

Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG.

Ludmila von Rondow A. B. Pandolpho

Mestranda em Engenharia Ambiental – Universidade
Federal de Ouro Preto

E-mail: ludmila@vonrandow.com

Andrea Grabe Guimarães

Farmacêutica, UFMG; Doutora em Farmacologia
Cardiovascular, FIOCRUZ; Docente de disciplinas da área de
farmacologia UFOP.

E-mail: grabe@ef.ufop.br

Rosângela Barbosa de Deus

Farmacêutica, UFMG; Doutora em Microbiologia e
Imunologia, UFMG. Docente das disciplinas Toxicologia e
Toxicologia Ocupacional.

E-mail: rbdeus@ef.ufop.br

Antônio Galvão do Nascimento

Biólogo, UFV; Doutor em Microbiologia Agrícola, UFV;

Docente de disciplinas da área de microbiologia UFV.

E-mail: agnascimento@ufv.br

Vera Lúcia de Miranda Guarda

Farmacêutica, UFOP; Doutora em Ciências Farmacêuticas, Université de Grenoble I (Scientifique Et Medicale - Joseph Fourier). Docente do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Coordenadora do NuCát - Núcleo da Cátedra UNESCO- água, mulheres e desenvolvimento estabelecido pela Resolução CEPE- UFOP – 7.420.

E-mail: vera.guarda@gmail.com – nicole@ef.ufop.br

Resumo

Uma das consequências da utilização dos recursos hídricos em atividades desenvolvidas pelo homem é a crescente eutrofização dos ambientes PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

aquáticos, causando o enriquecimento desses ecossistemas. Estudos toxicológicos do fitoplâncton atestam a qualidade e possibilitam o monitoramento das águas principalmente, aquelas ligadas diretamente à saúde humana. O enriquecimento da água dos pesque-pagues com nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, favorecem a floração de cianobactérias. Estas florações podem acarretar alterações na qualidade da água, devido liberação de cianotoxinas e de outros compostos que modificam suas características organolépticas, além do aumento da matéria orgânica. Nesse trabalho, foi feito o monitoramento da presença de cianobactérias em pesque-pagues de seis municípios da região dos Inconfidentes, Minas Gerais, Brasil, com a finalidade de avaliar a toxicidade potencial dos gêneros de cianobactérias encontrados. No período de março de 2008 a janeiro de 2009, foram coletadas 88 amostras e os gêneros de cianobactérias foram identificados segundo a chave de Bicudo & Menezes (2005). Além de Chlorophytas, cinco gêneros de cianobactérias foram encontrados nos tanques, Phormidium sp, Geithlerinema sp., Anabaena sp., Nostoc sp., Microcystis aeruginosa, todos com potencial para produção de cianotoxinas. Os parâmetros físico-químicos pH, temperatura e condutividade foram determinados in loci, e seus resultados mostraram-se favoráveis à presença de algas, principalmente as clorofíceas. Os ensaios de toxicidade aguda e crônica foram realizados administrando os extratos brutos de Microcystis e Phormidium, em camundongos, pela via oral. Estes ensaios mostraram que a Microcystis obtida nos tanques de pesque-pagues produziu cianotoxinas. Quanto ao gênero Phormidium ou não houve produção de toxinas ou a dose utilizada no ensaio foi pequena para obtenção da resposta toxicológica, pois os sintomas de intoxicação observados não foram intensos.

