

Cianobactérias e microcistina em águas de rio destinadas ao abastecimento de centro industrial de Caruaru, PE, Brasil

Cyanobacteria and microcystin in river waters intended to industrial park supply in Caruaru-PE, Brazil

Catarina Paula da Silva Ramos^{1,*}

Talita Gomes Calaça Menezes^{II}

Almerinda Agrelli^{II}

Iasmine Andreza Basilio dos Santos Alves^{II}

Jaylla Cavalcanti da Luz^{II}

Cícero Tiago Gomes da Silva^{III}

Irapuan Oliveira Pinheiro^I

Agenor Tavares Jácome Júnior^{II}

RESUMO

As cianobactérias são responsáveis pela produção de cianotoxinas que, uma vez acumuladas, podem causar sérios danos à saúde humana e animal. As microcistinas são o tipo mais comum de cianotoxinas e são promotoras de tumores hepáticos. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de cianobactérias e determinar a presença da toxina microcistina em amostras de água do rio Ipojuca no perímetro da cidade de Caruaru, PE, Brasil. Amostras de água foram coletadas em cinco pontos estratégicos deste manancial durante treze meses consecutivos. Para a pesquisa de cianobactérias, foi utilizado o método de sedimentação de Utermöhl para quantificação e identificação das espécies. Para a pesquisa de microcistina foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados mostraram três gêneros produtores de microcistinas e a presença desta toxina em 100% das amostras analisadas, confirmando a relevância do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em águas de abastecimento público, pois assim como o rio Ipojuca, vários mananciais de Pernambuco apresentam florações de cianobactérias que podem ser tóxicas. Este trabalho mostrou a importância do estudo destes organismos e a detecção de suas toxinas fornecendo subsídios às ações preventivas de vigilância ambiental em saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Cianobactéria; Água; Microcistina; CLAE; Ipojuca

ABSTRACT

Cyanotoxin producing Cyanobacteria can cause serious harm to human and animal health. Microcystins, the most common type of cyanotoxins, promote liver tumors in men. Thus, we aimed at verifying the occurrence of cyanobacteria in water samples from the Ipojuca's river at the perimeter of Caruaru-PE, Brazil, and determining if the toxin was also present. Water samples were collected at five strategic points over thirteen consecutive months. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to obtain microcystins. The Utermöhl sedimentation method was used to identify and quantify species. This approach found that the toxin was present in 100% of the samples, and pointed to three genera of microcystin producers. The river provides the one of the source for public water supply in the region, confirming the relevance of continuous monitoring of cyanobacteria and cyanotoxins. As observed in the Ipojuca river, several water sources at Pernambuco also present recurrent cyanobacterial blooms, which may contain toxin producers. The blooms occur mainly in the dry season, when water is an invaluable commodity for humans and life stock. Finally, this study showed the importance of monitoring microcystin to support preventive actions in environmental and public health surveillance.

KEYWORDS: Cyanobacteria; Water; Microcystin; HPLC; Ipojuca

^I Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil

^{II} Faculdade Associação Caruaruense de Ensino Superior (Faculdade ASCES), Caruaru, PE, Brasil

^{III} Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), Recife, PE, Brasil

* E-mail: catarinasramos@yahoo.com.br



INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, a água tem se mostrado um elemento essencial para a sociedade, sendo reconhecida como um dos meios mais importantes para a manutenção da vida e realização de qualquer atividade desenvolvida pelo ser humano¹. Porém, em decorrência do crescimento demográfico, do uso intensivo da água nos processos produtivos e da poluição gerada pelas atividades antrópicas, os recursos hídricos têm sofrido transformações no decorrer dos anos².

Como consequência da poluição, ocorre um fenômeno que causa uma série de impactos negativos na qualidade da água conhecido como eutrofização - aumento das concentrações de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo - dos ecossistemas de água doce e o comprometimento dos múltiplos usos dos recursos hídricos em geral, sendo a causa mais comum de florações de cianobactérias nos corpos d'água utilizados para abastecimento público podendo representar um sério risco à saúde da população^{3,4,5,6}.

As florações podem interferir no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, pois criam um biofilme superficial que altera a transparência do meio, podendo conduzir à desoxigenação do corpo d'água. Além disso, representam um sério problema para as estações de tratamento de água, pois podem causar perda de carga dos filtros e alterações organolépticas da água tratada, conferindo gosto de terra pela produção de compostos metabólicos tais como geosmina e o 2-metil-isoborneol (MIB)⁷, elevando o custo do tratamento de água, além de produzirem poderosas toxinas que causam graves injúrias a animais terrestres, aquáticos e humanos, através da ingestão ou contato com a água contaminada.

Denominadas cianotoxinas, essas substâncias podem ser produzidas em todos os estágios do crescimento da célula e são liberadas quando ocorre lise celular⁸. No meio aquoso, as cianotoxinas podem persistir por dias ou várias semanas⁹. As causas da produção não são totalmente conhecidas e parecem estar relacionadas com diferentes variáveis ambientais e função protetora contra herbivoria^{10,11}. A natureza da formação e imprevisibilidade de produção de toxina torna as florações extremamente perigosas para saúde pública e para a biota aquática^{8,12}.

Apesar da existência de uma grande variedade de cianotoxinas, as microcistinas são as mais frequentemente encontradas em florações de água. A ação da microcistina consiste no bloqueio das fosfatases hepáticas, o que resulta em danos à arquitetura do fígado e, por conseguinte, ocasionando hemorragia, a qual pode ser letal. Em situações de exposição crônica a baixas doses, verifica-se uma supressão da apoptose e promoção da divisão celular, resultando em tumor hepático e outros^{13,14}.

