



Instituto de Ciências Biológicas  
Fundação Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Avaliação de bioacumulação de microcistina-LR em  
tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exploradas  
comercialmente no lago Paranoá (Brasília-DF).**

**Janaína Emanuelle Mendes de Oliveira Starling**

Brasília  
2010



Instituto de Ciências Biológicas  
Fundação Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Avaliação de bioacumulação de microcistina-LR em  
tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exploradas  
comercialmente no lago Paranoá (Brasília-DF).**

Janaína Emanuelle Mendes de Oliveira Starling

**Dissertação submetida ao programa  
de pós-graduação em Biologia  
Animal da Universidade de Brasília  
como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do grau  
de mestre em biologia animal.**

Orientador: Osmino Rodrigues Pires Júnior

**Brasília  
Março de 2010**



Instituto de Ciências Biológicas  
Fundação Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



## Dissertação de Mestrado

Janaína Emanuelle Mendes de Oliveira Starling

Título:

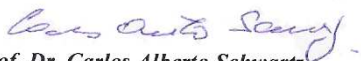
**“Avaliação de bioacumulação de microcistina-LR em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exploradas comercialmente no lago Paranoá (Brasília-DF).”**

Comissão Examinadora:

  
*Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior*  
Presidente / Orientador  
UnB

  
*Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia*  
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa  
UnB/ GEM

  
*Prof. Dr. Octávio Luiz Franco*  
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa  
UCB

  
*Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz*  
Membro Suplente  
Interno Vinculado ao Programa  
UnB- CFS

Brasília, 30 de Março de 2010.

**À minha família de onde recebi o maior suporte e ao meu avô-pai, Claudek (*in memorian*) que sempre está por perto com sua energia positiva.**

## **Agradecimentos**

À Universidade de Brasília e ao Programa de pós-graduação em biologia animal por proporcionar condições para a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Junior pelo convite e pela orientação nesse trabalho.

Ao meu marido Fernando Starling por toda motivação, paciência e ajuda.

À minha família, em especial a minha mãe e irmãos (Soraya, Diogo e San Thor) que sempre estiveram ao meu lado.

Aos amigos do laboratório de toxinologia da UnB, Natiela B. de Oliveira, Thalita S. Camargos, Polliana Campos, Jimmy A. Guerreiro, Solange Rêgo, Rafael Melani e Jéssica Arruda por toda ajuda. E também aos técnicos Washington e Walter César.

Aos Professores Mariana Castro, Carlos Schwartz, Elizabeth Schwartz e Márcia Mortari pelo suporte nos momentos de dúvidas.

Ao Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas por disponibilizar o espectrômetro de massa.

Ao Adalmyr Borges da estação de piscicultura da granja ipê por fornecer alguns exemplares de tilápias.

A CAESB pela colaboração no fornecimento de dados e um agradecimento especial ao Sebastião Santos e ao José Guglielmo por toda ajuda.

Aos meus amigos que mandaram energias positivas e entenderam a minha ausência durante esses anos.

A Capes pela concessão de bolsa de pós-graduação no período de realização desse trabalho.

**"Vivemos numa época perigosa. O homem domina a natureza antes que tenha aprendido a dominar-se a si mesmo."**

*Albert Schweitzer*

## Sumário

Lista de abreviações	.ii
Lista de figuras e tabelas	.iv
Resumo	.viii
Abstract	.x
<b>1- Introdução</b>	<b>.1</b>
1.1- Eutrofização artificial	.1
1.2- Cianobactérias e cianotoxinas	.2
1.3- Microcistinas.	.4
1.4- Microcistinas e a saúde pública	.6
1.5- Lago Paranoá	.8
1.6- <i>Oreochromis nioloticus</i> (Linnaeus, 1758)	.14
<b>2- Justificativa</b>	<b>.17</b>
<b>3- Objetivos</b>	<b>.19</b>
3.1- Geral	.19
3.2- Específico	.19
<b>4- Material e métodos</b>	<b>.20</b>
4.1- Coleta e transporte dos exemplares de peixes.	.20
4.2- Purificação das amostras dos tecidos	.22
4.3- Coleta de água	.23
4.4- Análise por High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	.24
4.5- Análises de Espectrometria de massa	.26
4.6- Análise por Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	.27
4.7- Parâmetros ambientais	.28
<b>5- Resultados</b>	<b>.30</b>
5.1- Qualidade da água do Braço do Riacho Fundo – Lago Paranoá	.30
5.2- Análises dos tecidos dos peixes por HPLC	.37
5.3- Análise de espectrometria de massa	.45
5.4- Análise por ELISA	.48
<b>6- Discussão</b>	<b>.51</b>
<b>7- Conclusão</b>	<b>.68</b>
<b>8- Referências bibliográficas</b>	<b>.70</b>

## Lista abreviações

<b>Adda</b>	Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico
<b>CAESB</b>	Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
<b>cm</b>	Centímetros
<b>cél/mL</b>	Células por mililitro
<b>D-MeAsp</b>	D-eritro ácido metilaspártico
<b>ETE</b>	Estação de tratamento de esgoto
<b>g</b>	Gramas
<b>GST</b>	Glutathione Transferase
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>HPLC</b>	“High performance liquid chromatography”
<b>kg/ano</b>	Quilogramas por ano
<b>I<sub>s</sub></b>	Índice de similaridade
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
<b>LOAEL</b>	“Lowest observed adverse effect level”
<b>MC</b>	Microcistina
<b>MC-LR</b>	Microcistina-LR
<b>MC-RR</b>	Microcistina-RR
<b>Mdha</b>	N-metildeidroalanina
<b>min</b>	Minutos
<b>mg/L</b>	Miligrama por litro
<b>mg/g</b>	Miligramas por gramas
<b>mm</b>	Milímetros
<b>μ</b>	Micro
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μg/L</b>	Micrograma por litro
<b>μg/μL</b>	Micrograma por microlitro
<b>NOAEL</b>	“No observed adverse effect level”
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>PDA</b>	“Photo diodo array”
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico



<b>SEAP-PR</b>	Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República
<b>SUDEPE</b>	Superintendência de Desenvolvimento de Pesca
<b>SPE</b>	Solid phase extraction
<b>ppb</b>	Partes por bilhão
<b>TDI</b>	“Tolerable Daily Intake”
<b>T<sub>r</sub></b>	Tempo de retenção
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Lista de figuras e tabelas

**Figura 1:** Estrutura química geral de microcistinas, onde Z e X representam os dois L- aminoácidos variáveis e R1 e R2 são os locais de possíveis metilações.

..... **05**

**Figura 2:** *Oreochromis niloticus* proveniente do lago Paranoá. .... **15**

**Figura 3: (A)** Pesca com tarrafa no lago Paranoá. **(B)** Pescadores credenciados junto ao IBAMA para realizarem a pesca com tarrafa. **(C)** Pescado capturado. .... **20**

**Figura 4:** Visualização de mapa do lago Paranoá, destacado no círculo vermelho a área de captura do pescado. Fonte: Google maps..... **21**

**Figura 5: (A)** Biometria dos exemplares de tilápia. **(B)** Pesagem do peixe. **(C)** Incisão feita no filé para separação de amostra de músculo, já descamado. **(D)** Pesagem do tecido de músculo destinado a análise. **(E)** Pesagem do tecido de fígado destinado a análise. **(F)** Amostra de músculo separada e destinada a extração em metanol, cortada em pedaços pequenos. **(G)** Amostra de fígado separada destinada a extração em metanol, cortada em pedaços pequenos. .... **23**

**Figura 6:** Curva padrão da microcistina-LR (Sigma, St. Louis) construída a partir da injeção em triplicata de 9 concentrações diferentes: 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,15; 0,3; 0,5; 0,75; e 1,5µg/µL utilizando-se o “loop” de 20µL; equação da reta:  $Y = (3 \cdot 10^6)X - 23991$ ;  $R^2 = 0,993$ . .... **25**

**Figura 7:** Monitoramento realizado pelo Programa Limnológico da CAESB no lago Paranoá em ponto de coleta de água localizado na ETE sul no período de janeiro de 2008 a julho de 2009. **(A)** Resultados do parâmetro “transparência” (cm). **(B)** Resultados do parâmetro “fósforo total” (mg/L). **(C)** Resultados do parâmetro “clorofila-a” (µg/L). .... **31**

**Figura 8:** Monitoramento realizado pelo Programa Limnológico da CAESB no lago Paranoá em ponto de coleta de água localizado em ETE sul no período de janeiro de 2008 a julho de 2009. **(A)** Resultado do parâmetro “fitoplâncton” (mg/L). **(B)** Resultado do parâmetro “fitoplâncton” (Ind/L). .... **33**

**Figura 9:** Monitoramento pluviométrico realizado nos anos de 2008 e 2009 na estação pluviométrica instalada na ETE sul (15° 59' 39"S, 47° 54' 40"WGr), referente a pluviosidade mensal (mm). Fonte: CAESB. .... 34

**Figura 10:** Monitoramento realizado pelo Programa Limnológico da CAESB no lago Paranoá em ponto de coleta de água localizado na ETE sul no período de janeiro de 2008 a julho de 2009. Temperatura da água superficial (°C). ..... 35

**Figura 11: (A)** Concentração de microcistina detectada em amostras de água coletadas em frente à ETE sul dentro do período de monitoramento de março de 2008 a junho de 2009. **(B)** Média de concentração mensal em amostras de água coletadas em frente à ETE sul dentro do período de monitoramento de março de 2008 a junho de 2009. .... 36

**Figura 12: (A)** Cromatografia da amostra da água coletada em frente à ETE sul no dia 10/03/2009. Indicação pela seta da fração cromatográfica com tempo de retenção de 4.90 minutos. **(B)** Espectrograma da fração cromatográfica da amostra com tempo de retenção de 4.90 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. **(C)** Espectrograma da fração cromatográfica do padrão de MC-LR com tempo de retenção de 6.20 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. **(D)** Comparação dos espectrogramas do padrão de MC-LR (1) e da amostra (2) demonstrando  $I_s$  de 96. .... 38

**Figura 13: (A)** Cromatografia da amostra 80 de fígado coletado no dia 03/10/2009. Indicação pela seta da fração cromatográfica com tempo de retenção de 4.68 minutos. **(B)** Espectrograma da fração cromatográfica da amostra com tempo de retenção de 4.68 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. **(C) Espectrograma** da fração cromatográfica do padrão de MC-LR com tempo de retenção de 6.31 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. **(D)** Comparação dos espectrogramas do padrão de MC-LR (1) e da amostra (2) demonstrando  $I_s$  de 99. .... 39

**Figura 14: (A)** Cromatografia da amostra 81 de músculo coletado no dia 03/10/2009. Indicação pela seta da fração cromatográfica com tempo de retenção de 5.07 minutos. **(B)** Espectrograma da fração cromatográfica da amostra com tempo de retenção de

5.07 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. **(C)** Espectrograma da fração cromatográfica do padrão de MC-LR com tempo de retenção de 6.23 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. **(D)** Comparação dos espectrogramas do padrão de MC-LR (1) e da amostra (2) demonstrando  $I_s$  de 97. .... 40

**Figura 15:** Concentração de microcistina ( $\mu\text{g/g}$ ) presente em tecido de fígado, referente a coletas realizadas dentro do período amostral de março de 2008 a junho de 2009. Foram coletados três exemplares de *Oreochromis niloticus*. a cada campanha de coleta. *nd*→ não detectado. .... 42

**Figura 16:** Concentração de microcistina ( $\mu\text{g/g}$ ) presente em tecido muscular, referente a coletas realizadas no período amostral de março de 2008 a junho de 2009. Foram coletados três exemplares de *Oreochromis niloticus* a cada campanha de coleta. *nd*→ não detectado. .... 43

**Figura 17: (A)** Média de concentração de microcistina mensal detectada em amostras de fígado durante o período de março de 2008 a junho de 2009. **(B)** Média de concentração de microcistina mensal detectada em amostras de músculo durante o período de março de 2008 a junho de 2009. *nd*→ não detectado. .... 44

**Figura 18:** Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF do Padrão de Microcistina-LR (Sigma, St Louis) evidenciando o íon 995,329 m/z. .... 45