Palavras-chaves: Pesque-pague; cianobactérias; toxicidade; Microcystis; Phormidium

Abstract

One of the consequences of the use of water resources in activities developed by man has been the increasing eutrophication of aquatic environments, causing the artificial enrichment of these ecosystems. Toxicological studies of phytoplankton attest to the quality and enable the monitoring of waters mainly those linked directly to human health. The enrichment of water from fish-pay establishments with nutrients, primarily nitrogen and phosphorus favor the blooming of cyanobacteria. These blooms can cause changes in the water quality due to the liberation into the body of water cyanotoxins and other compounds which modify its organoleptic characteristics, in addition to the increase in organic matter. This work was done to monitor the presence of cyanobacteria in fish-pay establishments of six municipalities in the region of the Inconfidentes, Minas Gerais, Brazil, in order to evaluate the potential toxicity of cyanobacteria found. From march 2008 to january 2009, 88 samples were collected and cyanobacteria were identified according to the key Bicudo & Menezes (2005). Besides Chlorophytas, five genres of cyanobacteria were found in the tanks, *Phormidium sp*, *sp Geithlerinema*., *Anabaena sp.*, *Nostoc sp.*, *Microcystis aeruginosa*, all with the potential to produce cyanotoxins. The physic-chemistry parameters pH, temperature and conductivity were determined *in loci* and the results shows the conditions were favorable to the presence of algae, mainly chlorophytes. The acute and chronic toxicity tests were performed administered through oral of crude extracts of *Microcystis* and *Phormidium* orally. These tests showed that *Microcystis* obtained produced cyanotoxins. As the cyanobacteria of the genera *Phormidium* no toxin production or the dose used in the trial was small for obtaining toxicological response, because the symptoms of intoxication were not observed intense.

Keywords: fish-pay establishments; cyanobacterial; toxicity; *Microcystis*, *Phormidium*

Introdução

As cianobactérias são consideradas microalgas procariontes, possuem pigmentos fotossintéticos, clorofila-a, e ficocianina, responsável pela coloração azulada, sendo, conhecidas como algas azuis (WHITTON e POTTS, 2000). Estes organismos são importantes componentes do fitoplâncton de águas continentais com ampla distribuição geográfica habitando diferentes ecossistemas, como lagos de regiões tropicais e temperadas, rios e estuários (OLIVER e GANF, 2000). É o grupo mais encontrado quando ocorrem florações em ambientes eutrofizados (BOUVY *et al.*, 1999, CALIJURI *et al.*, 2006). Além destes, as cianobactérias também

podem estar presentes nas lagoas de estabilização (VASCONCELOS e PEREIRA, 2001). Estas lagoas correspondem a ambientes eutróficos artificiais, pois são tanques construídos pelo homem, com a finalidade do tratamento biológico dos esgotos provenientes de áreas urbanas e estabelecimentos comerciais e domésticos, para o seu posterior lançamento no corpo aquático receptor (KELLNER e PIRES, 1998). Os fatores primários que determinam a dominância das cianobactérias são a temperatura da água, o regime de luz subaquático e a zona de mistura da coluna de água (DOKULIL e TEUBNER, 2000). Estes organismos são utilizados como excelentes bioindicadores da qualidade das águas (SANT'ANNA *et al.*, 2006).

O conhecimento das algas e cianobactérias, como potenciais bioindicadores da qualidade da água é extremamente interessante devido à rápida resposta das mesmas às mudanças ambientais (MARGALEF, 1983). WETZEL (1993) destacou que a composição qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica e suas variações espaciais e temporais refletem as interações entre os componentes e também o efeito das variáveis ambientais sobre a mesma, sendo influenciada, principalmente, pela concentração de nutrientes inorgânicos, penetração de luz, temperatura, pH e condutividade elétrica da água.

Alguns gêneros de cianobactérias formadores de florações possuem a capacidade de produzir toxinas e por isso constituem um grupo diferenciado dentro da comunidade fitoplanctônica (AZEVEDO, 1998; CALIJURI *et al.*, 2006; SANT'ANNA *et al.*, 2006). Sendo assim, a ocorrência destes organismos em reservatórios é de preocupação constante para a saúde pública e para pesquisadores e estudiosos mundiais (AZEVEDO, 1998; LELKÓVA *et al.*, 2008).