No Brasil, as péssimas condições sanitárias verificadas em muitas bacias hidrográficas, densamente e desordenadamente ocupadas, resultam na degradação generalizada dos recursos hídricos¹⁵. Muitas florações já foram reportadas em corpos d'água brasileiros, inclusive em reservatórios utilizados para o consumo humano^{16,17}.

Um exemplo deste panorama é o rio Ipojuca, que representa 3,49% da área total do Estado de Pernambuco. Suas águas têm sido empregadas no abastecimento público de 24 municípios inseridos na bacia hidrográfica e exercem um papel fundamental para o desenvolvimento econômico da região - contemplando o suporte às atividades tanto industriais quanto agrícolas. Entretanto, nenhuma das cidades em questão possui adequado esgotamento sanitário, o que acarreta no despejo constante de uma elevada carga de poluentes, de origem doméstica, agrícola e industrial, nas águas do rio¹⁸. Caruaru, por sua vez, é um dos quatro maiores municípios banhados pelo rio e destaca-se como um dos maiores poluidores do mesmo¹⁹.

O primeiro caso comprovado no mundo de morte de pessoas por toxina de cianobactéria ocorreu no Brasil em fevereiro de 1996, no Instituto de Doenças Renais (IDR) de Caruaru, Pernambuco, quando 131 pacientes que faziam tratamento em uma clínica de hemodiálise sofreram intoxicação hepática causada por microcistinas. A água utilizada por essa clínica era proveniente do Açude Tabocas, retirada do estágio intermediário da estação de tratamento da cidade e clorada num caminhão-pipa, o que provocou a liberação da toxina por cianobactérias; 76 pacientes morreram no prazo de 20 meses^{20,21}.

Este fato impulsionou o estudo dos riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em corpos d'água utilizados para o abastecimento público e a criação de legislação específica para o aperfeiçoamento do controle da qualidade da água, incluindo o monitoramento de cianotoxinas. O Brasil foi o primeiro país a estabelecer tal medida, através da Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, atualizada recentemente pela Portaria nº 2914/2011, tendo 1 µg/L como valor máximo permitido de microcistinas em águas destinadas ao abastecimento público^{22,23}. De acordo com esta Portaria, os órgãos públicos federais, estaduais, distritais e municipais têm a responsabilidade de promover e acompanhar a vigilância da qualidade da água²³.

De maneira geral, essas águas são tratadas antes de serem distribuídas para a população, porém, o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas ainda é uma prática pouco comum devido à falta de mão de obra especializada e de um método prático e barato de detecção. Vale salientar que nenhum estudo desta natureza foi realizado anteriormente no rio Ipojuca.

Diante de potenciais consequências visualizadas pela exposição da população às cianobactérias e suas toxinas, principalmente no âmbito da saúde pública, observa-se a relevância do seu monitoramento nos reservatórios destinados ao abastecimento público e de animais, de modo a avaliar a eficácia do atual sistema de controle de tais toxinas e, se necessário, dar embasamento para a elaboração de políticas que venham a aprimorá-lo, visando garantir a segurança da saúde humana.

O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência das cianobactérias e determinar a presença da toxina microcistina no rio Ipojuca no perímetro de Caruaru, no período de novembro de 2011 a dezembro de 2012.



MATERIAL E MÉTODO

Coleta e amostragem

A coleta de água do rio Ipojuca foi realizada em cinco pontos estratégicos no perímetro que banha o município de Caruaru. Os pontos foram definidos da seguinte forma: o primeiro encontra-se na entrada da cidade, caracterizado pela presença de atividade agrícola; o segundo e o terceiro são adjacentes a áreas industriais; o quarto está na proximidade de locais onde se verifica despejo de dejetos humanos; e o quinto ponto refere-se à porção do rio que passa pela saída de Caruaru (Figura 1).

A amostragem foi realizada mediante a coleta de 1 L de água para cada ponto, sendo 500 mL destinados à contagem de cianobactérias e 500 mL para a análise de microcistinas, a uma profundidade de aproximadamente 15 a 20 cm da superfície. Para a pesquisa de cianobactérias, a coleta foi realizada em recipientes de polietileno de 250 mL contendo 25 mL de solução de formalina a 20%, com concentração final de 2%, e em frascos de polietileno de 250 mL contendo 2,5 mL de solução de lugol, com concentração final de 1%. Para a análise de microcistinas, foram coletados 500 mL de amostra e, em seguida, adicionados ácido clorídrico PA (1 mL do ácido para cada 250 mL da amostra) e mantidas ao abrigo da luz, sob refrigeração.

A coleta e análise das amostras de água do rio Ipojuca foram realizadas no período de novembro de 2011 a dezembro de 2012. Esse período foi subdividido em dois, seco e chuvoso, possibilitando assim uma análise comparativa entre cianobactérias, temperatura, período do ano e presença de microcistinas. O período seco compreendeu os meses de novembro 2011 a abril de 2012. O período chuvoso, por sua vez, compreendeu os meses de maio a outubro de 2012. As amostras de água foram analisadas no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN-PE).

Identificação e contagem de cianobactérias

O método de sedimentação empregado foi o descrito por Utermöhl (1958)²⁴. Para as análises quantitativas, as amostras fixadas com lugol foram sedimentadas em cubetas de Utermöhl de 5 mL por um período de 24 horas.