**Figura 19:** Espectrogramas de massa em sistema MALDI-TOF similares a massa molecular do padrão de MC-LR (Sigma, St Louis) de 995,329m/z. **(A)** Fração da amostra 48 de fígado de *Oreochromis niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 5.17 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,135 m/z. **(B)** Fração da amostra 49 de fígado de *O. niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 7.20 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,213 m/z. .... 46

**Figura 20:** Espectrogramas de massa em sistema MALDI-TOF similares a massa molecular do padrão de MC-LR (Sigma, St Louis) de 995,329m/z. **(C)**

Fração da amostra 30 de fígado de *Oreochromis niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 5.20 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,463 m/z. **(D)** Fração da amostra 79 de fígado de *O. niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 4.65 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,135 m/z. .... **47**

**Tabela 1:** Comparação das concentrações de MC encontradas pelas técnicas de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e teste imunoenzimático ELISA. Análise de músculo de *Oreochromis niloticus*. .... **49**

**Tabela 2:** Comparação das concentrações de MC encontradas pelas técnicas de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e teste imunoenzimático ELISA. Análise de amostras de água coleta no braço do Riacho Fundo do lago Paranoá, em frente à ETE sul..... **50**

**Tabela 3:** Comparação de valores máximos de MC-LR presentes na dieta humana. Concentrações bioacumuladas em partes comestíveis (músculos/ pé/ abdômen) de diferentes organismos aquáticos, exemplos retirados da literatura. Quantidade máxima de consumo diário do alimento (em gramas) para atingir a dose diária tolerável (TDI) de 0,04 µg/ kg de peso corpóreo/dia proposto pela OMS, considerando como base um adulto pesando 60kg. .... **58**

## Resumo

A ocorrência de florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas é um problema mundial que está diretamente associado ao processo de eutrofização de ecossistemas lacustres. As microcistinas (MCs) são cianotoxinas de ação hepatotóxica relacionadas a episódios de intoxicações em animais e seres humanos. Neste trabalho, o acúmulo de MCs em tecidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi investigado em peixes do Lago Paranoá em Brasília-DF. Foram realizadas coletas quinzenais de peixes ( $n=3$ ) e amostras d'água (1 litro), no período de março de 2008 a junho de 2009, totalizando 34 coletas. O número de 102 exemplares de *O. niloticus* foram dissecados em fígado e músculo, extraídos em metanol (100%) e purificados em cartuchos C18 de extração de fase sólida. A detecção de microcistina-LR foi feita por HPLC acoplado com detector fotodiodo. Coincidindo com o período de transição da estação seca para chuvosa, logo após a fase de maior densidade de fitoplâncton, foi detectada MC-LR na coluna d'água e em tecidos dos peixes. Quando detectada, a concentração da toxina variou de 0,2314 a 1,5384  $\mu\text{g/L}$ ; 0,0326 a 5,5549  $\mu\text{g/g}$ ; e 0,0087 a 0,1803  $\mu\text{g/g}$  em amostras de água, fígado e músculo, respectivamente. Análises de espectrometria de massa e ELISA também confirmaram a presença dessa cianotoxina. Considerando que, (a) o músculo representa a parte comestível do pescado, (b) a Organização Mundial da Saúde define como limite de ingestão diária (TDI) 0,04  $\mu\text{g}$  de MCs/ kg de peso corpóreo/ dia, e (c) a média mundial de consumo de pescado é de 12 kg/ habitante/ ano, i.e., 55g/hab./dia, apenas a concentração média detectada nesse tecido no mês de dezembro de 2009 ultrapassou o TDI, com valor de 0,0569  $\mu\text{g/g}$ . Embora este estudo tenha verificado que o período após o pico de crescimento de fitoplâncton representa o período de detecção de maiores concentrações de MCs, apenas um em dezesseis meses amostrados apresentou valores ligeiramente acima do recomendado pela OMS. Considerando que a legislação existente para água potável permite dentro do período anual que até três amostras ultrapassem em até 10 vezes o limite; que para determinação do TDI foram aplicados diversos fatores de segurança; e que assumindo a média de consumo de pescado da

área de estudo corresponde a média mundial que é quase o dobro da média brasileira 6-8 kg/ habitante/ ano, a ingestão de tilápias do Nilo provenientes do lago Paranoá não representa risco a saúde humana. Porém, como no Brasil não existe legislação específica para o controle da presença de cianotoxinas em alimentos, que é uma importante via de exposição e de risco para a saúde humana, sugere-se monitoramento periódico dos peixes desse lago.

**Palavras-chaves:** Bioacumulação, Eutrofização, Cianotoxinas, Microcistina, *Oreochromis niloticus*.

## Abstract

The occurrence of cyanobacterial blooms producing cyanotoxins is a global problem that is directly involved in eutrophication process affecting lake ecosystems. The microcystins (MCs) are hepatotoxic cyanotoxins that are related to animal and human poisoning episodes. In this work, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Paranoá Reservoir in Brasília-DF was investigated for MCs tissues accumulation. Both fish (n =3) and water (1 liter) samples were biweekly collected, from March 2008 to June 2009, ending 34 collections. A total of 102 fishes were dissected in liver and muscle, extracted with MeOH (100%) and latter purified with Solid Phase Extraction C18 cartridge. Detection of microcystins was performed by HPLC system accomplished with a photodiode detector. Results showed that MCs were only detected in the water sample and fish tissues during the transition between dry and wet seasons following period of highest phytoplankton density. When detected, concentration of MC-LR ranged from 0.2314 to 1.5384  $\mu\text{g/L}$ , 0.0326 to 5.5549  $\mu\text{g/g}$  and 0.0087 to 0.1803  $\mu\text{g/g}$  in water samples, liver and muscle, respectively. ELISA assay and mass spectrometry analysis also confirmed the occurrence of toxins. Considering that (a) muscle is the edible part of fish, (b) limit of daily intake (TDI) defined by World Health Organization is 0.04  $\mu\text{g MC / kg body weight / day}$ , and (c) global average fish consumption is 12 kg/ inhabitant /year, i.e., 55g/hab./day, only one data addressing average concentration of cianotoxin in muscle in December 2009 slightly exceed the TDI, with a value of 0.0569 $\mu\text{g/g}$ . Although this study had shown that period following phytoplankton growth was associated to highest concentrations of MCs, only one in sixteen months sampled presented concentrations of MCs slightly above levels recommended by WHO. Considering that (a) the Brazilian legislation for drinking water allows that 3 samples (in a year basis) may exceed up to 10 times the concentration defined as tolerable limit; (c) several safety factors were incorporated in the definition of TDI; and (d) assuming that the average fish consumption used as reference in present study were the World average which is almost double Brazilian average of 6-8 kg/inhabitant/year, it can be considered that the intake



of Nile tilapia from Paranoá Reservoir do not represent risk to human health. Taking into account that there is no specific legislation for cyanotoxins control in food in Brazil, although it is an important route of exposure and risk to human health, it is suggested that a periodic monitoring of the fishes species in this ecosystem should be carried out.

**Key words:** Bioaccumulation, Eutrophication, Cyanotoxins, Microcistins, *Oreochromis niloticus*.

## 1- Introdução

### 1.1- Eutrofização Artificial

Os lagos e lagoas, dentro de seus ciclos naturais, são formados por depressões geográficas que estão fadados ao um processo de envelhecimento natural no qual o assoreamento leva a uma redução do espelho d'água até o seu completo desaparecimento. Esse processo pode durar centenas ou milhares de anos dependendo do tipo de formação do solo e rochas presentes na área, bem como vegetação circundante (Rebouças, 2006).

O envelhecimento natural de um lago não envolve somente o assoreamento do corpo hídrico e pode ocorrer de forma acelerada, desencadeada por um processo de enriquecimento da água com nutrientes e excesso de matéria orgânica, sendo esse processo conhecido como eutrofização (UNEP, 1999).

A eutrofização do ecossistema pode ser natural ou artificial. Quando ocorre de forma natural, é um processo lento e contínuo que resulta do aporte de nutrientes trazidos por chuvas ou águas superficiais que erodem e lavam a superfície terrestre. Já a eutrofização artificial, também denominada antrópica, é resultante da ação humana que introduz nutrientes oriundos de outras fontes, como por exemplo, efluentes domésticos, desmatamento e ocupação da orla, fertilização de solos com produtos químicos utilizados na agricultura, dentre outras (Esteves, 1988).

A eutrofização é um problema amplamente estudado pela comunidade científica desde 1940 e é considerado um problema mundial, que afeta tanto rios, córregos, lagos, lagoas e reservatórios de regiões temperadas como de regiões tropicais (Tundisi *et al.*, 2006).

O nível de trofia de um lago refere-se ao suprimento de matéria orgânica presente no ambiente ou que aporta àquele por unidade de tempo (Aberg & Rodhe, 1942 apud Xavier *et al.*, 2005). Com base nessa definição, um ambiente é considerado pouco produtivo, ou oligotrófico, quando os níveis de matéria orgânica apenas alimentam uma baixa produção autotrófica. Por outro lado, um

ambiente muito produtivo, ou eutrófico, tem grande carga de origem alóctone e essa carga é caracterizada pela presença de excedente de nutrientes que fertilizam o recurso hídrico e desencadeia um aumento das produtividades dentro desse ecossistema (Tundisi, 2003).

A eutrofização é uma reação em cadeia que promove um desequilíbrio ecológico através da quebra da homeostasia do ecossistema. Inicialmente, é possível verificar o aumento da produtividade primária, crescimento maciço de fitoplâncton (principalmente cianobactérias) que impactam na dinâmica dos produtores secundários (principalmente zooplâncton e peixes) os quais apresentam mudanças na sua composição específica e na sua densidade (Esteves, 1988; Xavier *et al.*, 2005). Muitas espécies apresentam redução do número de indivíduos ou até mesmo desaparecem, pois a dominância e abundância podem levar a exclusão de algumas espécies e a um elevado crescimento populacional de outra. Durante o processo, quando a eutrofização encontra-se em estágio avançado, outros sintomas aparecem como pouca transparência da água, redução do oxigênio dissolvido na coluna d'água, mau cheiro da água e ocorre mortandade excessiva de peixes (Straskraba & Tundisi, 1999).

Em níveis extremos de um ambiente hipereutrófico, o desequilíbrio causado inviabiliza a água para abastecimento, para gerar energia elétrica e para uso na recreação ou lazer (Sperling, 1996).

## **1.2- Cianobactérias e cianotoxinas**

As cianobactérias ou cianofíceas, também conhecidas como algas azuis, são organismos procaríotos, unicelulares, capazes de realizar fotossíntese e apresentam formas variadas, como por exemplo: cocos, bastonetes, filamentos ou pseudofilamentos (FUNASA, 2003).

Registros fósseis demonstram a existência de cianobactérias a 3,3 - 3,5 bilhões de anos e por se tratarem de organismos capazes de converter gás carbônico em oxigênio através de fotossíntese, as cianobactérias foram os

primeiros produtores primários a oxigenarem a atmosfera primitiva (Carmichael, 1994).

As cianobactérias são organismos com capacidade de crescer em diversos ambientes. Porém, em condições de pouco vento, com temperatura entre 15-30°C, em pH neutroalcalinos na faixa de 6-9 e em abundância de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, seu crescimento ocorre de forma acelerada (Carmichael, 1997). Em ambientes eutróficos é comum ocorrer florações ou “Bloom” de cianobactérias, devido à grande quantidade de componentes nitrogenados e fosfatados na água (Esteves, 1988).