As cianotoxinas são toxinas produzidas por algumas espécies de cianobactérias em corpos d'água doce ou salgada, e são classificadas como hepatotoxinas (microcistina e nodularina), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-as, homoanatoxina-a e saxitoxina), citotoxinas (cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lingbiatoxina) e outras ainda podem ser irritantes ao contato, consideradas como endotoxinas pirogênicas, como aquelas das bactérias Gram negativas. As altas concentrações de cianotoxinas afetam primeiramente as comunidades aquáticas e, posteriormente, as demais comunidades que se alimentam de indivíduos aquáticos contaminados. As florações de cianobactérias tóxicas podem provocar a mortandade de peixes e outros animais, incluindo o homem, que consome a água ou organismos contaminados (MINISTERIO DA SAÚDE, 2003; FERRÃO-FILHO, 2009).

Diversas cianotoxinas têm importância para a saúde pública. Estas toxinas, quando presentes na água utilizada para abastecimento doméstico, para a pesca ou lazer (pesque-pagues), podem atingir as populações humanas e provocar efeitos adversos, como gastroenterite, hepato-enterite e outras doenças do fígado, rins, câncer, irritações na pele, alergias, PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda.

Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

conjuntivite, problemas com a visão, fraqueza muscular, problemas respiratórios, asfixia, convulsões e morte, dependendo do tipo da toxina, da concentração e da via de contato (MINISTERIO DA SAÚDE, 2003; FERRÃO-FILHO, 2009).

O número de estudos sobre a eficiente remoção dessas cianotoxinas pelos processos de tratamento da água ainda é reduzido. As técnicas de detecção de cianotoxinas ainda não são muito difundidas na prática do monitoramento de águas de abastecimento e para recreação. Assim, a avaliação da exposição humana as cianotoxinas pelo consumo da água ainda é bastante deficiente. Além disso, em regiões abastecidas por mananciais de superfície que apresentam florações de cianobactérias tóxicas, a real exposição a essas toxinas irá depender do método de captação, da sequência do tratamento da água e do controle operacional do sistema de abastecimento (MINISTERIO DA SAÚDE, 2003).

Assumindo-se que a qualidade da água é um fator limitante para o desenvolvimento social e econômico do país, verifica-se que várias lacunas precisam ser preenchidas para que se possa garantir, de forma segura e confiável, a qualidade da água em mananciais e em sistemas de abastecimento público (LORENZI, 2004).

O pesque-pague é um local onde se pratica pesca esportiva ou por *hobby*. São lagos artificiais ou naturais, onde os alevinos são criados com ração para que seu desenvolvimento seja rápido e o ganho de peso dos animais seja em curto tempo. Devido ao acúmulo da ração que é utilizada para alimentação dos peixes nos tanques, há um aumento na concentração de nutrientes disponibilizados na água, fazendo com que as cianobactérias presentes no corpo d' água se proliferem, causando danos ao restante da cadeia alimentar.

O foco deste estudo foi a Região dos Inconfidentes – MG, em especial as cidades de Ouro Preto, Mariana, Itabirito, Ponte Nova, Tiradentes e São Brás do Suaçuí, devido ao alto número de pesque-pagues que surgiram em pouco tempo e à enorme concentração de corpos d'água eutrofizados nesta região. Dessa forma, buscou-se avaliar a qualidade das águas de tanques de pesque-pagues por meio do monitoramento das cianobactérias, devido à potencialidade das mesmas produzirem toxinas.

Estudos toxicológicos experimentais são ferramentas importantes na avaliação dos riscos dessas toxinas para a população humana. No entanto, a grande maioria das informações sobre cianotoxinas ainda é obtida em estudos de intoxicação aguda, mas a intoxicação crônica certamente é mais frequente, representando sérios riscos à população e deve merecer, assim, uma maior atenção das pesquisas científicas neste campo (SOARES, 2009).