A contagem das cianobactérias foi realizada com o auxílio do retículo de Whipple, utilizando microscópio invertido com contraste de fase na objetiva de 40X. Após a contagem, foi realizado o cálculo do total de indivíduos de cada espécie, a partir da multiplicação da respectiva média de células pelo fator (F) de conversão do número de células contadas de acordo com a norma CETESB (2005)²⁵. Os resultados foram expressos em número de células de cianobactérias por mililitro. O fator (F) é calculado dividindo-se a área do fundo da cubeta de Utermöhl pela área examinada e, esse resultado, pelo volume da amostra na câmara.

Para a identificação das espécies, as amostras contendo formol foram homogeneizadas e colocadas em dois tubos de 50 mL, de fundo cônico. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 2.500 rpm, o sobrenadante foi retirado de cada tubo até o limite cônico, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Com o concentrado residual dos tubos foram feitas três lâminas para serem observadas em microscópio ótico. Os organismos foram identificados através de chaves de identificação segundo Komárek e Anagnostidis (1989; 2005)^{26,27}. O critério utilizado para avaliar os valores máximos permitidos (VMP) para as densidades celulares de cianobactérias em águas de mananciais destinadas ao abastecimento público é o preconizado pela RDC nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, sendo este limite de 50.000 cel.mL⁻¹ de cianobactérias²⁸.

Extração da toxina microcistina

Amostras de 500 mL coletadas nos 5 pontos do rio Ipojuca foram enviadas ao laboratório de cianotoxinas do LACEN-PE para análise de microcistinas. As amostras foram submetidas a um



Ponto 1: -8.300665, -36.002164 (Barragem Taquara)
Ponto 2: -8.290516, -35.985427 (Ponte sobre a BR 104)
Ponto 3: -8.287947, -35.971179 (Feira de Caruaru)
Ponto 4: -8.283700, -35.961437 (Travessa do Riachão, 2-28)
Ponto 5: -8.285929, -35.935237 (Rendeiras)
Fonte: <https://maps.google.com.br/>

Figura 1. Localização dos pontos de amostragem (P1 a P5) no perímetro do rio Ipojuca em Caruaru-PE.



processo de filtração para extração das frações intracelular e extracelular da microcistina de acordo com a metodologia desenvolvida por Krishnamurthy et al. (1986)²⁹. Para tanto, 100 mL de cada amostra foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo Millipore®, utilizando filtros de fibra de vidro com malha de 0,47 µm de diâmetro. A extração da microcistina livre foi realizada utilizando-se um cartucho do tipo C₁₈ (octadecil) de extração em fase sólida (SPE), em sistema Manifold®. A velocidade de fluxo foi padronizada em 1 mL.min⁻¹. Este procedimento permite que o analito de interesse seja extraído através da aplicação de um pequeno vácuo e emprega 5 etapas: ativação do sorvente com 10 mL de metanol (MeOH) 100% para deixar os sítios ativos disponíveis; condicionamento do sorvente com 10 mL de água MilliQ®; introdução da amostra, etapa que ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes; limpeza da coluna com 10 mL de MeOH 20% para retirar os interferentes menos retidos que o analito; eluição e coleta do analito em 10 mL de MeOH 90% contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA).

Depois desse procedimento as amostras foram secas em evaporador rotativo a 57°C, 50 rpm e, em seguida, ressuspensas em 1 mL de MeOH 20% grau HPLC e filtradas em filtros Millex LCR com membrana PTFE modificada de 0,45 µm e 13 mm para então serem injetadas no cromatógrafo. Estes extratos concentrados ficaram conservados em freezer -20°C até o momento da análise cromatográfica.

Para a extração da microcistina intracelular, os filtros contendo o séston resultante da filtração inicial foram colocados em um bécker de vidro de 100 mL contendo 10 mL de MeOH 75% e deixados por uma hora no banho de ultrassom para que houvesse o rompimento da membrana nuclear e conseqüentemente liberação da toxina. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 21000 rpm e o sobrenadante separado para análise. Este mesmo procedimento foi realizado três vezes seguidas para que não houvesse perda alguma do analito. Ao final do processo, os sobrenadantes das três extrações foram colocados em um único bécker, homogeneizado, transferido para um balão de fundo chato com tampa esmerilhada e secado em evaporador rotativo a 57°C, a 50 rpm até que o MeOH evaporasse completamente. Em seguida, o material foi ressuspensado em 10 mL de MeOH a 20%. Sob as mesmas condições consideradas para a extração da microcistina extracelular, a amostra foi submetida à extração em fase sólida utilizando-se um Manifold®. Posteriormente, as amostras foram secas em rotavapor nas mesmas condições anteriores, ressuspensas em 1 mL de MeOH 20% grau HPLC e filtradas em filtros Millex LCR com membrana de PTFE modificada de 0,45 µm e 13 mm para então serem injetadas no cromatógrafo³⁰. Os extratos concentrados ficaram armazenados em freezer a -20°C até o momento da análise cromatográfica.

Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As determinações analíticas de microcistina foram feitas no Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicos da Universidade de Pernambuco e baseou-se na metodologia desenvolvida por Spooft et al. (2010)³¹. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Agilent série 1200 equipado com um

detector de arranjo de diodos (DAD) e *software* Chemstation for LC 3D systems. Foi utilizada uma coluna Phenomenex C₁₈ fase reversa Synergi Fusion RP-10 (50 mm x 2,0 mm x 2,5 µm) acompanhada de pré-coluna e mantida a uma temperatura de 60°C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura Milli-Q e acetonitrila grau HPLC ambos contendo 0,05% de TFA. A acetonitrila foi previamente filtrada em membrana de polipropileno hidrofílica de 0,22 µm. A separação cromatográfica foi feita com uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, usando um gradiente de eluição que começou com 20% de acetonitrila, aumentando até 70% ao fim de 4 min, seguido de uma diminuição até os 20% aos 5 min e se mantendo constante até o final dos 7 min. O volume injetado foi de 20 µL. As microcistinas foram detectadas devido a sua capacidade de absorvância no ultravioleta aos 238 nm³². A presença de microcistinas nas amostras ambientais foi determinada a partir da comparação com o tempo de retenção de um padrão cromatográfico de microcistina-LR da Alexis® (Alexis Corporation-Lausen, Switzerland).

