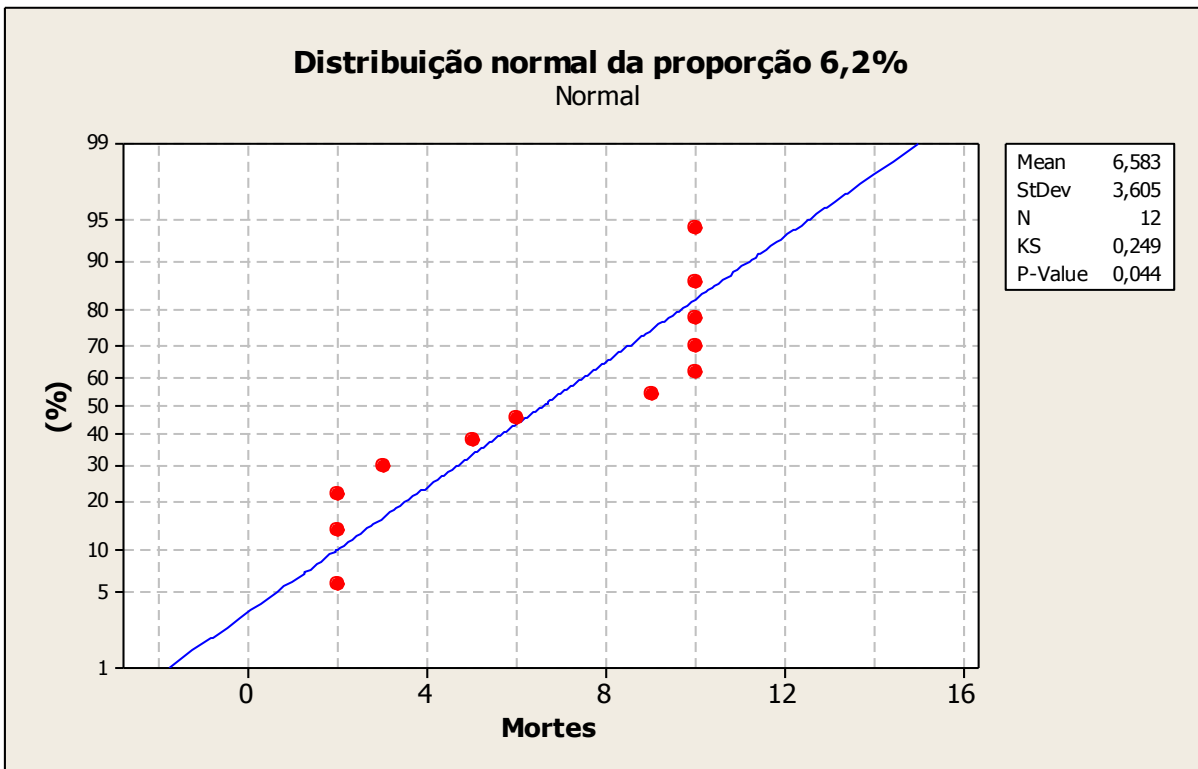


Gráfico 5 - Distribuição normal da proporção 6,2%

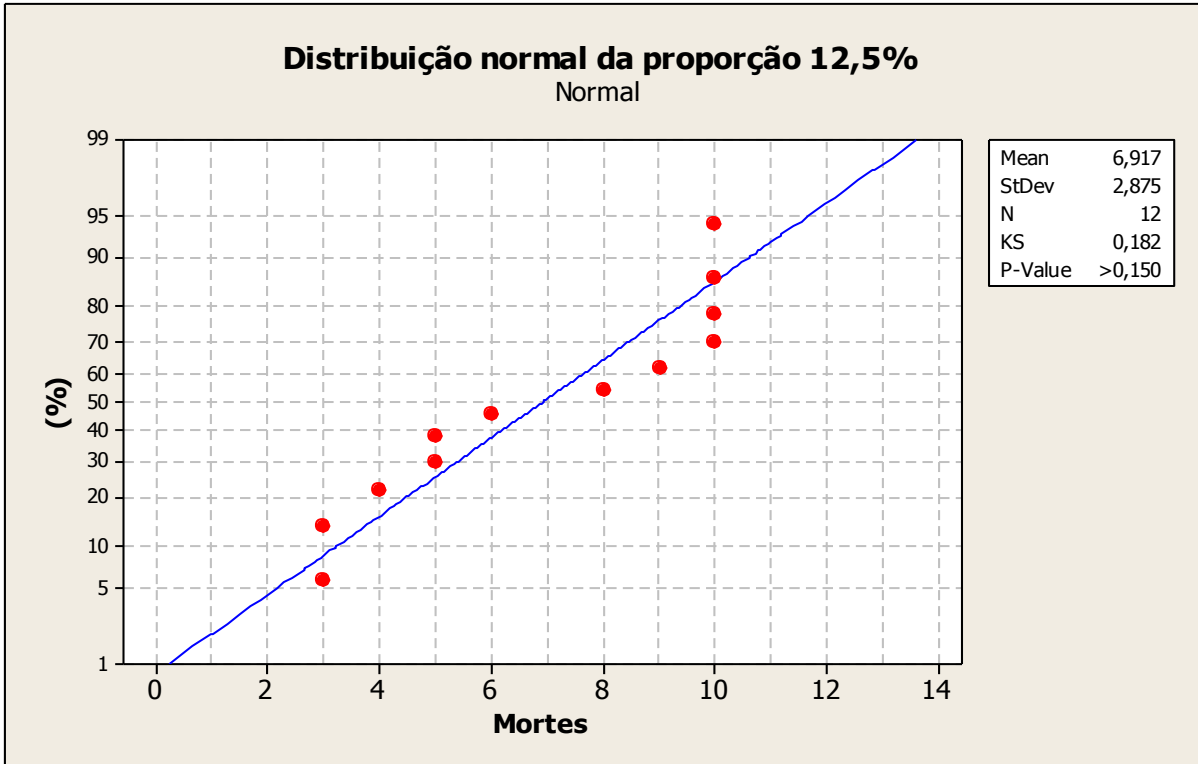