Material e Métodos

Área do Estudo

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

Os pesque-pagues foram escolhidos aleatoriamente, por meio de sorteio. Após a autorização dos proprietários, as coletas foram realizadas, nos municípios de Ponte Nova, Mariana, Ouro Preto, Itabirito, São Brás do Suaçuí e dois pontos de coleta em Tiradentes, como ilustra a Figura 1.



Figura 1. A) Mapa de Minas Gerais, com cidades, rios e áreas de preservação ambiental; B) Mapa de Minas Gerais, com algumas cidades quem compõem a área em estudo.
Fonte: www.mapsgoogle.com.br

Coletas e Fixação das Amostras

As coletas foram feitas utilizando-se rede de plâncton (20µm de abertura de malha) ou simplesmente pela passagem do frasco aberto na lâmina d'água. A rede foi passada várias vezes sobre a superfície, com o arraste horizontal de aproximadamente três metros da região mediana para a marginal dos tanques.

No total, 88 amostras foram coletadas, abrangendo os períodos de chuva e de seca, no período de março de 2008 a janeiro de 2009, sendo estas realizadas mensalmente em todos os pontos.

Dentre as amostras coletadas algumas foram fixadas in situ com solução de Transeau, solução de FAA (Formalina, álcool etílico, ácido acético glacial), e Lugol, todas na proporção de 1:1, e armazenadas em frascos de vidro padronizados tipo penicilina, com 2mL cada, envolvidos com papel laminado.

Outras amostras foram acondicionadas em frascos de vidro de 500mL, sem a adição de soluções de fixação, para posterior observação de material vivo e de seu isolamento.

Identificação e Sistema de Classificação

Cinco lâminas por amostra foram observadas, em microscópio óptico, e as cianobactérias foram identificadas utilizando-se das chaves de identificação “Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições” de acordo com BICUDO e MENEZES (2005).

Para destacar a presença da bainha mucilaginosa ou mucilagem foram preparadas lâminas com corante Nanquim.

O sistema adotado para a classificação no nível de Classe foi o de HOEK et al., (1995). Para as Ordens dentro da Classe foi adotado o sistema de SANT’ANNA e AZEVEDO (2004, 2006).

Isolamento dos Gêneros

As cianobactérias identificadas em cada uma das amostras foram isoladas utilizando meio de cultivo ASM-1 (AGUIAR; AZEVEDO 1992), BG-11 (ALLEN, 1968) com nitrogênio e BG-11 sem nitrogênio líquido ou agregado ao Ágar-ágar.

Outra técnica de isolamento utilizada foi a micro-pipetagem sucessiva, onde ocorreu a captura de filamentos das cianobactérias isoladamente ou de colônias, evitando que outras microalgas cresçam no meio de cultivo, e prevaleçam sobre as cianobactérias.

O indivíduo isolado era transferido para placas de Petri ou Erlenmeyer de 250mL, contendo meio de cultivo para obter biomassa suficiente para a obtenção dos extratos utilizados nos ensaios *in vivo*.

Obtenção do Extrato para os Ensaios *In Vivo*

As culturas de cianobactérias isoladas foram semeadas em meio de cultivo com temperatura controlada em 19°C e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sendo mantidas durante 45 dias, com a finalidade de obter grandes quantidades de biomassa e desta forma, obter quantidades suficientes de cianotoxinas para a realização dos ensaios biológicos.

As culturas foram centrifugadas a 20.000 rpm a 19°C, por 30min. Após a primeira centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em água destilada estéril, homogeneizado em agitador tipo vortex e, novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Após várias etapas de lavagem e centrifugação, o sedimento mantido em banho de gelo foi rompido por sonicação.

Para a lise das células de *Phormidium*, foi necessária a introdução de pérolas de vidro no tubo contendo o sedimento da cultura.

Os extratos obtidos foram mantidos em tubos esterilizados e armazenados em freezer em temperatura abaixo de 0°C, até sua utilização.