Processamento e análise dos dados

Os dados foram processados e analisados no programa Excel 2007 (Microsoft Office®). Para as cianobactérias, foram calculados o número de células por mL e a frequência de ocorrência de cada espécie nas amostras analisadas. Para a análise da microcistina, foi construída a equação da reta sendo possível inferir sobre a concentração de microcistina presente em cada uma das amostras, através da interpolação das leituras das amostras na curva de calibração. Todos os resultados foram relacionados com os pontos de origem das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eutrofização é um dos fatores responsáveis pela degradação da qualidade das águas, reconhecida como um problema da poluição desde meados do século XX³³. No rio Ipojuca, tais circunstâncias foram observadas com a ocorrência de florações durante todo o período de estudo. Foram realizadas amostragens em triplicata entre os meses de novembro de 2011 a dezembro de 2012, sendo detectada a presença de cianobactérias produtoras de toxinas durante todo o período com quantidades acima de 20.000 cel.mL⁻¹, condição suficiente para que seja recomendada a análise de microcistinas segundo preconizado pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde²³.

A contagem das cianobactérias presentes nas amostras analisadas apresentou um comportamento diferente em relação aos pontos de coleta entre os períodos seco e chuvoso, ocorrendo uma queda na concentração de cianobactérias neste último período (Tabela 1). De acordo com Fonseca et al. (2010)³⁴, a maioria das cianobactérias tem maior taxa de crescimento em temperaturas superiores a 25°C, sendo que temperaturas entre 18 e 25°C ajudam na produção de cianotoxinas, enquanto temperaturas abaixo de 10°C e acima de 30°C diminuem sua produção. A diminuição do número de células/mL pode ser explicada pela diminuição da temperatura no decorrer das coletas, com conseqüente baixa na taxa de reprodução das cianobactérias. O mesmo ocorreu no estudo de Vasconcelos



e Cerqueira (2001)³⁵, Badylak e Phlips (2004)³⁶, Silva et al. (2013)³⁷, nos quais se percebeu uma diminuição no fator de multiplicação celular das cianobactérias em ambientes mais frios.

Outro fator que pode justificar a queda na concentração de cianobactérias é a diluição dos nutrientes devido às precipitações pluviárias que ocorrem nesse período resultando no declínio das densidades, como mostrado nos trabalhos de Fonseca et al. (2010)³⁴, Silva et al. (2013)³⁷. Moura et al. (2007) observaram diferenças na concentração do nitrogênio total e do fósforo entre a estação seca e a chuvosa estudando outro rio de Pernambuco³⁸. O nitrogênio total diminuiu no verão e aumentou no inverno, enquanto o fósforo total aumentou no verão e diminuiu no inverno. Segundo os autores, essa situação aponta para um possível transporte pluvial e carreamento de terra com material nitrogenado para dentro do rio e para um possível impacto da temperatura da água no ciclo do fósforo, durante o período seco.

No período seco, houve um aumento significativo no valor total de cianobactérias, alcançando o valor máximo de concentração em cel/mL. Esse fato é explicado pelo aumento da temperatura e ao aquecimento da produção têxtil, que encontra nos meses de outubro a dezembro, seus maiores índices de demanda, devido às datas festivas de passagem de ano.

Com relação à análise entre os diferentes pontos de uma mesma coleta, o índice mais baixo de concentração celular por ponto foi encontrado no ponto 1, provavelmente pelo fato de se encontrar no início de Caruaru, onde o rio ainda não recebe cargas muito altas de dejetos, sendo assim o ambiente menos eutrofizado. O ponto 2, situado próximo a áreas de dejetos humanos, se mostrou bastante eutrofizado. Entretanto, neste local, a correnteza é mais forte e há um alargamento do rio dificultando o estabelecimento das colônias na superfície da água. Em contrapartida, no ponto 3, que apresenta baixo volume de água e baixa correnteza, foi encontrado altos índices de concentração de cianobactérias. Foi também onde ocorreu a maior descarga de produtos industriais.

Fato semelhante foi evidenciado no trabalho de Vasconcelos e Cerqueira (2001), porém, nos resultados de seu trabalho, a maior concentração encontrada foi inferior à do presente estudo (6.000 cels/mL contra 200.000 cels/mL)³⁵. Essa diferença reflete aspectos das saúdes pública e ambiental da região agreste pernambucana, além de fatores socioculturais que agravam ainda mais a situação de descaço com os recursos hídricos. Nos pontos 4 e 5, o volume de água é

consideravelmente maior, diluindo os resíduos industriais e humanos, com consequente baixa nas concentrações em relação ao ponto 3.