Alguns dos efeitos decorrentes de florações de cianobactérias envolvem, por exemplo, questões estéticas, pois além de produzirem gosto e odor na água, em águas de coloração esverdeada, mal cheirosa e turva não é comum encontrar atividades recreacionais (Sperling, 1996). O efeito mais grave desencadeado por cianobactérias é a capacidade de algumas espécies de produzirem toxinas, as cianotoxinas. As toxinas de cianobactérias constituem uma grande fonte de produtos naturais produzidos por esses microrganismos e, embora ainda não estejam devidamente esclarecidas as causas da produção dessas toxinas, uma das hipóteses assumidas é que esses compostos tenham função protetora contra herbivoria (Carmichael, 1992), sendo que em alguns estudos, foi demonstrado existir uma preferência alimentar de alguns peixes por florações não tóxicas de cianobactéria (Keshavanath *et al.*, 1994). Uma abordagem alternativa sugere que as cianotoxinas representam moléculas mediadoras em interações de cianobactérias com outros componentes do habitat, como bactérias heterotróficas, fungos, protozoários e algas (Paerl & Millie, 1996). E ainda, alguns autores consideram a possibilidade da produção dessas toxinas estar relacionada à comunicação intercelular, seja intra ou interespecífica (Kearns & Hunter, 2000; Dittmann *et al.* 2001).

Essas toxinas são liberadas na coluna d’água e não são facilmente removidas por fervura e nem pelos sistemas de tratamento de água tradicionais (Dawson, 1998; Funasa, 2003), o que desperta grande preocupação companhias de tratamento de água, quando existe proliferação de cianobactérias nos mananciais de água potável das cidades.

As cianotoxinas podem ser classificadas em três categorias: neurotóxicas, hepatotóxicas e irritantes ao contato.

As neurotoxinas atuam ao nível da transmissão dos impulsos nervosos, e podem provocar a morte por parada respiratória, devido à paralisia muscular (Carmichael, 1992). As hepatotoxinas são responsáveis por lesões no fígado, podendo mesmo conduzir à morte por hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico (Dawson, 1998), além disso, em doses não letais, estas toxinas têm sido relacionadas com o desenvolvimento de tumores, pois têm efeitos carcinogênicos (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Fujiki, 1992). Apesar de não serem letais para os organismos, e não serem consideradas tão perigosas como as neuro- e hepatotoxinas, as toxinas irritantes ao contato são igualmente compostos bioativos, que podem lesar as células e tecidos (Funasa, 2003).

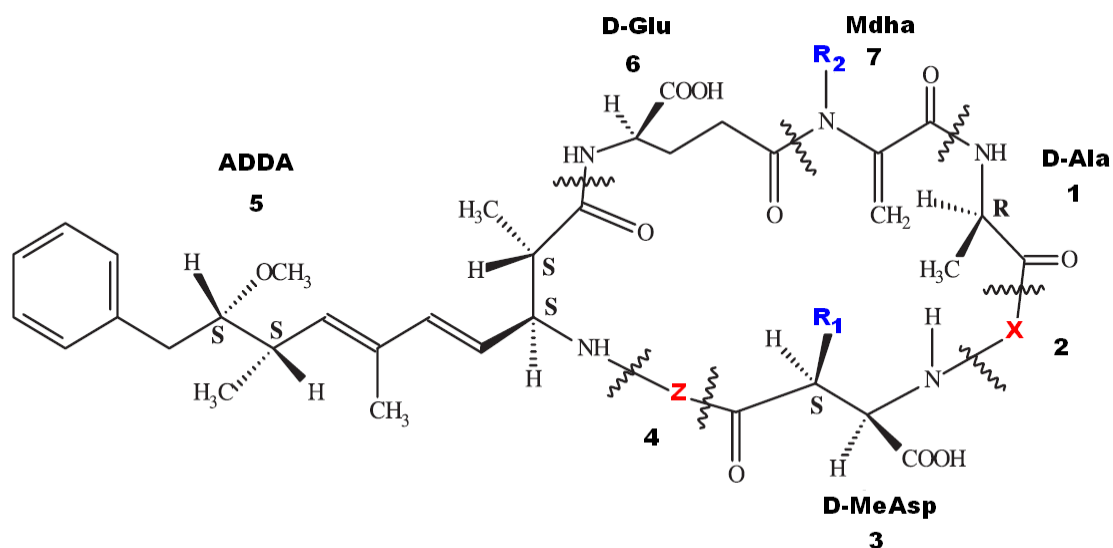
### 1.3- Microcistinas

As microcistinas (MCs) são hepatotoxinas produzidas por alguns gêneros de cianobactérias, dentre eles, *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (Carmichael, 1994; Dawson, 1998). As MCs são as cianotoxinas mais amplamente distribuídas e comumente reportadas. Essas são toxinas peptídicas, sendo que as microcistinas representam o grupo de hepapeptídios cíclicos (Funasa, 2003).

As microcistinas são produzidas por uma via não-ribossomal através da ação de enzimas, denominadas sintetases de peptídeos não-ribossomais, as quais são responsáveis pela incorporação dos aminoácidos na molécula (Dittmann *et al.* 1997, Tillett *et al.* 2000). As sintetases de microcistinas, por sua vez, são codificadas por genes do cluster *myc* (Molica & Azevedo, 2009). Em sua composição estrutural foi identificado peptídeo monocíclico composto de D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, onde X e Z são os dois L aminoácidos variáveis, D-MeAsp é D-eritro ácido metilaspártico e Mdha é N-metilideidroalanina, conforme mostrado na Figura 1 (Carmichael *et al.*, 1988). O

Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico), é o composto responsável pela hepatotoxicidade (Dawson, 1998).

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael *et al.* (1988) e foi baseada inicialmente na composição dos L-aminoácidos, como por exemplo, a microcistina-LR (leucina-arginina), a microcistina-RR (arginina-arginina) e a microcistina-YA (tirosina-alanina). Já se tem conhecimento de mais de 60 variáveis de microcistina (Silvonen & Jones 1999), e diferenças no grau de metilações dos aminoácidos, assim como variações isométricas no Adda também foram utilizadas na classificação dessas hepatotoxinas (Rinehart *et al.*, 1994).



**Figura 1:** Estrutura química geral de microcistinas, onde Z e X representam os dois L-aminoácidos variáveis e R1 e R2 são os locais de possíveis metilações.

As microcistinas são cianotoxinas com ação hepatotóxica, que são internalizadas nos hepatócitos através dos receptores dos ácidos biliares (Falconer, 1991). Uma vez dentro da célula, promovem a desorganização dos filamentos intermediários e de actina; polímeros protéicos componentes do citoesqueleto do hepatócito (Runnegar & Falconer, 1986). A desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato célula-célula dos capilares sinusoidais. Assim, o fígado perde sua arquitetura e

surgem lesões internas graves. A perda deste contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais (Lambert *et al.*, 1994).

Existem alguns mecanismos de metabolização e detoxificação que ocorrem nos organismos. Acredita-se que a enzima glutathione transferase (GST) está envolvida com processos de desintoxicação causado por xenobióticos, além daqueles ligados aos quimioterápicos do câncer, inseticidas, herbicidas e antibióticos (Miller *et al.* 2001; Strange *et al.* 2001). A formação de um conjugado entre a glutathione reduzida (GSH) e microcistinas em fígado de animais expostos a toxina pode ocorrer e esse composto é mais facilmente excretado (Pflugmacher *et al.*, 1998).

Outros estudos também têm demonstrado que várias microcistinas são potentes inibidores de proteína fosfatase tipo 1 e 2A de células de eucariotos (MacKintosh *et al.*, 1990) e, além disso, há essas toxinas são reconhecidas como potentes promotores de tumores hepáticos (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsuhima *et al.*, 1992).

#### **1.4- Microcistinas e a saúde pública**

Os sinais de envenenamento por hepatotoxinas já foram observados em bovinos, ovinos, cavalos, porcos, patos e outros animais domésticos e os efeitos da intoxicação incluem, fraqueza, anorexia, palidez das mucosas, vômito, frio extremo e diarreia (Carmichael, 1992).

No Brasil, existem poucos registros de intoxicação humana pela ocorrência de cianotoxinas. Teixeira *et al.* (1993) descrevem uma forte evidência de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre as 2000 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, entre março e abril de 1988. No início do ano de 1996, 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica da cidade de Caruaru (Pernambuco), passaram a apresentar um quadro clínico compatível com grave hepatotoxicose. Cinquenta e quatro pacientes morreram devido à presença de

toxinas de cianobactérias na água de hemodiálise, no evento que passou a ser o primeiro caso de morte associada à toxina de cianobactéria (Azevedo, 1996). As análises laboratoriais confirmaram a presença de microcistinas e cilindrospermopsina no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica, e de microcistina em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados (Azevedo, 1996; Carmichael *et al.*, 1996, Carmichael *et al.*, 2001).

Os problemas associados às cianobactérias têm sido mais comumente evidenciados em áreas habitadas por população de baixa renda, onde o crescimento populacional é desordenado e sem saneamento urbano. Contudo, ainda não se tem relatos de casos de morte humana causadas por ingestão oral proposital de água contendo cianotoxinas (Magalhães *et al.*, 2001).

Outro tipo de exposição de seres humanos a toxinas de cianobactérias está relacionado ao acúmulo destas ao longo da cadeia trófica. Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de verificar a biomagnificação em diversos patamares da cadeia alimentar. A bioacumulação de MCs já foi observada em organismos que compõe o zooplâncton (DeMott *et al.*, 1991; Mohamed, 2001), peixes (Magalhães *et al.*, 2001 e 2003; Soares *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005), moluscos (Chen & Chou, 2001; Chen & Xie, 2005b; Prepas *et al.*, 1997, Ozawa *et al.*, 2003) e crustáceos (Chen & Xie, 2005a; Monteiro *et al.*, 1998). Esses animais têm sido avaliados devido a sua significativa importância na alimentação e na manutenção do equilíbrio em ecossistemas como lagoas, lagos ou baías. (Vanderploeg *et al.*, 2001; Sipiã *et al.*, 2001; Ferrão-Filho *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2003).

Essa constatação reforça o perigo de danos ao longo de toda a cadeia alimentar, visto que sua base já apresenta comprometimentos causados pela acumulação de cianotoxinas (Ferrão-Filho *et al.*, 2002).

Diversos estudos com espécies de peixes, como carpas, trutas e dourado têm comprovado a ocorrência de bioacumulação em órgãos e tecidos desses animais, representando um risco para outros animais e o próprio homem que utiliza os organismos citados como fonte de alimento (Magalhães *et al.*, 2001 e 2003). Estas pesquisas mostraram altas taxas de acumulação de microcistina



na musculatura e nos órgãos, sendo os resultados maiores que valores recomendados pela Organização Mundial da Saúde (Chorus & Bartram, 1999).

Magalhães *et al.* (2001), monitorando peixes na lagoa de Jaguarepaguá - RJ durante os anos de 1996 a 1999, demonstraram a bioacumulação de microcistina em peixes. Este estudo demonstrou que *Tilapia rendalli*, uma espécie exótica amplamente utilizada na piscicultura acumulou mais toxina do que a tolerância de ingestão diária por peso corporal de 0,04µg/kg de peso corpóreo/dia (Chorus & Bartram, 1999).

Giordano (2007), em testes laboratoriais, apresentou resultados positivos de incorporação de microcistinas em tecidos de carpas prateadas (*Hypophthalmichthys molitrix*). Além disso, estudos recentes avaliando taxas de acumulação e depuração de microcistina em condições laboratoriais utilizando exemplares de *Oreochromis niloticus* ratificam a ocorrência de bioacumulação, bem como fornecem os primeiros indícios de taxa de excreção por animais de microcistinas (Soares *et al.*, 2004).

Com isso, devemos levar em consideração que a ingestão de organismos contaminados por cianotoxinas representa um grande risco potencial à saúde pública.

### **1.5- Lago Paranoá**

O Lago Paranoá é um dos ecossistemas que constitui a Área de Proteção Ambiental (APA) do Paranoá criada pelo decreto distrital 12.055 de 14 de dezembro de 1989. No ano de 1956 foi dado início ao represamento do rio Paranoá que tinha como objetivo inicial a criação de um lago que iria compor a paisagem da nova capital do Brasil, Brasília localizada no Distrito Federal (Menezes-Júnior *et al.*, 2001). O lago Paranoá foi formado, em 1959, a partir do fechamento de barragem do rio Paranoá, represando águas do Riacho Fundo, do Ribeirão do Gama e do Córrego Cabeça de Veado, ao sul e dos Ribeirões do Torto e Bananal, ao norte, além de outros pequenos tributários que alimentavam as cachoeiras que desciam rumo ao rio São Bartolomeu (Ferrante *et al.*, 2001). Esse lago artificial necessitou de duas temporadas de chuvas para atingir a cota prevista de 1000 metros acima do nível do mar, o que

resultou após esse período, em uma área que abrange aproximadamente 1.034,07 km<sup>2</sup>, volume de 498 x 106 m<sup>3</sup>, tempo de retenção de 299 dias e com profundidade máxima e média de 38 e 14 m, respectivamente (Mattos *et al.*, 1997).