Gráfico 6 - Distribuição normal da proporção 12,5%

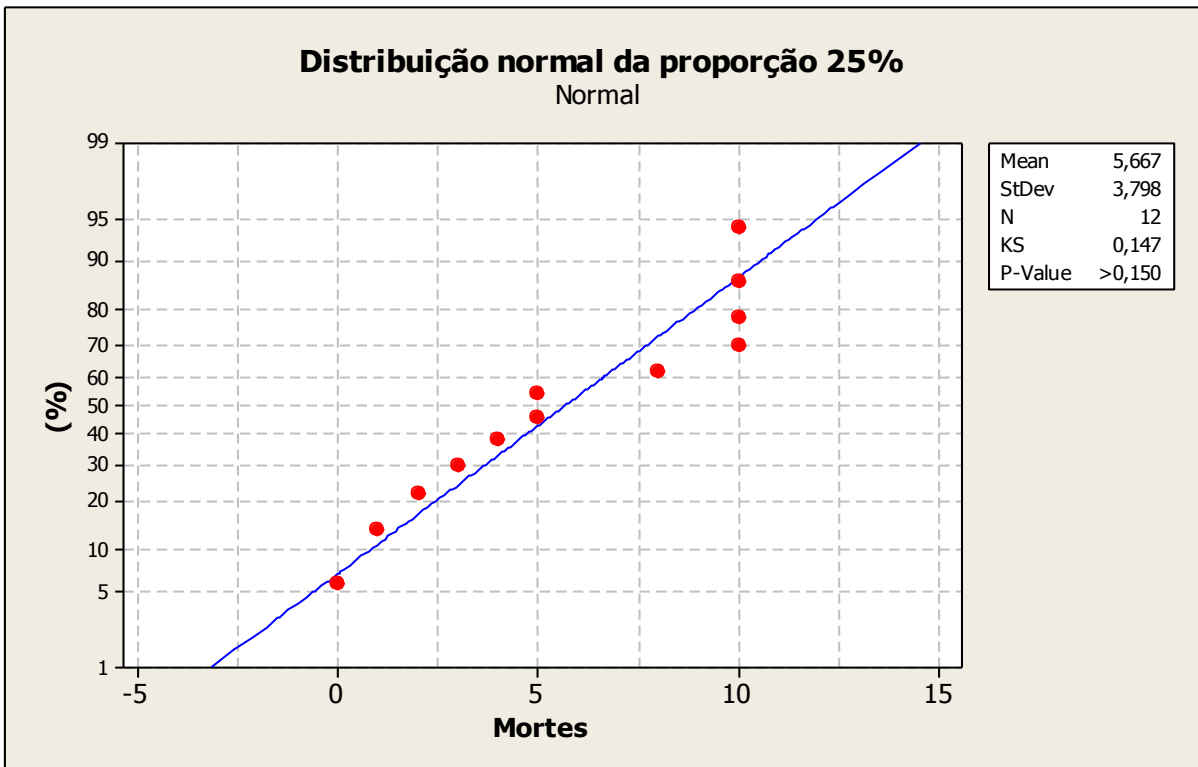


Gráfico 7 - Distribuição