Avaliação da Toxicidade Geral *In Vivo*

Os experimentos abaixo descritos foram realizados segundo os critérios institucionais e nacionais de ética que normalizam e protegem a utilização de animais de laboratórios em estudos com finalidades científicas e estão em acordo com o Comitê de Ética da UFOP.

A administração oral dos extratos brutos de cianobactérias foi realizada nos camundongos em diferentes concentrações (0, 5, 10, 50 e 100mg/kg de peso corpóreo). O monitoramento dos indivíduos foi feito por um período de doze horas, com observação a cada hora, a fim de observar os primeiros sintomas de intoxicação. Decorridas às doze horas iniciais, o monitoramento passou a ser realizado a cada doze horas.

Foram utilizados camundongos machos pesando entre 26,5 a 29g provenientes do biotério central da UFOP, mantidos em ciclo claro/escuro e estes receberam ração e água ad libitum. Para a avaliação das toxicidades aguda e crônica foram utilizados, 100 animais divididos em 10 grupos. Nos ensaios de toxicidade aguda os animais receberam única administração por via oral das doses de extrato nas concentrações de (5, 10, 50, ou 100mg/kg) e de água destilada para os animais controle. Na avaliação da toxicidade crônica, outro grupo de 100 animais recebeu por via oral, por 72 horas, doses de extrato nas concentrações de (5, 10, 50, ou 100mg/kg) e de água destilada para os animais controle, sendo as doses administradas a cada hora por quatro horas a cada dia.

Após a administração do extrato, os camundongos foram observados por 72 horas para verificação da ocorrência de sinais indicativos de toxicidade geral in vivo, como vômitos, baixa atividade física, aumento da ingestão de água, convulsão e em alguns casos óbito. Nas primeiras 12 horas, as observações foram documentadas em intervalos de uma hora, e após esse período em intervalos de 12 horas.

Resultados e Discussão

Os pesque-pagues sorteados, suas respectivas localizações e os principais fitoplânctons encontrados, de acordo com a chave de identificação de BICUDO e MENEZES (2005) estão apresentados na Tabela I.

Tabela 1. Pesque-pagues sorteados, suas respectivas localizações e os principais fitoplânctons encontrados, Região dos Inconfidentes – MG

Pesque-pague	Cidade	Fitoplâncton
1	Ponte Nova	<i>Phormidium sp.</i>
2	Mariana	<i>Geithlerinema sp.</i>
3	Ouro Preto	<i>Chlorophytas</i>
4	Ouro Preto	<i>Chlorophytas</i>
5	Tiradentes	<i>Anabaena sp.</i>
6	Tiradentes	<i>Nostoc sp.</i>
7	São Brás do Suaçuí	<i>Chlorophytas</i>
8	Itabirito	<i>Microcystis aeruginosa</i>

Cinco gêneros de cianobactérias foram encontrados nos tanques, dentre os quais quatro são produtores de toxinas constantemente e, apenas um é potencialmente tóxico (*Phormidium sp.*).

No tanque do pesque-pague em Mariana ocorreu morte súbita dos peixes e o proprietário o desativou. Em Itabirito, o proprietário se desfez do tanque. Assim, não foi possível dar continuidade ao estudo nestas cidades.

Os parâmetros físico-químicos analisados são compatíveis com as condições de sobrevivência e reprodução das cianobactérias, uma vez que estas condições são semelhantes às observadas no cultivo em laboratório. Também, é possível observar que não há grandes variações de temperatura e que a ausência de cianobactérias em determinados tanques é independente de fatores físico-químicos: temperatura, pH ou condutividade elétrica, conforme demonstram os resultados apresentados na Tabela II.

Cinco gêneros de cianobactérias foram encontrados nos tanques, dentre os quais quatro são produtores de toxinas constantemente e, apenas um é potencialmente tóxico (*Phormidium sp.*).

No tanque do pesque-pague em Mariana ocorreu morte súbita dos peixes e o proprietário o desativou. Em Itabirito, o proprietário se desfez do tanque. Assim, não foi possível dar continuidade ao estudo nestas cidades.