As cianobactérias predominantes foram a *Synechocystis aquatilis* e o *Synechococcus* spp., sendo encontrados em todos os pontos de coleta tanto no período seco como no chuvoso. As espécies *Planktothrix isoethrix*, *Merismopedia* spp, *Geitlerinema amphibium* se estabeleceram na estação seca. A espécie *Synechococcus sigmaideus* esteve presente apenas no ponto 5 em ambas as estações. As espécies *Planktothrix agardhii*, *Synechocystis aquatilis* e *Geitlerinema amphibium* são produtoras da microcistina-LR e estavam presentes nos pontos de maior eutrofização (pontos 2 e 3). Este registro é uma prova do alto estágio de eutrofização do rio Ipojuca. Soares et al. (2013) sugerem que a alta flexibilidade destes táxons em se adaptar às mudanças ambientais sazonais podem ter promovido uma vantagem adicional para o aumento de blooms persistentes, particularmente nas regiões tropicais³⁹. Estudos em reservatórios eutróficos tropicais registraram a ocorrência de florações de múltiplas espécies de algas formado por cianobactérias potencialmente tóxicas^{40,41}, principalmente no nordeste do Brasil, onde a densidade destes micro-organismos são uma característica recorrente em reservatórios de abastecimento público^{38,42,43,44}.

Com relação à análise das microcistinas das amostras analisadas, os cromatogramas do padrão de microcistina-LR (Figura 2) apresentaram um tempo de retenção médio de 4,74 min, com um desvio padrão de $\pm 0,14$. Este valor foi menor que o encontrado no estudo de Sanches et al. (2007)¹⁵ e Kuroda et al. (2007)⁴⁵, em decorrência da mudança da coluna empregada bem como das condições cromatográficas. O valor obtido por este estudo também diferiu do reportado por Spooft et al. (2010)³¹, sendo superior, apesar das variáveis anteriormente citadas serem idênticas no estudo destes e na presente pesquisa, isto pode ser justificado pelo emprego de padrão de marca distinta.

Todas as amostras consideradas neste estudo apresentaram um pico no intervalo supracitado comprovando que o rio Ipojuca, no perímetro de Caruaru, apresenta florações de cianobactérias produtoras da toxina microcistina.

A presença das referidas florações e, por conseguinte, da microcistina no rio Ipojuca é condizente com a literatura, uma vez que Muller et al. (2009) ressaltam que ambientes aquáticos lênticos continentais de clima tropical onde as temperaturas

Tabela 1. Distribuição média de cianobactérias (cel/mL) nos diferentes pontos de coleta.

	Estação Seca (Novembro-Abril)					Estação Chuvosa (Maio-Outubro)				
	Ponto1	Ponto2	Ponto3	Ponto4	Ponto5	Ponto1	Ponto2	Ponto3	Ponto4	Ponto5
<i>Planktothrix agardhii</i>	-	94.298	654.235	231.264	327.117	-	232.279	410.799	209.964	161.276
<i>Planktothrix isoethrix</i>	-	18.257	12.678	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geitlerinema amphibium</i>	-	1.930	2.672	-	-	-	-	-	-	-
<i>Merismopedia</i> spp.	8.725	5.235	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Synechocystis aquatilis</i>	32.446	40.606	32.147	44.302	36.618	26.503	18.159	33.701	20.842	13.905
<i>Synechococcus sigmaideus</i>	-	-	-	-	2.235	-	-	-	-	4.449
<i>Synechococcus</i> spp.	17.450	17.602	14.887	13.645	14.641	26.470	20.580	18.159	15.181	9.881

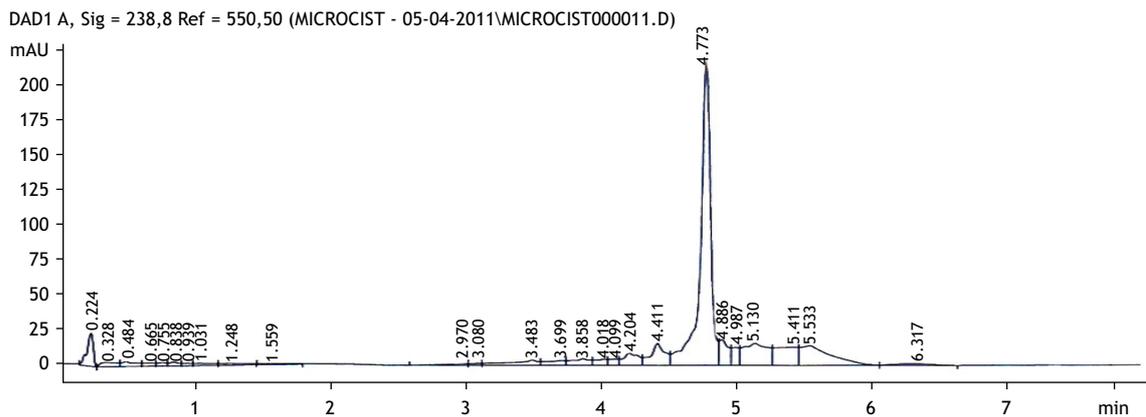


Figura 2. Cromatograma da amostra de microcistina-LR. Coluna C18 RF Sinergi, detecção da absorbância em 238 nm, velocidade de injeção de 1 mL/min, temperatura de 60°C.

são elevadas parecem estimular seu desenvolvimento⁴⁶. Além disso, deve-se levar em consideração que o intenso despejo de dejetos neste ambiente aquático associado ao arraste da matéria orgânica consequente à ação das chuvas, fatores também considerados por Brandão e Domingos (2006), provavelmente contribuíram para um aumento da intensidade da eutrofização⁴⁷. Este fenômeno, por sua vez, também consiste num fator que favorece a existência das toxinas, corroborando com as argumentações de Tonietto (2009)⁴⁸, Almeida et al. (2006)⁴⁹ e Kamogae et al. (2007)⁵⁰. Outras explicações para a ampla ocorrência das referidas florações aquáticas incluem: (1) pH elevado e CO₂ diminuído; (2) interação entre a atenuação da luz e estabilidade da coluna de água; (3) tolerância a baixas concentrações de O₂ e baixo potencial redox afetando a disponibilidade de enxofre, ferro e outros metais; e (4) resistência das colônias⁵¹.