normal da proporção 25%

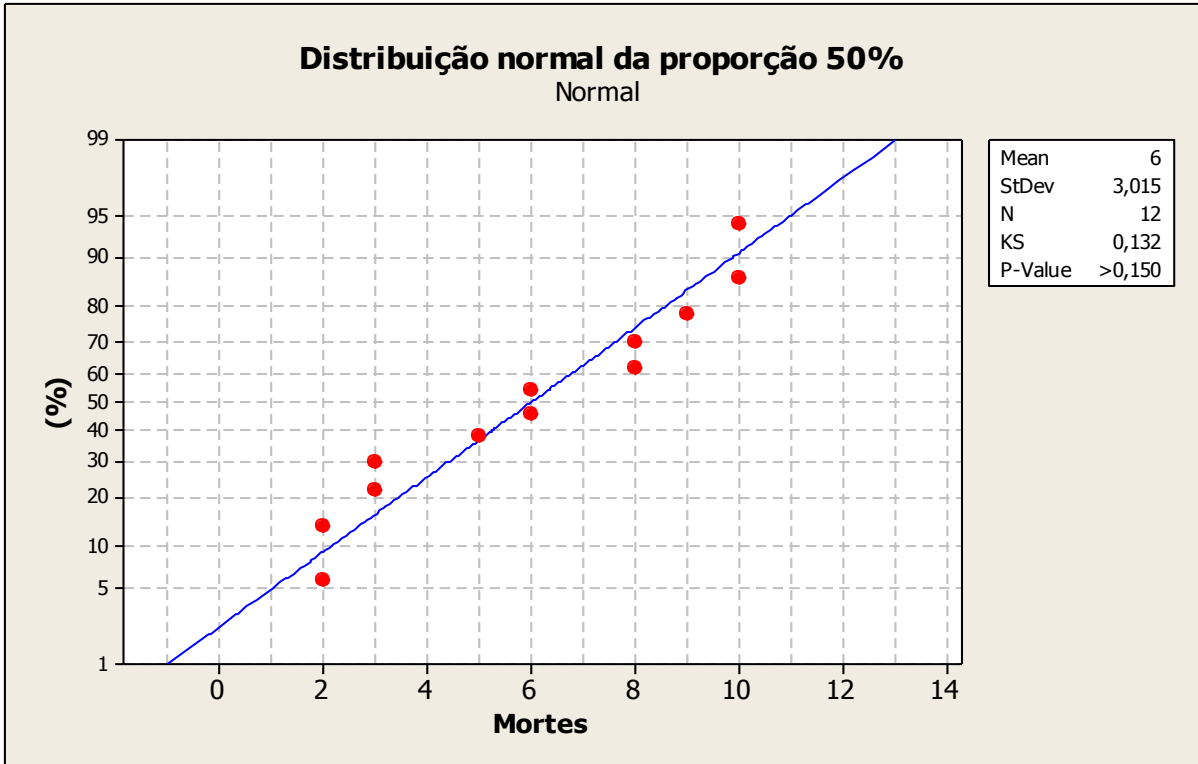


Gráfico 8 - Distribuição normal da proporção 50%