A criação desse lago tinha como objetivo, além de paisagismo, a melhoria do microclima em suas proximidades, a criação de opções de lazer através de suas áreas balneáveis, geração de energia elétrica e recebimento de águas de escoamento superficial e dos efluentes de esgotos tratados pelas duas estações de tratamento de Esgoto (ETE sul e norte) da Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal-CAESB (Altafin *et al.*, 1995).

Decorrida a primeira década após o enchimento do lago Paranoá, estudos de avaliação da comunidade fitoplanctônica referentes a coletas realizadas entre os anos de 1965 a 1968, caracterizavam esse lago como um ambiente pouco poluído pois havia dominância algas verdes (desmidiáceas) naquele período, mas mudanças qualitativas já apontavam sinais de uma tendência ao predomínio de cianobactérias devido ao desencadeamento do processo de eutrofização (Oliveira & Krau, 1970).

Também na década de 60, a comunidade de peixes do lago Paranoá era constituída de espécies nativas adaptadas provenientes dos tributários que deram origem ao lago Paranoá e por espécies exóticas que começaram a ser introduzidas em 1960. Já em 1964, foi realizado o primeiro levantamento pesqueiro que considerou o lago Paranoá como um ambiente pouco piscoso (França *et al.*, 1964). Nos anos seguintes, a fim de incrementar a oferta de pescado para valores de produção próximos a 200 toneladas anuais, foram feitas introduções não controladas de outras espécies exóticas, dentre elas, a carpa comum, o tucunaré e a tilápia do Nilo (SUDEPE, 1980; Dornelles & Dias-Neto, 1985).

Com o crescimento populacional desordenado e o inadequado tratamento de esgoto, já na década de 70 a qualidade da água começou a mudar e o lago desenvolveu um acelerado processo de eutrofização, no qual foi observado floração de cianobactérias (Cavalcanti *et al.*, 1997; Felizatto *et al.*, 1999). Nesse período, o estoque pesqueiro confirmava a dominância de espécies

exóticas principalmente carpas e tilápias (Starling & Rocha, 1990; Ribeiro *et al.*, 2001).

Nessa mesma década, existia uma situação de grande dominância de cianobactérias, com floração permanente da cianobactéria filamentosa *Cylindrospermopsis raciborskii* e freqüentes “blooms” superficiais de outra espécie *Microcystis aeruginosa* (Mattos & Starling, 2001).

A ocorrência de florações algais, cobrindo as camadas superficiais do lago, impedia a entrada de luz e trocas gasosas, causando um desequilíbrio ecológico no ecossistema que resultou em episódios de mortandades de organismos aquáticos com liberação de mau cheiro (Altafin *et al.*, 1995). Em novembro de 1978, surgiam os primeiros registros de mortandade maciça de peixes causada pela anoxia em toda a coluna d’água decorrente da floração de *M. aeruginosa*, resultando na remoção de toneladas de peixes mortos principalmente na área do braço do Riacho Fundo (Burnett *et al.*, 2001; Starling *et al.*, 2002). Nesta mesma época, estampava a manchete do jornal local a notícia a cidade cheirava mal por causa da poluição no lago Paranoá. Novos registros menos expressivos de mortandade de peixes ocorreram nos anos de 1981, 1982, 1987, 1988, 1989 e 1983. Segundo Starling *et al.* (2002) no ano de 1997, no braço do Riacho Fundo – área identificada como a mais comprometida do lago Paranoá – ocorreu uma segunda mortandade maciça de peixes, na qual o déficit de oxigênio causado pela inversão térmica com ressuspensão do material do fundo causou a morte de 150 toneladas de peixes, na sua quase totalidade tilápias (*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*).

O lago Paranoá, nas décadas de 70 e 80, encontrava-se com níveis compatíveis com o estado de hiper-eutrofia em boa parte de sua extensão, sendo que as áreas mais afetadas eram os braços do Riacho Fundo e Bananal por serem regiões de localização das ETEs. Foram atribuídas diversas prováveis causas para o desencadeamento desse processo, dentre elas: o aumento acelerado populacional na bacia de drenagem; a não remoção de favelas e acampamentos existentes na área inundada; o desmatamento incompleto da área de inundaçãõ; o recebimento de esgotos brutos ou

inadequadamente tratados; transporte através dos tributários e águas pluviais de fertilizantes, esgotos e outros contaminantes (Burnett *et al.*, 2001).

O diagnóstico traçado por uma equipe de especialistas identificou o fósforo como principal fator limitante para o crescimento da vegetação aquática, ou seja, produtividade primária daquele lago (Mattos & Starling, 2001).

O fósforo também está presente em grande quantidade nos esgoto o que indicou para órgãos governamentais a necessidade de mudanças de estratégias no tratamento do esgoto realizado pelas estações de tratamento que lançavam no lago Paranoá esses efluentes (Felizatto *et al.*, 1999).

Após anos de estudos, foi definido que a melhor estratégia para auxiliar na despoluição do lago Paranoá seria continuar lançando esgotos, mas antes disso investir no tratamento terciário de efluentes com remoção biológica de nutrientes, seguido de polimento final (Burnett *et al.*, 2001; Pereira & Cavalcanti, 1996).

A implementação de um programa de recuperação do lago Paranoá foi iniciada no ano de 1979 (Cavalcanti *et al.*, 1997). Através do investimento de 300 milhões de dólares para a reforma das estações de tratamento de esgoto, foi implantado o tratamento terciário, o qual começou a vigorar em 1993 na ETE sul e 1994 ETE norte (Felizatto *et al.*, 1999). Esse tratamento terciário é responsável pela remoção de nutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) que são despejados no corpo receptor (Teixeira-Pinto *et al.*, 1999).

Também foram implantados, pela CAESB, programas de monitoramento periódicos com a finalidade de (a) monitorar a qualidade da água, (b) entender a dinâmica interna do ecossistema e (c) reunir subsídios para alternativas de recuperação e manejo. Dentre esses programas encontram-se: (a) Programa Limnológico, no qual são analisados parâmetros físicos, químicos e biológicos com frequência mensal; (b) Programa de Controle de Floração de Algas, que realiza inspeções de avaliação da necessidade de aplicação de algicida sulfato de cobre para o controle da proliferação de cianobactérias; e (c) Programa de Balneabilidade, que tem como objetivo principal informar a população da adequabilidade ou não de águas superficiais do lago Paranoá quanto à recreação de contato primário (natação, esqui aquático, mergulho), através de

análises semanais de coliformes termotolerante ou *Escherichia coli* e pH (Burnett *et al.*, 2001).

Paralelamente, foi desenvolvido o Programa de Biomanipulação iniciado em 1999 que objetiva o manejo da cadeia alimentar para a melhoria da qualidade da água. Foram, apontadas duas estratégias de manejo pesqueiro para redução de biomassa algal: o controle da superpopulação de tilápia e a introdução de carpas prateadas estéreis (Starling & Lazzaro, 2001). O controle do estoque de tilápias foi promovido através da liberação da pesca com tarrafas realizada por pescadores licenciados pelo IBAMA a partir do ano de 2000, o que representou, através da captura de cerca de 8 (oito) toneladas mensais de peixes, além da melhoria da qualidade da água, benefício à população de baixa renda aumentando a oferta de emprego e fornecendo uma fonte adicional de oferta de alimento (Starling *et al.*, 2003).

Apesar de inúmeros estudos e implementação de diversas alternativas de manejo, os resultados do combate à poluição do lago Paranoá só começaram a aparecer após a adoção do tratamento terciário de esgoto em 1993. A redução de fósforo lançado nesse ecossistema foi de 89%, passando de 450 kg/dia em 1989, para 50 kg/dia em 1998. Também ocorreram diminuições significativas de concentração de nitrogênio e clorofila-*a*, além do aumento da transparência da água (Tundisi *et al.*, 2006). Uma medida de manejo decisiva no processo de despoluição no lago Paranoá foi o “flushing” que constituiu na abertura abrupta das comportas do reservatório, eliminando principalmente a água superficial rica em algas e nutrientes, no final da estação seca de 1998 (Angelini *et al.*, 2008).

Uma das primeiras melhorias observadas com o aumento da qualidade da água do lago Paranoá a partir de 1999, foi a redução expressiva da cianobactéria *C. raciborskii* que dominava em mais de 90% a comunidade fitoplanctônica desse lago desde 1970 (Starling *et al.*, 2003).

Entretanto, apesar do grande esforço que vem sendo empreendido pela CAESB para o melhoramento da qualidade de água do Lago Paranoá, este ainda apresenta áreas sujeitas a processos localizados de eutrofização, o que ainda propicia o reaparecimento de florações de cianobactérias.

Philomeno (2003) verificou uma elevada densidade de cianobactérias nos braços do Ribeirão do Torto e do Riacho Fundo, nos períodos de seca e chuva dos anos de 1997 a 1998. Sendo que as espécies dominantes eram *Oscillatoria* spp, *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Pires Jr. (comunicação pessoal) relatou a presença de microcistina-LR em uma floração de *M. aeruginosa* ocorrida no Lago Paranoá em outubro de 2004, nas proximidades da ETE Norte. Pires Jr, e.g. (comunicação pessoal) sugere a presença de cepas tóxicas de *C. raciborskii* no Lago Paranoá, visto que camundongos injetados com extratos de tecidos bivalves filtradores coletados próximos a ETE norte apresentaram sintomas de neurotoxicidade aguda muito similares a intoxicação com saxitoxina, uma cianotoxina neurotóxica.

As populações de baixa renda do Distrito Federal vêm na pesca uma fonte bastante acessível de proteína animal e, ainda, fazem desta atividade uma alternativa de renda, através da comercialização do pescado em feiras livres das cidades satélites e entorno do Distrito Federal (Walter, 2000). Assim, é bastante comum presenciar, no lago Paranoá, tanto pescadores recreacionais quanto profissionais cadastrados no Programa de Biomanipulação da CAESB capturando permanentemente peixes destinados ao consumo humano. Todavia, não existe nenhum estudo em longo prazo abordando a capacidade de bioacumulação de toxinas nos peixes presentes neste reservatório, o que gera um risco potencial a comunidade que ingere esse pescado.

O programa de balneabilidade da CAESB demonstra que nos últimos anos mais de 95% a água superficial do lago Paranoá apresentam bons índices com resultados dentro do proposto pela resolução CONAMA número 20 do dia 18 de junho de 1986. Porém, os braços do Bananal e do Riacho Fundo são conhecidos por serem pontos preferenciais para pesca, visto que a presença de ETEs nestes braços promoveu um maior aporte de componentes orgânicos na água, sustentando assim uma maior biomassa de peixes nesta região. Estudo de realizado entre os anos de 1978 a 1980 pela antiga Superintendência de Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) atualmente IBAMA, estimou o estoque de peixes no lago em 3.000 toneladas. Em nova avaliação por ecossondagem, Dhaussy *et al.* (1998) reavaliou o estoque pesqueiro do Lago

Paranoá como sendo da ordem de 1.500 toneladas, das quais mais de 300 toneladas encontravam-se concentradas no Braço do Riacho Fundo. Starling (1998) relata que a espécie mais abundante nesse mesmo ecossistema é a tilápia do Nilo, ocupando principalmente o braço do Riacho Fundo. Mais recentemente, Lazzaro & Starling (2005), apresentam dados de desembarque pesqueiro do início do Programa de Biomanipulação, os quais revelam que no ano de 2000, a pesca apresentou rendimento de 62,5 toneladas de peixes, sendo que a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) representou 85% das capturas. O monitoramento do desembarque pesqueiro no Lago Paranoá a partir da liberação da pesca profissional em fevereiro de 2000, tem contabilizado um montante superior a 8 toneladas de peixes capturados com tarrafa mensalmente neste ecossistema (Starling *et al.*, 2003).