Os parâmetros físico-químicos analisados são compatíveis com as condições de sobrevivência e reprodução das cianobactérias, uma vez que estas condições são semelhantes às observadas no cultivo em laboratório. Também, é possível observar que não há grandes variações de temperatura e que a ausência de cianobactérias em determinados tanques é independente de fatores físico-químicos: temperatura, pH ou condutividade elétrica, conforme demonstram os resultados apresentados na Tabela II.

Tabela II. Valores médios dos resultados dos parâmetros físico-químicos dos tanques de pesque-pagues da Região dos Inconfidentes – MG

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

Tanques (Localidade)	Condutividade Elétrica (μE)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH
Ponte Nova	21,4	21,9	6,9
Mariana	58,5	23,5	6,9
Ouro Preto	5,0	18,0	7,0
Ouro Preto	4,5	20,0	7,5
Tiradentes	10,0	24,4	7,0
Tiradentes	12,4	22,3	6,9
São Brás do Suaçuí	60,2	19,0	7,3
Itabirito	1,3	19,3	6,8

Nos tanques avaliados não foi detectada a presença de macrófitas ou qualquer tipo de planta aquática, que tenha sido possível sua visualização, porém em algumas coletas, a presença de florações de cianobactérias foi observada. O material coletado representava apenas o fitoplâncton, o que leva a inferir um grande grau de eutrofização, devido ao aumento do número de indivíduos de algumas espécies de microalgas, pois o alto teor de poluentes na água favorece a sua proliferação.

Culturas Utilizadas no Ensaio Toxicológico

As culturas de cianobactérias utilizadas nos ensaios toxicológicos foram de *Microcystis* e *Phormidium*. O difícil manuseio para isolamento e a competição com microalgas eucarióticas fez com que as cianobactérias *Nostoc*, *Geithlerinema* e a *Anabaena* se perdessem durante o processo de isolamento, devido à alta densidade de clorofíceas presentes nas amostras.

Avaliação da Toxicidade Geral In Vivo dos extratos de microcystis e phormidium

Para as doses de 5 e 10mg/kg de peso corporal, do extrato de *Microcystis* sp, nenhum indivíduo apresentou sintomas que indicasse intoxicação. Para a dose de 50mg/kg, no período de 0 a 12 horas após a administração oral do extrato, 6 animais apresentaram vômitos, sem alteração da locomoção, mantendo comportamento normal comparado ao período antes da administração do extrato. Após 12 horas, nenhum sinal ou sintoma foi observado.

Na concentração de 100mg/kg, no período de 0 a 12 horas, cinco animais apresentaram vômitos e redução da locomoção, estes sinais se

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

intensificaram no período de 12 a 36 horas após a administração do extrato, prevalecendo os vômitos no período de 24 a 36 horas. Tais sintomas são característicos da intoxicação alimentar devido às alterações no trato gastrointestinal e o próprio organismo tende a reverter o processo de intoxicação.

A sintomatologia discreta de intoxicação pode ser devida à baixa concentração utilizada ou que efeitos mais intensos e/ou letalidade nos indivíduos apresentem-se com o acúmulo de doses.

Nas doses de 5, 10 e 50mg/kg de peso corpóreo, do extrato de *Phormidium*, não foram observados nenhum tipo de estereotipia ou sintoma que indicasse a intoxicação. Por outro lado, com a dose de 100mg/kg de peso corpóreo 4 indivíduos apresentaram redução da atividade física e vômitos no período de 0 a 5 horas, prevalecendo os vômitos no período de 3 a 5 horas após a administração do extrato. Após o período de 5 horas observou-se que esses, ao ingerirem água ao longo de algum tempo se restabeleceram e voltaram a ter comportamento normal comparado ao período anterior a administração do extrato (AZEVEDO, 1998; LEAL e SOARES, 2004).