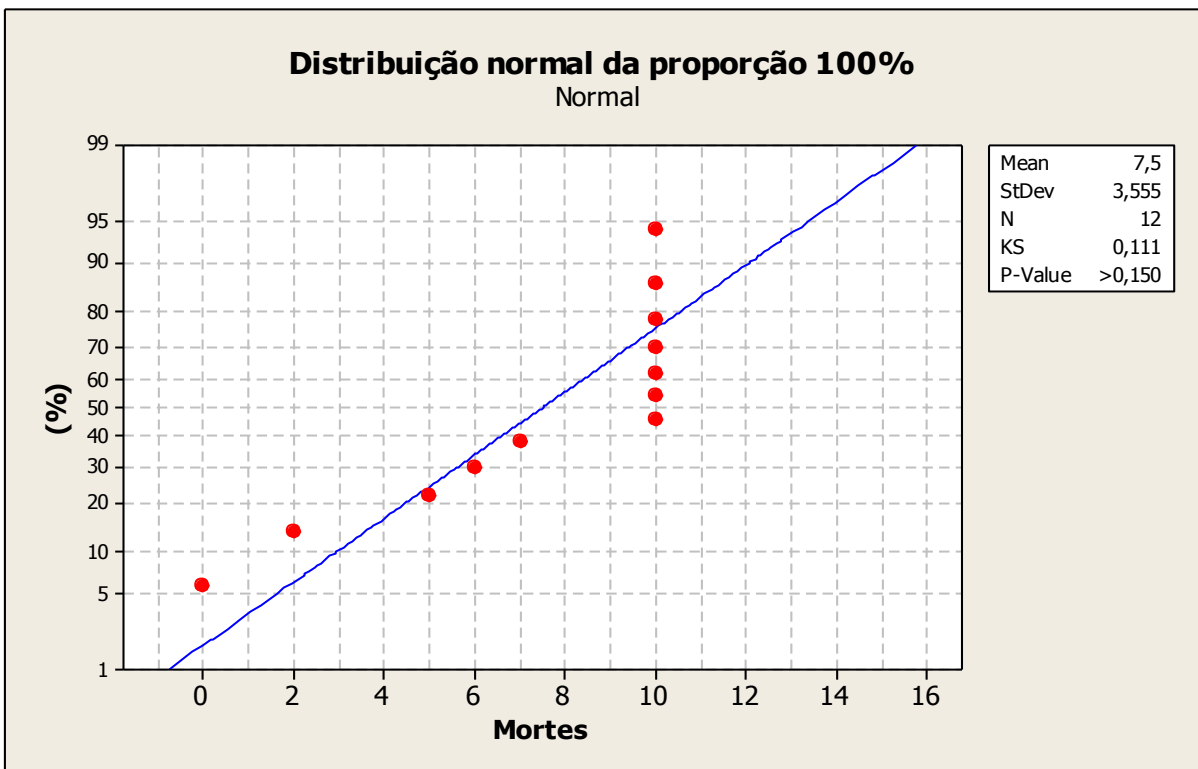


Gráfico 9 - Distribuição normal da proporção 100%

**APÊNDICE C** – Distribuição normal em