Neste Contexto, o presente trabalho visa apresentar um diagnóstico sanitário dos peixes pertencentes à principal espécie capturada no Lago Paranoá, em relação à presença de microcistinas, tendo em vista que são largamente consumidos pela população local.

### **1.6- *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie da Família Cichlidae nativa do Continente Africano que conquistou destaque na aquicultura mundial (Figura 2 - Fernando, 1983 e 1994).

Ciclídeos africanos dos gêneros *Sarotherodon*, *Oreochromis* e *Tilapia*, são peixes herbívoros, cuja dieta pode ser dividida em três categorias: onívoros, fitoplanctívoros e comedores de macrófitas (Lowe-McConnell, 1982). Embora a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e a tilápia do Congo (*T. rendalli*) sejam classificadas respectivamente onívoras e comedoras de macrófitas, a dieta delas também incluem cianobactérias, algas verdes, diatomáceas e macrófitas (Okeyo, 1989). Outros componentes alimentares como zooplâncton, moluscos, larvas de insetos, ovos e embriões de peixes (Caulton, 1977; Campbell, 1981; Lazzaro, 1991), além de detritos (Getachew & Fernando, 1989).

Em geral, as tilápias podem ser consideradas como onívoros oportunistas com grande tendência a herbivoria (Starling, 1998). A dieta alimentar das

tilápias do lago Paranoá inclui detritos, zooplâncton, fitoplâncton, invertebrados bentônicos, larvas e ovos de peixes, o que demonstra bem comportamento onívoro (Grando, 1989).

Além desse comportamento alimentar flexível, as tilápias apresentam enorme capacidade reprodutiva. O cuidado parental (Fryer & Iles, 1972) desovas durante todo o ano (Kolding, 1993), resistência a doenças, a altas temperaturas, a baixa concentração de oxigênio e a alta concentração de amônia na água (Borges, 2004), representam características que conferem as tilápias vantagens competitivas contra outras espécies na colonização de habitats instáveis em ambientes lacustre dos trópicos e subtropicos (Starling, 1998).



Foto: Janaína Starling

**Figura 2:** *Oreochromis niloticus* proveniente do lago Paranoá.

Apesar dessa grande capacidade proliferativa, o excesso da biomassa de tilápias dentro do reservatório pode acelerar o processo de deterioração da qualidade da água (Diana *et al.*, 1991). Apesar de ser uma espécie também recomendada na biomanipulação para controle de florações, existem evidências claras que elas podem contribuir no enriquecimento do ecossistema aquático por nutrientes via excreção e ou re-suspensão de nutrientes (Starling, 1998).



Starling & Lazzaro (1997) discutiram dois mecanismos para explicar a intensificação da eutrofização no lago Paranoá causada pela presença da superpopulação de tilápias: (1) efeito em cascata de predação de peixe por zooplâncton, reduzindo o forrageio por algas e, assim, favorecendo o crescimento dessas; (2) a excreção direta de N e P acumulados nos sedimentos e que contribuem para crescimento do fitoplâncton.

Com base em experimentos de laboratório com medições das taxas de excreções das tilápias e experimentos “in situ” simulando situações reais de manejo da abundância de tilápias em sub-áreas do próprio Lago Paranoá, foram implementadas estratégias de manejo visando a redução da eutrofização a partir do controle da proliferação excessiva de tilápias através da pesca profissional (Lazzaro & Starling, 2005).

A implementação da Biomanipulação trouxe, além das melhorias na qualidade da água, benefícios sociais e econômicos associados a exploração comercial de um peixe de excelente palatabilidade e fonte de proteína animal à população de baixa renda.

## 2- Justificativa

O Lago Paranoá é um importante ecossistema lacustre de usos múltiplos, amplamente utilizado pela população do Distrito Federal para diversas atividades, dentre as quais merece destaque a pesca. A pesca artesanal no lago existe desde a sua criação, atuando como produto de subsistência para várias famílias que antigamente exerciam essa atividade clandestinamente. Dados de desembarque provenientes do programa de biomanipulação relatam a retirada de aproximadamente 8.000 Kg de pescado por mês desde o ano de 2000 (Starling & Lazzaro, 2001; Lazzaro & Starling, 2005).

O pescado do Lago Paranoá já foi submetido à avaliação de sua qualidade sanitária, através de análises de metais pesados, pesticidas e bactérias patogênicas (ISDF, 1997), apresentando um excelente resultado, sendo esta uma das principais justificativas para a liberação da pesca profissional com tarrafa pelo IBAMA no ano de 2000.

Paralelamente a implantação do Programa de Biomanipulação através da remoção maciça de tilápias pela pesca profissional, foi intensificado o Processo de Oligotrofização do Lago Paranoá, como resultado do controle dos aportes de esgotos domésticos (Burnett *et al.*, 2001). As florações de cianobactérias passaram de ocorrências comuns nas décadas de 1970, 80 e 90, para eventos esporádicos e restritos a áreas como o início do Braço do Riacho Fundo a partir de 1998, com a despoluição deste ecossistema (Burnett *et al.*, 2001)

Tendo em vista que esta única área ainda sujeita a processo de eutrofização com risco de florações de cianobactérias é exatamente o ponto de maior concentração de peixes e conseqüentemente a região do lago de maior desembarque de tilápias pela pesca profissional, torna-se imprescindível verificar a possibilidade destes peixes estarem bioacumulando cianotoxinas.

Além disso, no cenário atual, onde as cianobactérias já foram associadas a tragédias envolvendo mortalidade de seres humanos devido à ingestão de suas toxinas (Jochimsen *et al.*, 1998; Azevedo *et al.* 2002),

reveste-se de especial importância a avaliação da incorporação dessas toxinas nos peixes destinados ao consumo humano.

Além disso, a legislação brasileira em vigor não prevê a bioacumulação de cianotoxinas em animais aquáticos, existe apenas a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para que o consumo de microcistinas não ultrapasse 0,04 µg/kg de peso corpóreo/dia (Chorus & Bartram, 1999).

A despeito da literatura científica evidenciando a bioacumulação de cianotoxinas em pescado e a preocupação crescente com o aumento das populações de cianobactérias, existe uma carência de estudos abordando o grau de intoxicação dos peixes provenientes do Lago Paranoá com cianotoxinas.

Diante do risco de contaminação que o pescado do Lago Paranoá pode apresentar, sendo esta uma questão de saúde pública, há necessidade de fornecer informações a população sobre os riscos que as microcistinas podem causar após seu consumo, sendo este o tema principal do presente estudo.

### **3- Objetivos**

#### **3.1- Geral**

O presente trabalho tem por objetivo analisar a incorporação (bioacumulação) de microcistina-LR na principal espécie oriunda da pesca no Lago Paranoá, tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), tendo como referência a presença desta toxina na água.

#### **3.2- Específicos**

1. Avaliar os níveis de bioacumulação de microcistina-LR no fígado e na musculatura de exemplares adultos de *Oreochromis niloticus*.
2. Verificar se os valores encontrados de microcistina-LR nos peixes são compatíveis com o atual estado trófico do braço do Riacho fundo do lago Paranoá.
3. Determinar se existe variação sazonal nas concentrações de microcistina-LR associada a dinâmica de flutuação da biomassa fitoplanctônica.
4. Através dos resultados encontrados, verificar se os níveis de microcistina-LR detectados nos tecidos dos peixes são tóxicos e avaliar os riscos associados ao consumo desse pescado por seres humanos.

## 4- Material e métodos

### 4.1- Coleta e transporte dos exemplares de peixes

As coletas foram realizadas quinzenalmente no período de março de 2008 a junho de 2009. O número de três exemplares de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), espécie muito utilizada com fins alimentícios, foi fornecido para análise pelos pescadores profissionais credenciados e licenciados no âmbito do Programa de Biomanipulação – CAESB (figura 3). Os peixes foram pescados entre a Ponte das Garças e a Estação de Tratamento de Esgoto Sul (ETE SUL), região do início do braço do Riacho Fundo do lago Paranoá (15°50'30.6"S, 47°54'19.8"WGr), conforme ilustrado na Figura 4. Sempre que possível, procurou-se selecionar exemplares adultos de tilápia de tamanho comercial, a fim de garantir a homogeneidade entre as amostras.

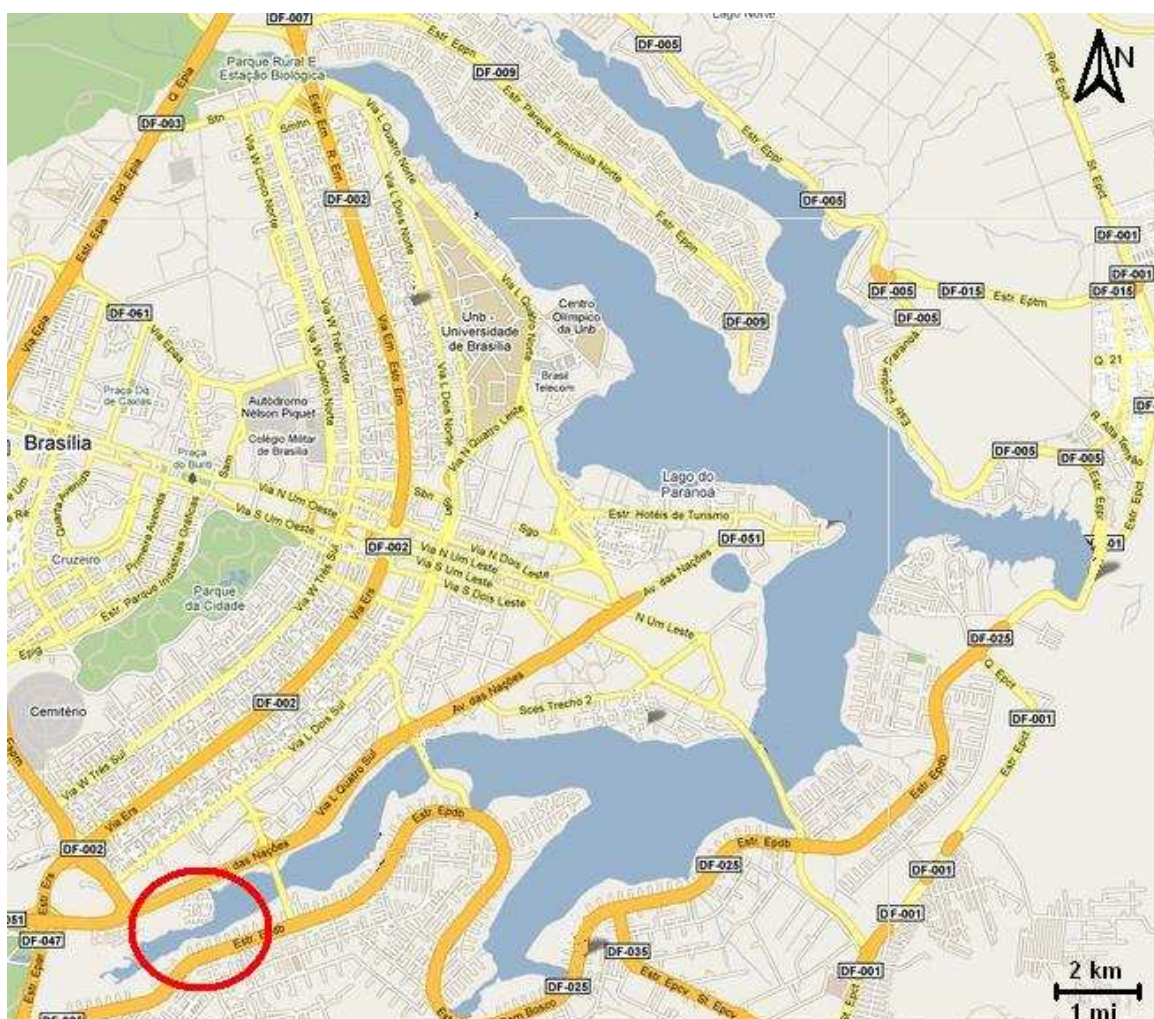


**Figura 3:** (A) Pesca com tarrafa no lago Paranoá. (B) Pescadores credenciados junto ao IBAMA para realizarem a pesca com tarrafa. (C) Pescado capturado.