Após a administração de múltiplas doses dos extratos de *Phormidium* e *Microcystis*, também foram observadas redução da locomoção e vômitos, nas primeiras 24 horas, embora outros sinais de intoxicação como diarreia, prostração, hemorragias fossem esperados, pois estes sintomas encontram-se descritos na literatura para animais domésticos e seres humanos, (CARMICHAEL e SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989; LEAL e SOARES, 2004). O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é causado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, causando a morte entre poucas horas e poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. Os sinais observados após ingestão dessas hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia (CARMICHAEL e SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989).

Com a continuidade da administração dos extratos, os sinais se intensificaram, reduzindo ainda mais a locomoção espontânea e aumentando os vômitos, culminando com o óbito quase imediato de dois animais após a 8ª dose do extrato de *Microcystis*.

No período de 48 a 72 horas, quando novas doses do extrato de *Microcystis* foram administradas outros 4 animais vieram a óbito após a 10ª dose sucessiva, apresentando desta forma 60% de letalidade para este extrato quando administrado por via oral, após dose média de 900mg/kg.

Os animais que receberam extrato de *Phormidium* apresentaram os mesmos sintomas observados para dose única, porém de maneira mais intensa, sem, no entanto levar ao óbito. Os resultados sugerem que *Phormidium* não produziu toxina ou a dose utilizada no ensaio foi pequena para tal resposta toxicológica, pois os sintomas de intoxicação não foram intensos e tampouco ocorreu a morte de camundongos.

Cálculo da DL₅₀

Para o extrato de *Phormidium*, não foi possível realizar o cálculo a dose de letalidade, pois não houve morte de indivíduos, mesmo sendo submetidos a doses diárias de extrato bruto apenas se observou sintomas de intoxicação alimentar: vômitos, baixa atividade física e inchaço abdominal.

No extrato de *Microcystis*, observou-se a morte de dois camundongos após a 8ª dose de extrato bruto e quatro mortes após a 10ª dose de extrato, podendo, assim, sugerir que uma dose de letalidade (DL₅₀) foi atingida com a média de 9 doses de concentração de 100mg/Kg de peso corpóreo cada.

Também se verificou que os indivíduos que receberam o extrato bruto de *Microcystis* tiveram uma taxa de letalidade de 60% dos indivíduos com dose acumulada de 900mg/Kg de peso corpóreo (9 doses de 100mg/Kg de peso corpóreo) para cada camundongo.

Conclusões

A ocorrência de cianobactérias produtoras de cianotoxinas nos pesque-pagues da Região dos Inconfidentes foi evidenciada. Os parâmetros físico-químicos mensurados favorecem a sua proliferação.

Analisando os resultados obtidos pode-se concluir que *Microcystis* sp obtida dos tanques de pesque-pague produziu toxina após ser isolada e mantida em laboratório sob condições controladas, pois durante os ensaios de intoxicação aguda foi constatado que os organismos tendem a reverter às condições da intoxicação e dessa forma metabolizar a toxina supondo assim que a toxina presente no extrato seja hepatotóxica.

Os ensaios *in vivo* mostraram que o gênero *Microcystis* pode induzir à intoxicação relevante, enquanto o extrato de *Phormidium* induz a sinais menos intensos de intoxicação, mesmo nas maiores doses avaliadas. Pelas características dos sintomas apresentados, pode-se inferir que a toxina presente no extrato é do tipo hepatotóxica.

Agradecimentos: Este estudo contou com apoio da FAPEMIG

Referências

AGUIAR, D.G.; AZEVEDO, S.M.F.O. 1991. Pp. 6. Produção de toxina por *Myrocistis aeruginosa* em diferentes fases de cultivo e concentrações de nitrogênio. In: CETESB (1992) Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. *Relatório Técnico*, Rio de Janeiro, 6p.

ALLEN, M.B. Simple conditions of growth of unicellular bluegreen algae on plates. *Journal Phicology*, 4:1-4., 1968.