cada nível de monitoramento ( $\alpha=5\%$ )

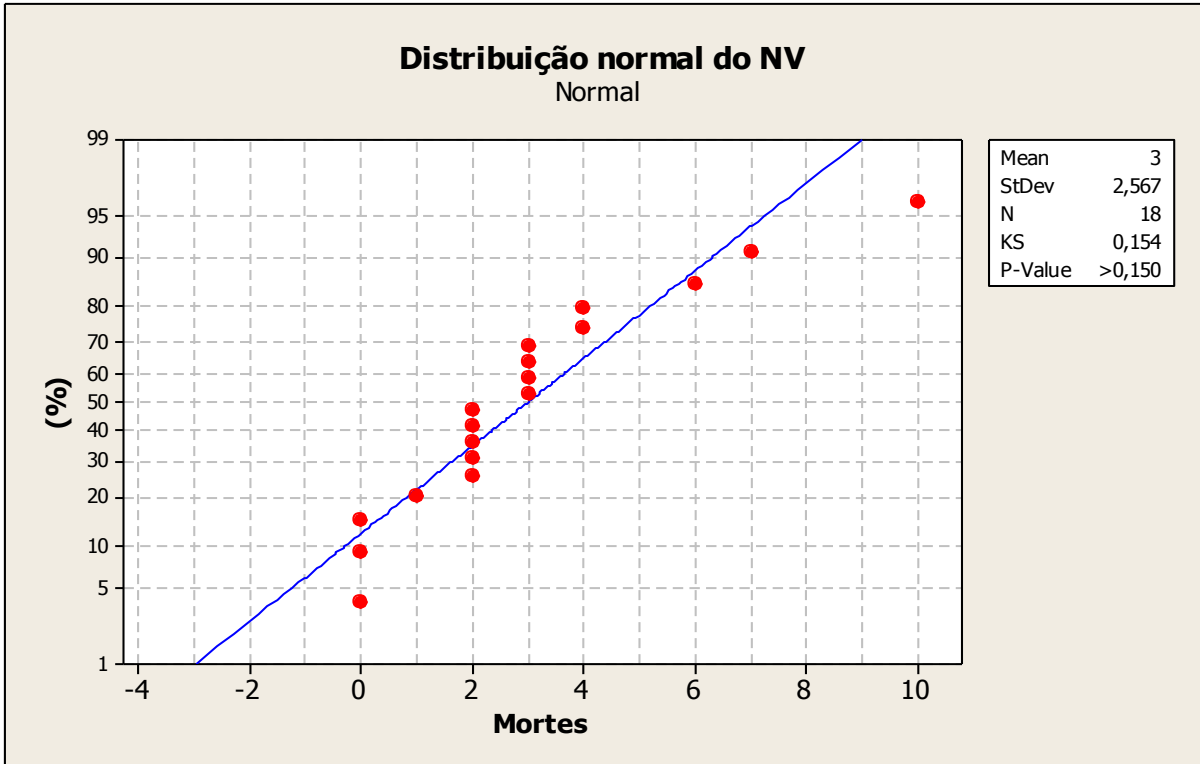


Gráfico 10 - Distribuição normal do NV