Em um total de 34 campanhas de coletas foram analisados 102 exemplares de tilápias. O período total de coletas se estendeu por 16 meses

ininterruptos abrangendo os períodos de seca e chuva que são bem definidos na região.

A localidade de coleta foi definida nas proximidades da ETE SUL da CAESB, pois a região ainda apresenta características de estado eutrófico além de ser aquela de maior afluxo de pescadores no Lago Paranoá. A captura dos peixes para análise de bioacumulação de microcistina foi realizada por pescadores profissionais licenciados pelo IBAMA.



**Figura 4:** Visualização de mapa do lago Paranoá, destacado no círculo vermelho a área de captura do pescado. Fonte: Google maps.

Os animais em estudos foram coletados logo após a pesca e acondicionados em caixa térmica contendo gelo para o transporte até o laboratório. Após esse procedimento, durante o início da extração foi feita incisão na cavidade abdominal, da qual foram obtidas amostras do fígado e musculatura para quantificação de microcistina.

Cada espécime coletado passou por uma etapa de biometria, na qual os dados referentes ao comprimento total, peso total, peso de filé (músculo) e peso do fígado foram anotados em livro ata de registro. Esses dados foram referentes ao conteúdo bruto e úmido.

#### **4.2- Purificação das amostras dos tecidos**

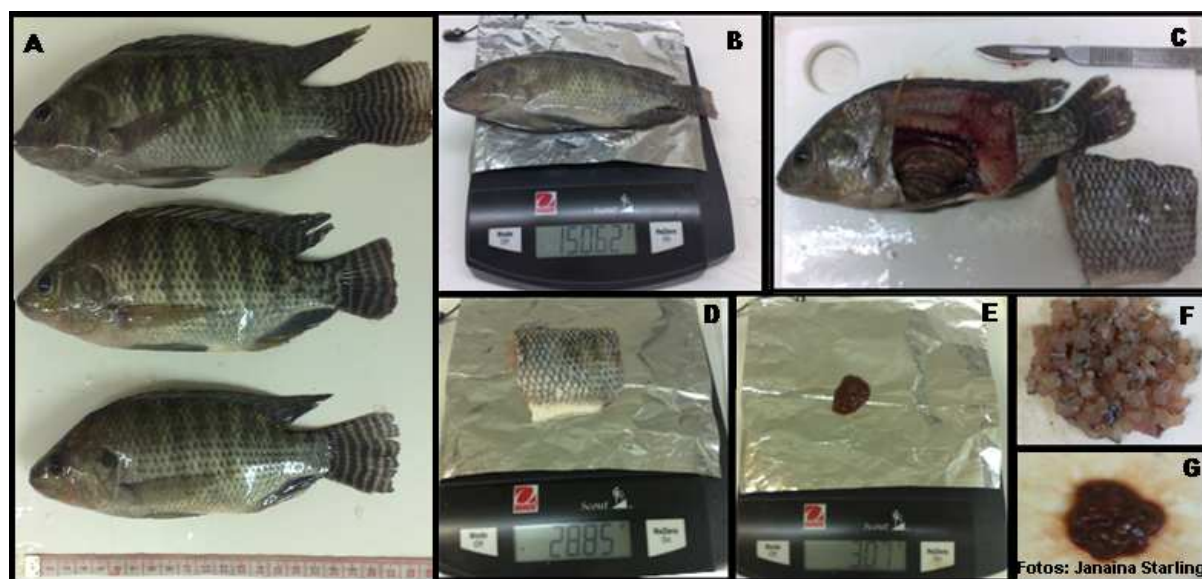
O início do procedimento de extração ocorreu com a pesagem dos tecidos, sendo a alíquota de músculo com pele mantida, mas previamente descamada (Figura 5). As amostras de tecido foram fatiadas em pequenas pedaços e maceradas em metanol 100% na proporção de 5mL/g por duas vezes sucessivas com intervalo de 24 horas. Em seguida, cada amostra foi submetida à filtração a vácuo, em membrana de fibra de vidro com 1,2  $\mu\text{m}$ . O extrato metanólico resultante foi submetido à secagem a vácuo em evaporador rotativo e ressuspenso em 50 mL em água deionizada.

Chorus & Bartram (1999), defendem que a extração com solvente metanol é a mais aconselhável porque representa uma boa eficiência na extração, além de permitir a rápida concentração da amostra por evaporação. Por outro lado a utilização de metanol 100% pode não ser tão eficiente na recuperação de microcistinas mais polares, mas a adição de uma pequena porcentagem de água supera esse empecilho (Lawton & Edwards, 2001).

Para análise de microcistinas foram adotadas as metodologias propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), contidas no guia "Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management", editado por Chorus & Bartram (1999).

Os extratos aquosos foram semipurificados em uma etapa de extração em fase sólida – solid phase extraction (SPE) – por meio de cartuchos strata C-18E (Phenomenex) previamente ativados com 50 mL de metanol 100% e,

posteriormente com 100 mL água deionizada. A amostra foi aplicada no cartucho strata C-18E (Phenomenex), o qual foi em seguida lavado com 50mL de água destilada, tendo então a amostra sido eluída com 100mL de metanol 100%.O extrato metanólico resultante da SPE foi submetido à secagem a vácuo em evaporador rotativo e o material foi ressuspensionado em 1,5 mL em água deionizada e armazenado em tubos do tipo *ependorf*.



**Figura 5:** (A) Biometria dos exemplares de tilápia. (B) Pesagem do peixe. (C) Incisão feita no filé para separação de amostra de músculo, já descamado. (D) Pesagem do tecido de músculo destinado a análise. (E) Pesagem do tecido de fígado destinado a análise. (F) Amostra de músculo separada e destinada a extração em metanol, cortada em pedaços pequenos. (G) Amostra de fígado separada destinada a extração em metanol, cortada em pedaços pequenos.

### 4.3- Coleta de água

No mesmo dia em que os peixes foram fornecidos pelos pescadores para análise laboratorial, uma amostra de 1 (um) litro de água da região onde os exemplares foram pescados foi coletada. Optou-se pela coleta de amostra de água superficial, pois é nesta camada onde encontra-se maior biomassa de *Microcystis aeruginosa*, espécie produtora de microcistina dotada de grande flutuabilidade. Essa amostra foi acondicionada em caixa térmica contendo gelo e encaminhada ao laboratório para análise de microcistina.



Para a extração de microcistina na amostra de água, esta foi primeiramente encaminhada ao disruptor de células - Ultra Sônico (Unique) - durante 10 minutos para causar a lise celular e a microcistina ficar livre. Em seguida a amostra foi filtrada em membrana composta por microfibras de vidro de (retenção nominal 0,8 a 8,0  $\mu\text{m}$  - Milipore) para a remoção do material particulado e, então, submetida à extração de fase sólida com cartuchos strata C-18E (Phenomenex), conforme procedimento aplicado aos extratos dos tecidos dos peixes.

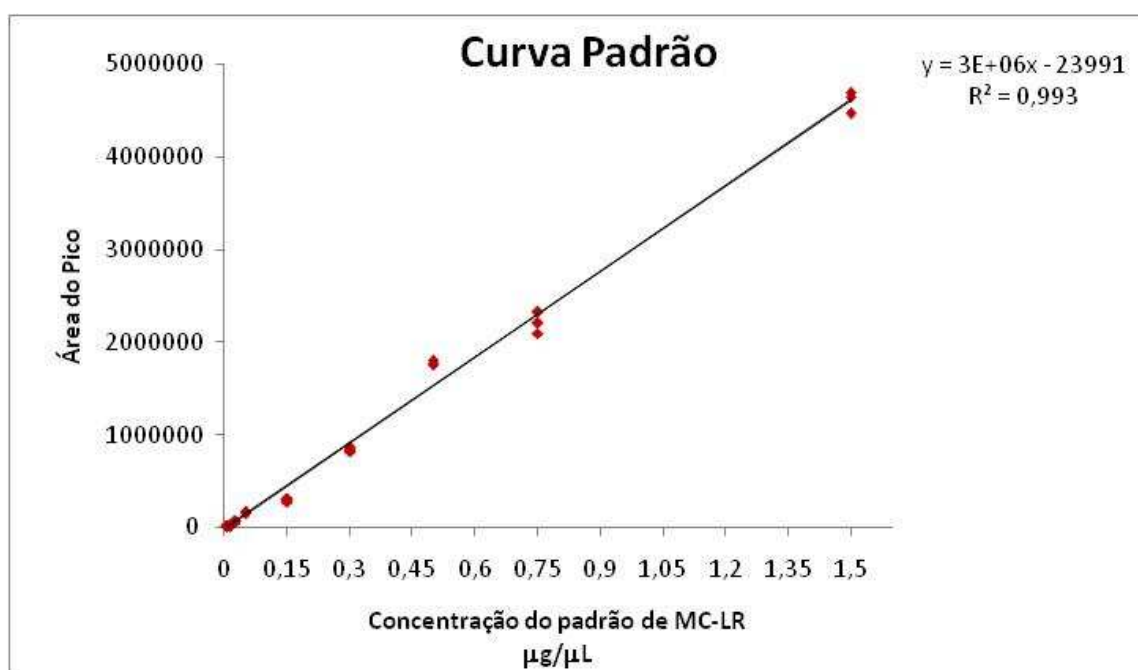
#### **4.4- Análise por High performance liquid chromatography - HPLC**

A identificação da toxina foi feita por high performance liquid chromatography (HPLC). Primeiramente, os tubos *ependorfs* contendo a amostra foram homogeneizados em vortex por 5 minutos, em seguida centrifugados a 10.000 rpm por 05 minutos e uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi retirada e destinada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por foto-diodo – PDA-HPLC (Shimadzu Série LC-10A) em coluna da marca Merck de fase reversa C-18 (5  $\mu\text{m}$ ). A cromatografia foi realizada sob condições isocráticas com fase móvel previamente filtrada em membrana filtrante de nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) composta de 20mM formiato de amônio e acetonitrila (7:3), pH 5,0  $\pm$  0,2 por 30 minutos. O volume de injeção foi de 100  $\mu\text{L}$ , com fluxo de 1 mL/min, a detecção no UV foi estabelecida em 238 nm e o espectro de absorção de cada fração cromatográfica foi analisado na variação de 200-300 nm (Krishnamurthy 1986, com adaptações) .

A identificação da toxina presente nas amostras tornou-se possível após a comparação da fração cromatográfica com o padrão de microcistina-LR (Sigma, St Louis), observando os seguintes aspectos: o tempo de retenção no sistema de cromatografia e o índice de similaridade dos espectrogramas da amostra ao padrão de microcistina-LR na faixa de absorbância de 200 a 300 nm.

A quantificação do total acumulado de microcistinas nos tecidos foi realizada por meio de curva padrão, relacionando a concentração do padrão de microcistina-LR (Sigma, St Louis) e a área do fração cromatográfica no sistema de cromatografia.

Para a construção de uma curva padrão de microcistina com vistas a quantificação nos extratos analisados foram injetadas em triplicada 9 diferentes concentrações de microcistina-LR (Sigma, St Louis): 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,15; 0,3; 0,5; 0,75; 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 6).



**Figura 6:** Curva padrão da microcistina-LR (Sigma, St. Louis) construída a partir da injeção em triplicata de 9 concentrações diferentes: 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,15; 0,3; 0,5; 0,75; e 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  utilizando-se o "loop" de 20 $\mu\text{L}$ ; equação da reta:  $Y = (3 \cdot 10^6)X - 23991$ ;  $R^2 = 0,993$ .