De maneira geral, a concentração de microcistina intracelular foi maior que a extracelular (Tabela 2). Isto pode ser explicado pelo fato das cianobactérias liberarem a toxina para o meio apenas quando ocorre a lise das células por senescência, uso de algicidas⁵² ou para se protegerem contra a herbivoria pelo zooplâncton⁵³. Comparando-se os pontos 1, 2 e 3, na estação seca, verificou-se uma nítida elevação da microcistina intracelular. Destes, o ponto 2 foi o que apresentou maior concentração de microcistina extracelular. Isto pode ser explicado, pois, na estação seca, há uma maior probabilidade de aparecimento de cianobactérias, uma vez que, na Região Nordeste, os mananciais em geral ficam com volume de água reduzido aumentando assim o acúmulo de nutrientes, favorecendo o aparecimento de florações e consequentemente a presença de cepas tóxicas.

Além disso, a estação seca caracteriza-se por baixo índice pluviométrico e consequente fluxo lento das águas do rio, o que garante e permite vários ciclos celulares de duplicação (~ 6 horas) para as células de cianobactérias⁵⁴.

De acordo com BRASIL (2003), pode ocorrer uma variação temporal na toxicidade das florações de cianobactérias, desde intervalos curtos de tempo até diferenças sazonais e espaciais. Essa variação provavelmente ocorre devido à alteração na proporção

de cepas tóxicas e não tóxicas na população; todavia, essas variações ainda não foram devidamente esclarecidas⁵⁵.

Na estação chuvosa, os pontos 2 ao 5 apresentaram uma queda significativa na concentração de microcistina intracelular, enquanto que a concentração da microcistina extracelular não sofreu alterações significativas.

O ponto 1, apesar de situar-se numa represa caracterizada por mínimos sinais de eutrofização, apresentou uma quantidade relativamente alta de microcistina intracelular e extracelular. Estes dados corroboram com estudos feitos por Piccin-Santos et al. (2012) em quatro reservatórios brasileiros, que mostraram que reservatórios com baixa densidade de células de cianobactérias (2×10^4 a 10×10^4 cel·1.mL) apresentaram alta concentração de microcistina ($223.67 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)⁵⁶. Tais evidências nos levam a considerar que, apesar de determinado corpo d'água não conter um número significativo de células de cianobactérias e não ser constatada a presença de uma floração, as toxinas podem estar presentes em concentrações elevadas na água. Estudos comprovam que o crescimento exponencial das cianobactérias não pode ser sustentado por um longo período, porque a partir de certo ponto os nutrientes começam a ficar escassos e insuficientes para suportar grandes populações, ocorrendo, então, uma limitação no crescimento populacional⁵¹. Dessa forma, devido à escassez de nutrientes, as células que estão produzindo cianotoxinas podem sofrer lise da sua parede celular, liberando toxinas e extinguindo-se. Disso deriva uma baixa na densidade celular, enquanto as toxinas podem continuar presentes na água por vários dias. Não é possível, dessa forma, se estabelecer uma relação entre densidades celulares e níveis de concentração de cianotoxinas.

Confrontando os resultados obtidos com a análise das áreas dos picos cromatográficos da microcistina extracelular e intracelular, observou-se uma significativa redução da primeira, dado este que condiz com a característica endógena da microcistina (Tabela 3). Além disso, deve-se salientar que o percentual de lise das cianobactérias produtoras de microcistina provavelmente é baixo e parece não estar associado com o nível de eutrofização do manancial, visto que a liberação da toxina não se altera de acordo com a acentuação desta.

Tabela 2. Distribuição média da toxina microcistina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) nos diferentes pontos de coleta.

	Estação Seca (Novembro-Abril)					Estação Chuvosa (Maio-Outubro)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Microcistina Intracelular	101,56	262,43	422,07	305,64	436,42	163,88	95,28	88,34	92,53	73,20
Microcistina Extracelular	47,05	52,37	43,32	38,69	42,90	23,33	53,22	40,32	42,93	47,10

Tabela 3. Área dos picos relacionada à concentração média de microcistina ($\text{mAU}\cdot\text{min}$) nos diferentes pontos de coleta.

	Estação Seca (Novembro-Abril)					Estação Chuvosa (Maio-Outubro)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Microcistina Intracelular	423,62	1091,98	1755,27	1271,54	1814,88	682,53	397,51	368,68	386,11	305,80
Microcistina Extracelular	197,14	219,23	181,65	162,41	179,88	98,57	222,77	169,18	180,01	197,34

As cianotoxinas são liberadas para o meio externo por rompimento da parede celular, o que acontece por senescência das células ou sob ação de algicidas⁵². Já os fatores que levam à formação da toxina não são conhecidos. Contudo, há fortes indícios de correlação entre a formação da toxina e a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio¹.

Nesse contexto, alguns fatores que possivelmente estão relacionados à resistência e, por conseguinte, ao baixo índice de morte das cianobactérias incluem: bainha de mucilagem que envolve algumas colônias de cianobactérias produtoras de cianotoxinas, a nítida camada de peptidoglicano que caracteriza sua parede celular, bem como as vesículas de gás que lhe conferem a capacidade de flutuabilidade⁵⁰, além da presença de acinetos e heterócitos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo mostrou a importância da análise de microcistinas na água de abastecimento público e sua relevância como método

complementar à contagem das cianobactérias, fornecendo subsídios às ações preventivas de vigilância à saúde.