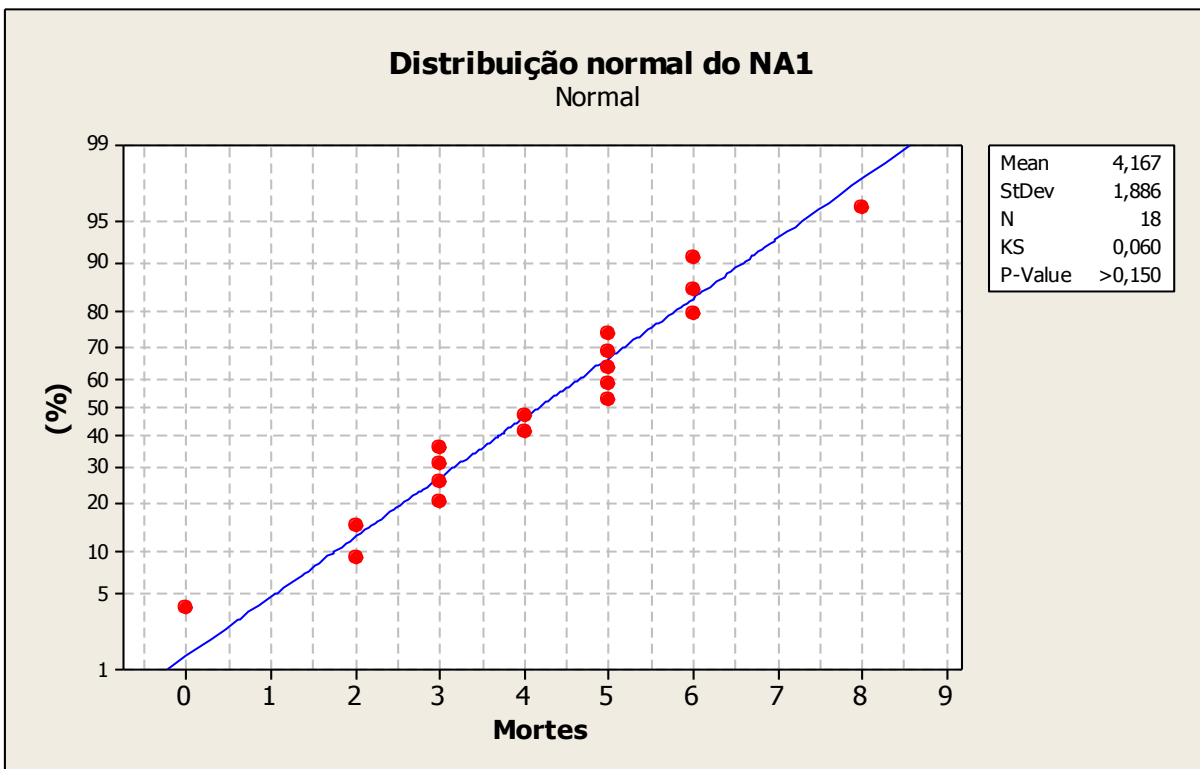


Gráfico 11 - Distribuição normal do NA1

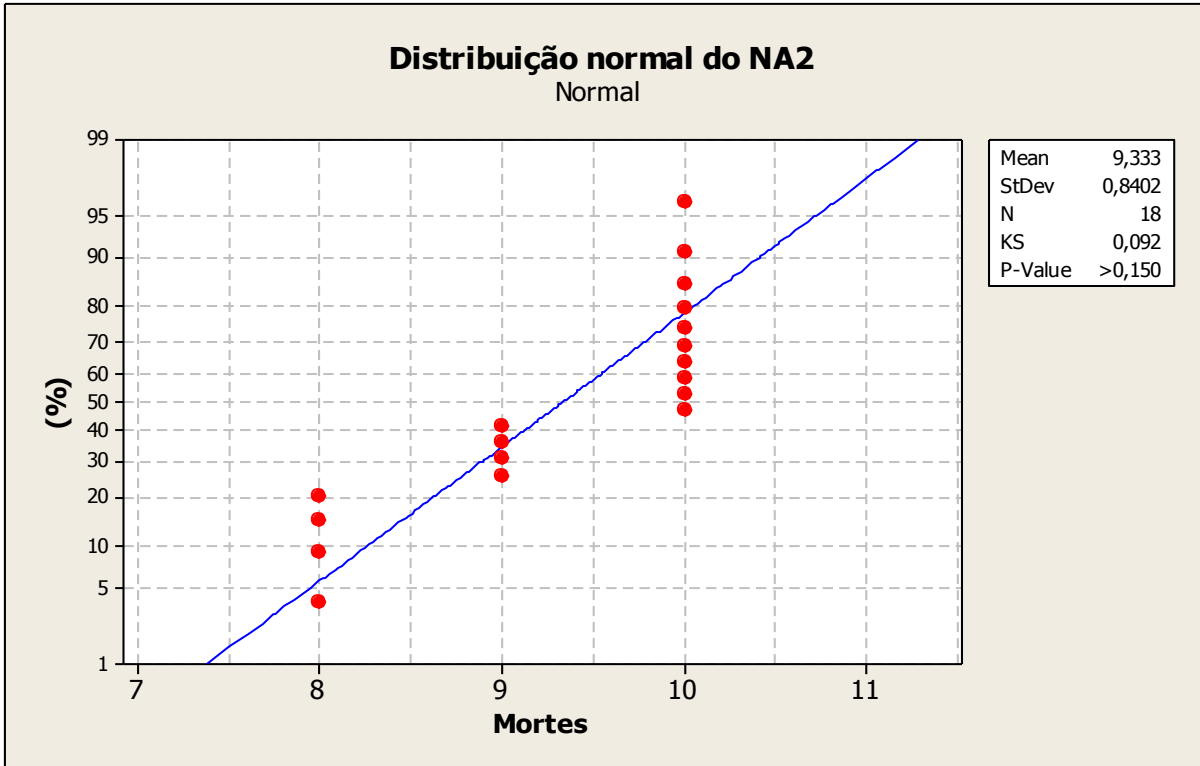