As amostras que apresentaram frações no tempo de retenção entre 4-8 minutos e com valores de  $I_s$  entre 95 e 100 foram consideradas positivas quanto à presença de microcistina. Para calcular a concentração dessa cianotoxina nas amostras, foi utilizada a curva padrão que por meio de regressão linear ( $R^2 = 0,993$ ) deu origem a equação da reta:

$$Y = (3 * 106)X - 23991$$

Onde:

Y→ área da fração cromatográfica no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

X→ concentração a ser determinada em µg/µL.

O volume total de aplicação no HPLC das amostras referentes aos tecidos de músculo, fígado e amostras de água coletada em frente à ETE sul foi de 100µL, enquanto o volume aplicação de concentrações conhecidas de padrão de MC-LR para construção da curva padrão foi de 20 µL. Para que fosse efetuado o correto cálculo de concentração de microcistina nas amostras, com  $I_s$  dentro da faixa acima citada, o valor final de concentração determinado pela equação da reta foi dividido por cinco, pois o volume de amostra analisado corresponde cinco vezes mais que o volume no qual a curva padrão foi produzida.

#### **4.5- Análises de Espectrometria de massa**

Algumas amostras que apresentaram frações similares à microcistina-LR, similaridades estas visualizadas através do com o espectrograma de absorção de UV (200-300nm) na análise por PDA-HPLC, foram recromatografadas, secas a vácuo no sistema de “speedvac” e posteriormente encaminhadas para análise em sistema de espectrometria de massa, para confirmação.

Para realização de análise, a fração selecionada foi ressuspensa em água nanopura. Uma alíquota de 1 µL desse conteúdo foi misturada a uma solução de matriz saturada constituída por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvida em acetonitrila/água/ácido trifluoroacético 3% na proporção de 2,5:2:0,5. Essa mistura foi depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm e seca em temperatura ambiente e o sistema de MALDI TOF foi utilizado.

A massa molecular da fração cromatográfica referentes à microcistina-LR foi determinada utilizando um espectrômetro de massa MALDI TOF ReFlex IV (Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletido, positivo, Laser em 50-70%, 50 shots. Os espectrogramas foram obtidos na faixa de massa 700 a 1400 Da.

#### **4.6- Análise por Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Algumas amostras de músculo e de água que confirmaram a presença de MCs por HPLC, foram selecionadas para a detecção de microcistina e nodularinas através de ensaio imunocompetitivo, no qual foi utilizado kit ELISA (Abraxis®). Como a destinação original do kit é para análises de água, fez-se necessário uma adaptação do método para sua utilização no presente estudo.

A realização do ensaio seguiu as orientações do fabricante, tendo primeiramente a placa e os reagentes sido ambientados em temperatura ambiente. Logo em seguida, foi adicionado aos poços o volume de 100 µL de solução controle (0,75 ppb); padrões 0 (0,0 ppb), 1(0,15 ppb), 2 ( 0,40 ppb), 3 (1,0 ppb), 4 (2,0 ppb), 5 (5,0 ppb); e amostras. Com auxílio de uma micropipeta multicanal, foi adicionado o volume de 50 µL de solução conjugada (microcystins DM-HRP conjugate) e 50 µL de solução anticorpo (microcystins DM antibody solution). Ao final, a placa foi coberta com parafilme, homogeneizada e ficou incubada por 90 minutos em temperatura ambiente. Seguindo o protocolo, após o período de incubação, o conteúdo da placa foi vertido para descarte na pia do laboratório e os poços foram lavados com solução de lavagem (wash solution 1x) por três vezes consecutivas e o resíduo dessa solução foi removido batendo a placa gentilmente sobre uma pilha de papel toalha. Após a lavagem dos poços, foi adicionado a cada poço o volume de 150 µL de solução de cor (color solution) e a placa foi novamente coberta com parafilme e incubada entre 20-25 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionada uma solução destinada a parar a reação (stop solution). Decorridos no máximo 15 minutos, foi feita a leitura da placa em absorvância de 450 nm.

A análise por ELISA consiste em uma competição imuno específica, na qual o princípio do teste é baseado no reconhecimento de microcistinas, nodularinas e seus congêneres por anticorpos específicos.

A superfície dos poços da placa contém um número limitado de sítios de ligação de anticorpos específicos e quando presentes na amostra, microcistinas, nodularinas e seus congêneres, competem por ligação nesses sítios com o análogo padrão. Após uma etapa de lavagem e adição da solução de substrato, é gerado um sinal de cor. Nos imunoenaios competitivos a intensidade da cor azul é inversamente proporcional à concentração da toxina presente na amostra. A faixa de detecção do teste é de 0,15–5 ppb ou ng/mL.

Para proceder ao cálculo da concentração de toxina é necessário calcular a média da absorbância de cada um dos padrões. Em seguida, foi calculado %B/B<sub>0</sub> para cada padrão dividindo o valor da média da absorbância pela média de absorbância do padrão zero.

$$\%B = \frac{\text{média de absorbância do padrão ou amostra}}{\text{Média da absorbância do padrão zero}} \times 100$$

Foi construída uma curva padrão plotando os valores de %B/B<sub>0</sub> de cada padrão em um linear vertical (y) versus a concentração de microcistinas horizontal logarítmica correspondente no eixo (x). Os resultados de B/B<sub>0</sub>% para os controles e as amostras serão então os níveis de rendimento em ppb de microcistinas por interpolação através da curva padrão.

#### **4.7- Parâmetros ambientais**

A Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal é responsável pelo monitoramento da qualidade da água do lago Paranoá. Para tanto, a empresa implantou o Programa Limnológico, desde 1976, e o Programa de Balneabilidade, desde 1974, que realizam análises com frequência mensal e semanal, respectivamente, de diversas variáveis limnológicas.

A CAESB disponibilizou dados referentes àqueles monitoramentos realizados no ano de 2008 e no ano de 2009 até o mês de junho, no ponto de coleta em frente à ETE sul no braço do Riacho Fundo do lago Paranoá.

O monitoramento dos parâmetros limnológicos teve como objetivo caracterizar a qualidade da água da área de estudo, especialmente no que se refere ao excesso de nutrientes como fator diretamente associado ao crescimento de florações de algas tóxicas e indicador de qualidade ambiental.

Foram eles:

- Físicos (transparência);
- Químicos (fósforo total) e;
- Biológicos (fitoplâncton e clorofila-a).

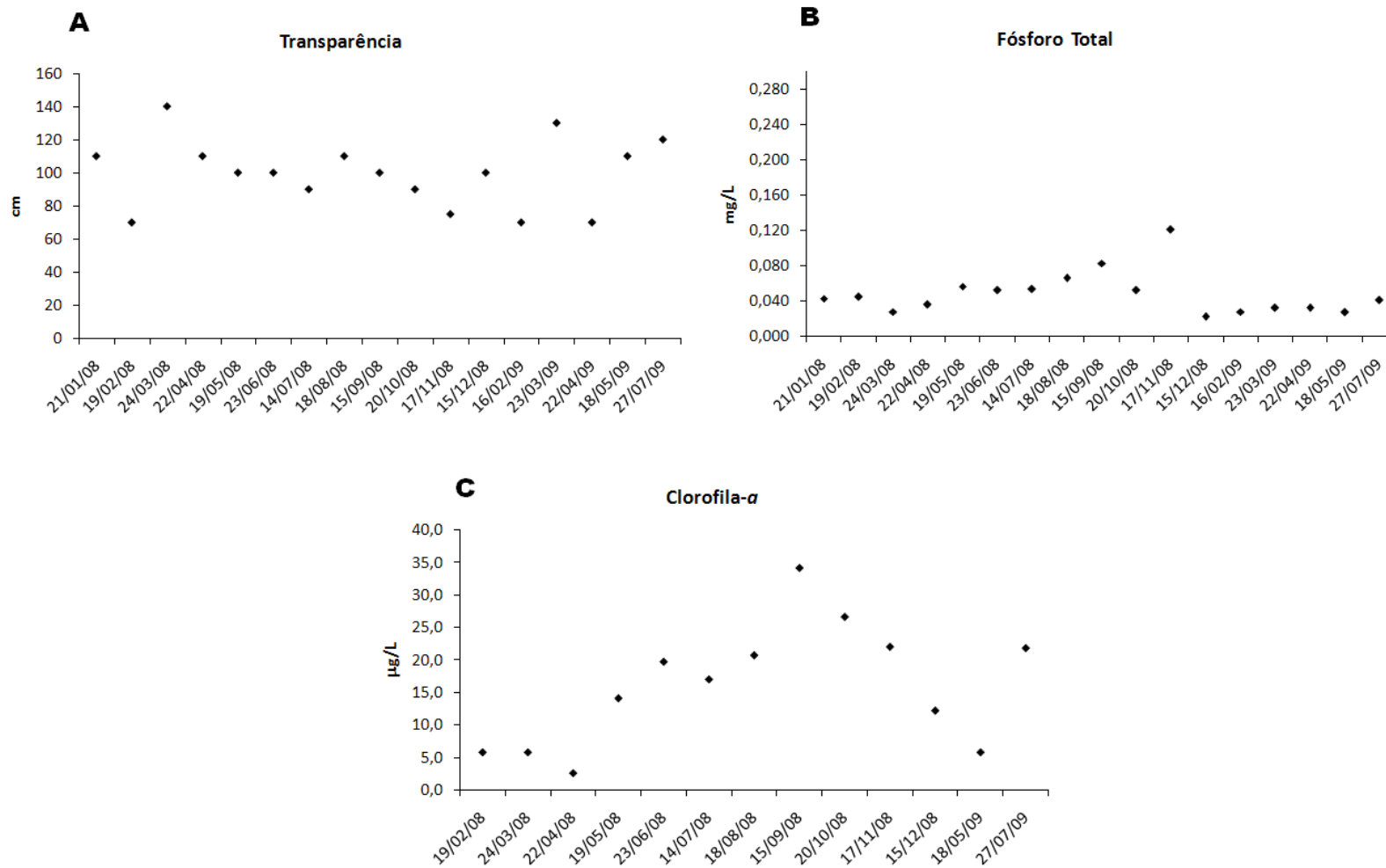
## 5- Resultados

### 5.1- Qualidade da água do Braço do Riacho Fundo – Lago Paranoá

Com base nas informações provenientes do Programa de Monitoramento Limnológico realizado pela CAESB, faz-se possível avaliar a qualidade da água do início do Braço do Riacho Fundo, a área de captura dos peixes no presente estudo e aquela de maior concentração de atividade pesqueira no Lago Paranoá (Ribeiro *et al.*, 2001; Starling *et al.*, 2000).

Dados referentes ao monitoramento mensal realizado nos anos de 2008 e 2009 até o mês de julho, no ponto coleta localizado nas imediações da Estação de Tratamento de Esgotos Sul (ETE Sul), permitem também caracterizar o atual estado trófico desta região, sempre tida como a mais eutrófica do Lago Paranoá no passado (Altafin *et al.*, 1995; Cavalcanti *et al.*, 1997). Segundo a Figura 7, os valores de transparência da água (variando de 70 a 140 cm, com média de  $99,7 \pm 20,65$  cm), fósforo total (oscilando de 0,022 a 0,121 mg/L, com média de  $0,048 \pm 0,02$  mg/L) e clorofila-a (2,7 a 34,2  $\mu\text{g/L}$ , com média de  $16,1 \pm 9,3$   $\mu\text{g/L}$ ) classificam o Braço do Riacho Fundo como EUTRÓFICO, segundo critério de Vollenweider & Kerekes (1981).

A análise destes dados limnológicos evidencia que, muito embora o Lago Paranoá tenha experimentado um amplo processo de despoluição com a redução de 70% do aporte externo de nutrientes e tenha mais de 95% do espelho d'água balneável, graças ao tratamento terciário dos esgotos domésticos na sua bacia de drenagem entre 1993 e 1994 (Brunett *et al.*, 2001), permanece ainda um foco de eutrofização no Braço do Riacho Fundo.



**Figura 7:** Monitoramento realizado pelo Programa Limnológico da CAESB no lago Paranoá em ponto de coleta de água localizado na ETE sul no período de janeiro de 2008 a julho de 2009. **(A)** Resultados do parâmetro “transparência” (cm). **(B)** Resultados do parâmetro “fósforo total” (mg/L). **(C)** Resultados do parâmetro “clorofila-a” (µg/L).