O presente estudo indicou a presença das espécies de cianobactérias *Planktothrix agardhii*, *Geitlerinema amphibium* e *Synechocystis aquatilis*, todas produtoras de microcistina. A concentração da microcistina intracelular, ao longo do período estudado, foi maior em relação à extracelular que apresentou quantidades inferiores e não expressou o mesmo padrão de distribuição ao longo dos pontos em questão, provavelmente devido ao baixo percentual de lise das células de cianobactérias não estando associado com o nível de eutrofização.

A grave hepatotoxicidade, a possível promoção neoplásica, bem como os sinais frequentemente inespecíficos da ação nociva das microcistinas e seu efeito bioacumulativo, incentivam a realização de pesquisas que contemplem uma análise mais acurada da concentração dessa toxina no referido rio. Esta ação possibilitaria a detecção, com a devida antecedência, dos efeitos da toxina sobre a população, prevenindo, assim, eventos indesejáveis maiores ou semelhantes àquele expresso pela tragédia da hemodiálise no mesmo município.

REFERÊNCIAS

1. Santos APME, acarense APFRL. Hepatotoxicidade associada à microcistina. *Semina: Ciências Agrárias*. 2008;29(2):417-30. doi:10.5433/1679-0359.2008v29n2p417
2. Machado CJS. Gestão de águas doces. Rio de Janeiro: Interciência; 2004.
3. Kaebernik M, Neilan BA. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006;35(1):1-9. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x
4. Carvalho LR, Sant'Anna CL, Gemelco MCP, Azevedo MTP. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. *Rev Bras Bot*. 2007;30(1):141-8. doi: 10.1590/S0100-84042007000100014
5. Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, Boesch DF, Seitzinger and phosphorus. *Science*. 2009;323(5917):1014-5. doi:10.1126/science.1167755
6. Moura AN et al. Cianobactérias planctônicas em reservatório eutrófico do estado de Pernambuco. In: Moura AN, Araújo EL, Bittencourt-Oliveira MC, Pimentel RMMP, Albuquerque UP (Eds.). *Reservatórios do Nordeste do Brasil: biodiversidade, ecologia e manejo*. Recife: Núcleo de Publicações em Ecologia e Etnobotânica Aplicada; 2010. p.115-43.
7. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. *Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais*. São Paulo: CETESB; 2013.
8. Carneiro TG, Leite F. Cianobactérias e suas toxinas. *Rev Analytica*. 2008;32(32):36-41.
9. Chen H, Burke JM, Prepas EE. Cyanobacterial toxins in fresh waters. In: Nriagu JO, editor. *Encyclopedia Environ Health*. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 860-71.



10. Carmichael WW. The toxins of cyanobacteria. *Sci Am.* 1994;270(1):78-86. doi:10.1038/scientificamerican0194-78
11. Wood AS, Dietrich DR, Cary SC, Hamilton DP. Increasing microcystin cell density enhances microcystin synthesis: a mesocosm study. *Inland Waters.* 2012;2(1):17-22. doi:10.5268/IW-2.1.424
12. Calijuri MC, Alves MAS, Santos ACA. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. São Carlos: RiMa; 2006.
13. Rastogi RP, Sinha RP. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 2009;27(4):521-9. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.009
14. Merel S, Clément M, Thomas O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon.* 2010;55(4):677-91. doi:10.1016/j.toxicon.2009.10.028
15. Sanches SM, Vieira EM, Prado EL, Benetti F, Takayanagui AMM. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. *Eclét Quím.* 2007;32(4):43-8.
16. Azevedo SMFO. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. *Med Online.* 1998 [acesso em 15 jun 2014];1(3). Disponível em: http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm
17. Bittencourt-Oliveira MC, Santos DMS, Moura AN. Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using molecular method. *Braz J Biol.* 2010;70(4):1005-10. doi: 10.1590/S1519-69842010000500012
18. Silva IF, Nóbrega RS, Galvíncio JD. Impacto das mudanças climáticas nas respostas hidrológicas do rio Ipojuca (PE). Parte 2: cenários de aumento de temperatura. *Rev Bras Geogr Fis.* 2009;2(2):19-30.
19. Mariano MOH, Jucá JFT, Cabral JJSP. Proposta da gestão de resíduos sólidos para os municípios da bacia do Ipojuca. In: 28. Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; 2002 [acesso em 15 jun 2014]; Cancún, México. Disponível em: http://www.academia.edu/1312001/Proposta_de_gest%C3%A3o_de_res%C3%ADduos_s%C3%B3lidos_para_os_munic%C3%ADpios_da_bacia_do_Rio_Ipojuca
20. Pouria S, Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet.* 1998;352(9121):21-6. doi:10.1016/S0140-6736(97)12285-1
21. Dórr FA, Pinto E, Soares RM, Azevedo SMFO. Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence toxicity and toxicological assays. *Toxicon.* 2010;56(7):1427-56. doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.018
22. Ministério da Saúde (BR). Portaria n° 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 25 mar 2004.
23. Ministério da Saúde (BR). Portaria n° 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial União.* 14 dez 2011;Seção 1:39.
24. Utermöhl H. Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Limnol.* 1957;9:263-72.
25. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. Fitoplâncton de água doce. Métodos qualitativo e quantitativo. São Paulo: Normas Técnicas CETESB; 2005.
26. Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 2. Teil/Part 2: Oscillatoriales. München: Elsevier; 2005. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, 19).
27. Komárek J, Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 4: Nostocales. *Arch Hydrobiol.* 1989;(56 suppl.):247-345.
28. Ministério da Saúde (BR). Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. 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 União.* 18 mar. 2005;Seção 1:53.
29. Krishnamurthy T, Carmichael WW, Sarver EW. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Isolation, purification and characterization of peptides of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon.* 1986;24(9):865-73. doi:10.1016/0041-0101(86)90087-5
30. Fastner J, Flieger I, Neumann U. Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison from different solvents and procedures. *Water Res.* 1998;32(10):3177-81. doi:10.1016/S0043-1354(98)00073-6
31. Spool L, Neffling MR, Meriluoto J. Fast separation of microcystins and nodularins on narrow-bore reversed-phase columns coupled to a conventional HPLC system. *Toxicon.* 2010;55(5):954-64. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.015
32. Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst.* 1994;119(7):1525-30. doi: 0.1039/an9941901525
33. Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon; 1999. p. 369-405.
34. Fonseca FS, Ruvieri V, Onaka EM, Santana RL, Scorsafava MA, Sabino M. Influência de fatores climatológicos na ocorrência de microcistina. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010;69(4):461-6.
35. Vasconcelos V, Cerqueira M. Phytoplankton community of river Minho. *Limnetica.* 2001;20(1):135-41.
36. Badylak S, Philips J. Spatial and temporal patterns of phytoplankton composition in a subtropical coastal lagoon, the Indian River Lagoon, Florida, USA. *J Plankton Res.* 2004;26(10):1229-47. doi:10.1093/plankt/fbh114
37. Silva EM, Gomes CTS, Ramos CPS, Bricio SML. Ocorrência de cianobactérias no reservatório de Mundaú, no estado de Pernambuco, no período de janeiro de 2010 a novembro de 2011. *VISA Debate.* 2013;1(3):35-42. doi:10.3395/vd.v1i3.40