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. *Medicina on line*, 3:1-19. 1998.
http://medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm. Acesso em 25/03/2011.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A.; VALENTINE, W.M. Algae intoxication in livestock and water fowl. **Clinical Toxicology – The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, 5:345-361., 1989.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. (Org). *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. Segunda Edição. Editora Rima. São Carlos, SP, 502 p. 2005.

BOUVY, M.; MOLICA, R.J.R.; DE OLIVEIRA, S.; MARINHO, M.; BEKER, B. Dynamic of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology** 20: 285-297 - 1999.

CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. *Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais*. Editora Rima. São Carlos-SP, 118p., 2006.

CARMICHAEL, W.W.; SCHWARTZ, L.D. Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. *Farmers Bulletin*, Washington, DC: US Dept. of Agriculture. 2275:12p., 1984.

DOKULIL, M.T.; TEUBNER, K.. Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiologia**. 438: 1-12, 2000.

FERRÃO-FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos - **Oecologia Brasiliensis**. 13(2): 272-312, 2009.
doi:10.4257/oeco.2009.1303.04

HOEK, C., MANN, D.G.; JAHNS, H.M. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 627p. 1995.

KELLNER, E.; PIRES, E.C. Lagoas de estabilização: projeto e operação. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária**. 242p.. 1998.

KOMÁREK, J.; KLING, H.; KOMÁRKOVÁ, J. Filamentous Cyanobacteria. Pp.117-196. *In*: J.D. Wehr & R.G. Sheath (Eds.). *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Academic Press. San Diego, CA, 950p., 2003.

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

LEAL A.C.; SOARES M.C.P. Hepatotoxicidade da Cianotoxina Microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 37:84-89, 2004. doi.org/10.1590/S0037-86822006000400007

LELKÓVA, E.; RULÍK, M.; HEKERA, P.; DOBIÁŠ, P.; DOLEJŠ, P.; BOROVIČKOVÁ, P.; POULÍČKOVÁ, A. The influence of the coagulant PAX-18 on Planktothrix agardhii bloom in a shallow eutrophic fishpond. *Fottea* 8(2): 147-154., 2008.

LORENZI, A.S. Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil. – *Dissertação de mestrado* – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, 92p., 2004. <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/.../AdrianaSL.pdf>. Acesso em 30/04/2012.

MARGALEF, R. *Limnologia*. Ediciones Omega. Barcelona, 1010p., 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano. Impactos na Saúde Pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Ascom. Brasília, DF. 56p., 2003. <<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/cianobacterias.pdf>>. Acesso em 25/03/2011.

OLIVER, R.L., & GANF, G.G. Freshwater blooms. Pp 149-194. *In*: Whitton, B.A.; Potts, M., (eds). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands, 669p., 2000.

SANT'ANNA, C.L. & AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71: 359-385., 2000.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SENNA, P.A.; KOMARÈK, J; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasileira de Botânica**. 27:213-227, 2004. doi.org/10.1590/S0100-84042004000200002

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO M.T.P.; AGUJARO L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA R.C.R. *Manual Ilustrado Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras*. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 58p. 2006.

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.

SOARES, R.M. Toxicologia de Cianotoxinas: microcistinas as estrelas do tema. **Oecologia Brasiliensis** 13-2009.

doi:10.4257/oeco.2009.1303.04

VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a Wastewater Treatment Plant (Portugal). **Water Research** 35:1354-1357, 2001.

WETZEL, R.G. *Limnologia*. Editora Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 919p., 1993.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. (eds). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands, 669 p. 2000.

PANDOLPHO, Ludmila von Rondow A. B; GUIMARÃES, Andrea Grabe; DEUS, Rosângela Barbosa de; NASCIMENTO, Antônio Galvão do; GUARDA, Vera Lúcia de Miranda. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 6, n. 1, p. 29-44, fev. 2013.