Gráfico 12 - Distribuição normal do NA2

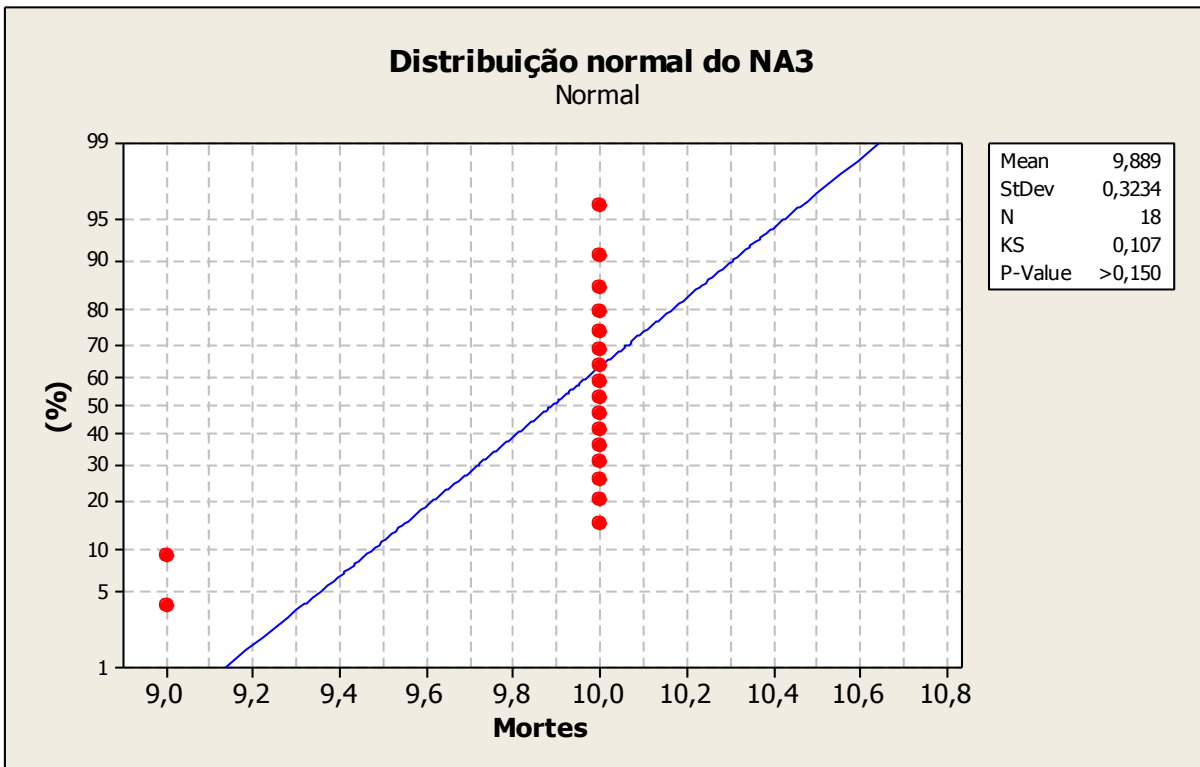


Gráfico 13 - Distribuição normal do NA3