38. Moura AN, Bittencourt-Oliveira MC, Dantas EW, Arruda Neto JD. Phytoplanktonic associations: a tool to understanding dominance events in a tropical Brazilian reservoir. *Acta Bot Bras.* 2007;21(3):641-8. doi:10.1590/S0102-33062007000300011
39. Soares MCS, Lurling M, Huszar V. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Phycol Res.* 2013;61(1):61-7. doi:10.1111/pre.12001
40. Costa IAS, Azevedo SMFO, Senna PAC, Bernardo RR, Costa SM, Chellappa NT. Occurrence of toxin-producing Cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz J Biol.* 2006;66(1B):211-9. doi:10.1590/S1519-69842006000200005
41. Moura AN, Dantas EW, Oliveira HSB, Bittencourt-Oliveira MC. Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in northeastern Brazil. *Braz J Biol.* 2011;71(2):451-9. doi:10.1590/S1519-69842011000300015
42. Chellappa NT, Chellappa SL, Chellappa S. Harmful Phytoplankton Blooms and Fish Mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. *Braz Arch Biol Technol.* 2008;51(4):833-41. doi:10.1590/S1516-89132008000400022
43. Dantas EW, Bittencourt-Oliveira MC, Moura AN. Spatial-temporal variation in coiled and straight morphotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju (Cyanobacteria). *Acta Bot Bras.* 2010;24(2):585-91. doi:10.1590/S0102-33062010000200028
44. Lira GAST, Araújo EL, Bittencourt-Oliveira MC, Moura AN. Phytoplankton abundance, dominance and coexistence in an eutrophic reservoir in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *An Acad Bras Ciênc.* 2011;83(4):1313-26. doi:10.1590/S0001-37652011000400018
45. Kuroda EK, Minillo A, Rocha O, Rodrigues-Filho E, Bernardo L. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. *Eng Sanit Ambient.* 2007;12(1):24-31. doi:10.1590/S1413-41522007000100004
46. Muller CC, Raya-Rodriguez MT, Cybis LF. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. *Eng Sanit Ambient.* 2009;14(1):29-38. doi:10.1590/S1413-41522009000100004
47. Brandão LH, Domingos P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. *Saúde Amb Rev.* 2006;1(2):40-50.
48. Tonietto A. Investigação proteômica comparativa entre a cepa tóxica *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e a cepa não tóxica *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 43 (Cyanobacteria) [dissertação]. Brasília, DF: Universidade Católica de Brasília; 2009.
49. Almeida VPS, Cogo K, Tsai SM, Moon DH. Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast - Brazil. *Braz J Microbiol.* 2006;37(2):192-8. doi:10.1590/S1517-83822006000200017
50. Kamogae M, Hashimoto APM, Francabandiera AI, Pádua CG, Bracarense APFRL, Bittencourt-Oliveira MC et al. Imunohistoquímica: detecção de microcistina em tilápia exposta ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). *Semina: Ciênc Agrár.* 2007;28(3):427-36. doi:10.5433/1679-0359.2007v28n3p427
51. Huishman J, Matthijs HCP, Visser PM. Harmful cyanobacteria. Dordrecht: Springer Netherlands; 2005. (Aquatic ecology series, vol. 3).
52. Takenaka RA. Avaliação da toxicidade de *Microcystis aeruginosa* e de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê, SP [tese]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos; 2007.
53. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol.* 1992;72(6):445-59. doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x
54. Yunes JS. Florações de *Microcystis* na Lagoa dos Patos e o seu estuário: 20 anos de estudos. *Oecol Bras.* 2009;13(2):313-8.
55. Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília: ASCOM; 2003.
56. Piccin-Santos V, Bittencourt-Oliveira MC. Toxic cyanobacteria in four Brazilian water supply reservoirs. *J Environ Prot (Irvine Calif).* 2012;3(1):68-73. doi:10.4236/jep.2012.31009



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.