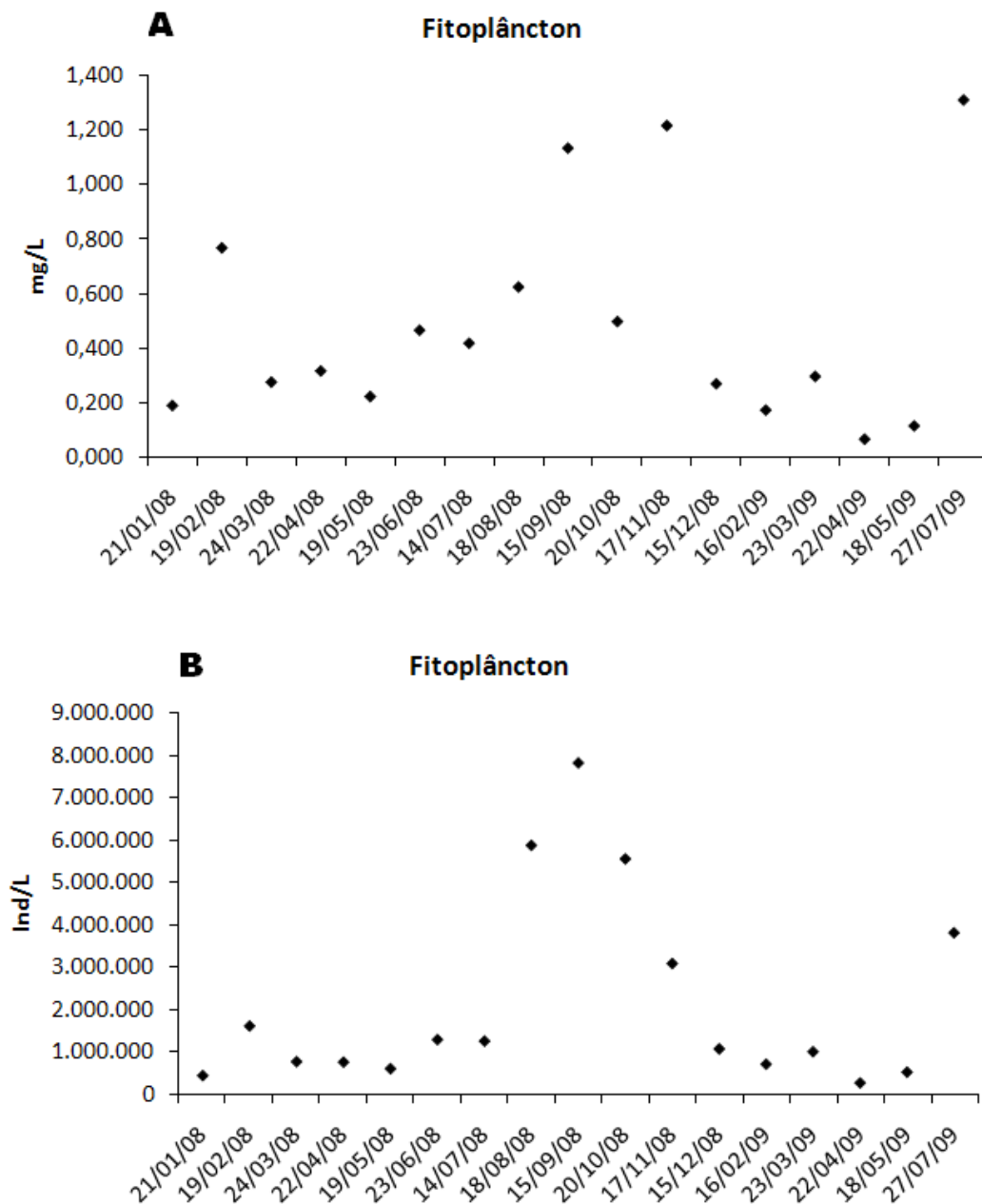
Apesar disso, o principal sintoma da eutrofização representado pela floração maciça de cianobactérias, tem se mostrado de ocorrência esporádica e pouco pronunciada no reservatório nos últimos 10 anos. Apesar de não terem sido registradas florações no monitoramento mensal da CAESB em todos os braços do lago Paranoá desde o ano de 2000, Pires Jr (comunicação pessoal) relata ter realizado coleta de florações nos anos de 2004 a 2006 no braço do Bananal (dados não publicados).

A drástica perda de dominância das cianobactérias dos gêneros *Microcystis* e *Cylindrospermopsis*, substituídas por algas clorofíceas, fato este ocorrido a partir de 1998-1999 (Mattos & Starling, 2001, Philomeno, 2007), persiste em todo o espelho d'água do reservatório até os dias de hoje (CAESB, dados não publicados). No entanto, crescimentos localizados de cianobactérias em pontos marginais de baixa renovação da água, especialmente próximos a banco de macrófitas flutuantes e fontes pontuais de nutrientes, como o braço do riacho Fundo, podem ainda ocorrer (CAESB, dados não publicados).

Uma evidência adicional neste sentido vem do quantitativo de algicida sulfato de cobre empregado no Lago Paranoá para combate às florações de *Microcystis aeruginosa*, cujo montante total que era usualmente de 7.000 kg/ano no início da década de 1990 (antes da despoluição), passou a 3.000 kg/ano na segunda metade dos anos 90 (período de transição e início do processo de oligotrofização), reduziu-se a 2.000 kg/ano entre 2000 e 2005 e não mais foi aplicado desde 2005 até os dias de hoje (CAESB, dados não publicados).

A drástica redução da biomassa algal em todo Lago Paranoá fica bem ilustrada pelos valores médios de clorofila-*a*, que passaram de 78 µg/L em 1992 para valores inferiores a 10 µg/L registrados a partir de 1999 até 2009 (Burnett *et al.*, 2001; Angelini *et al.*, 2008). Também a biomassa do fitoplâncton expressa como contagem total das microalgas, passou de 16 mg/L no período anterior a despoluição (entre 1980 e 1990) para os atuais  $0,491 \pm 0,393$  mg/L, no período de interesse do presente estudo (de 2008 a meados de 2009), segundo monitoramento da CAESB (dados não publicados).

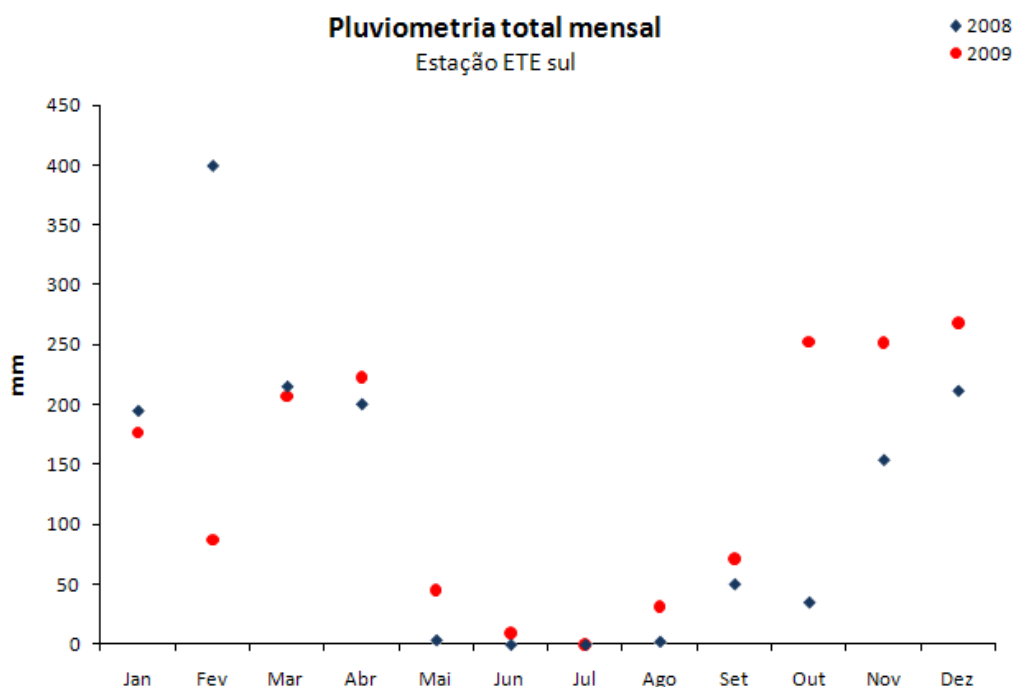
A evolução da biomassa do fitoplâncton no início do Braço do Riacho Fundo durante o período de amostragem do presente estudo, expressa tanto como clorofila-a quanto como quantificação das microalgas em microscópio e densidade quantificada por espectrofotometria, é mostrada na Figuras 7c e 8.



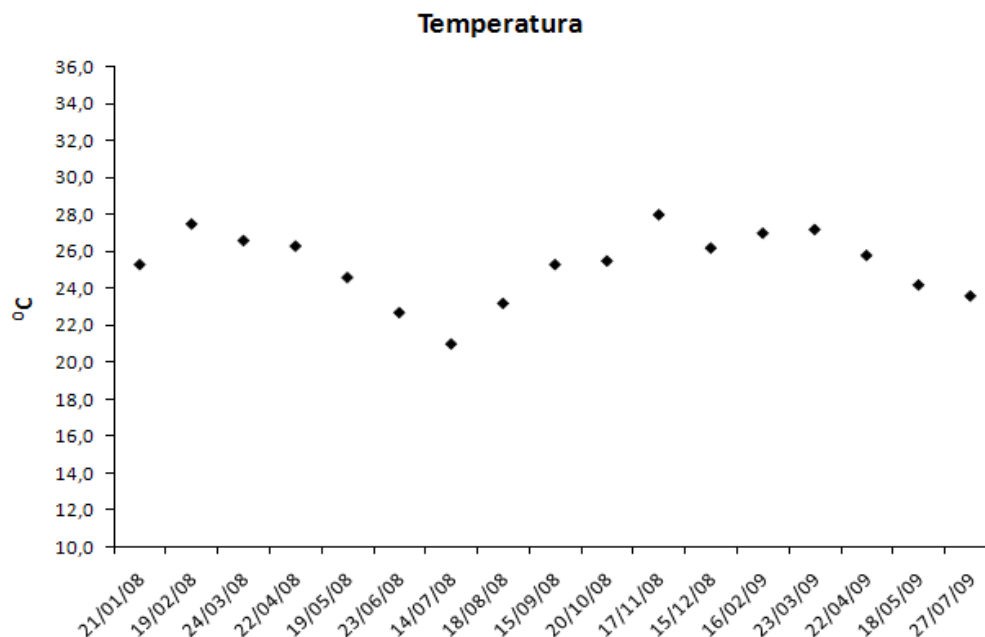
**Figura 8:** Monitoramento realizado pelo Programa Limnológico da CAESB no lago Paranoá em ponto de coleta de água localizado em ETE sul no período de janeiro de 2008 a julho de 2009. **(A)** Resultado do parâmetro “fitoplâncton” (mg/L). **(B)** Resultado do parâmetro “fitoplâncton” (Ind/L).

A conversão da contagem do fitoplâncton de ind/L em mg/L foi feita com base nas estimativas de biovolume das microalgas e teve por objetivo corrigir discrepâncias de tamanho existentes entre indivíduos das diferentes espécies. Nos resultados referentes ao dia 17/11/2009 existe a indicação de que a quantificação em mg/L pode ter sido superestimada, ou até mesmo conter algum erro de leitura, fato este ilustrativo do benefício de aplicação de mais de uma técnica na verificação de um parâmetro.

Pode-se observar um nítido comportamento sazonal de incremento da biomassa algal no decorrer da estação seca, a partir do mês de agosto até dezembro, como resultado da oferta de nutrientes a zona eufótica devido à circulação anual da coluna d'água entre maio e julho (Figura 8). O padrão sazonal de precipitação, bem como a dinâmica de variação anual da temperatura da água na área de estudo (Figura 9 e 10) ilustram tanto as estações climáticas bem demarcadas quanto o padrão de estímulo à circulação pelo esfriamento da água no início do inverno.



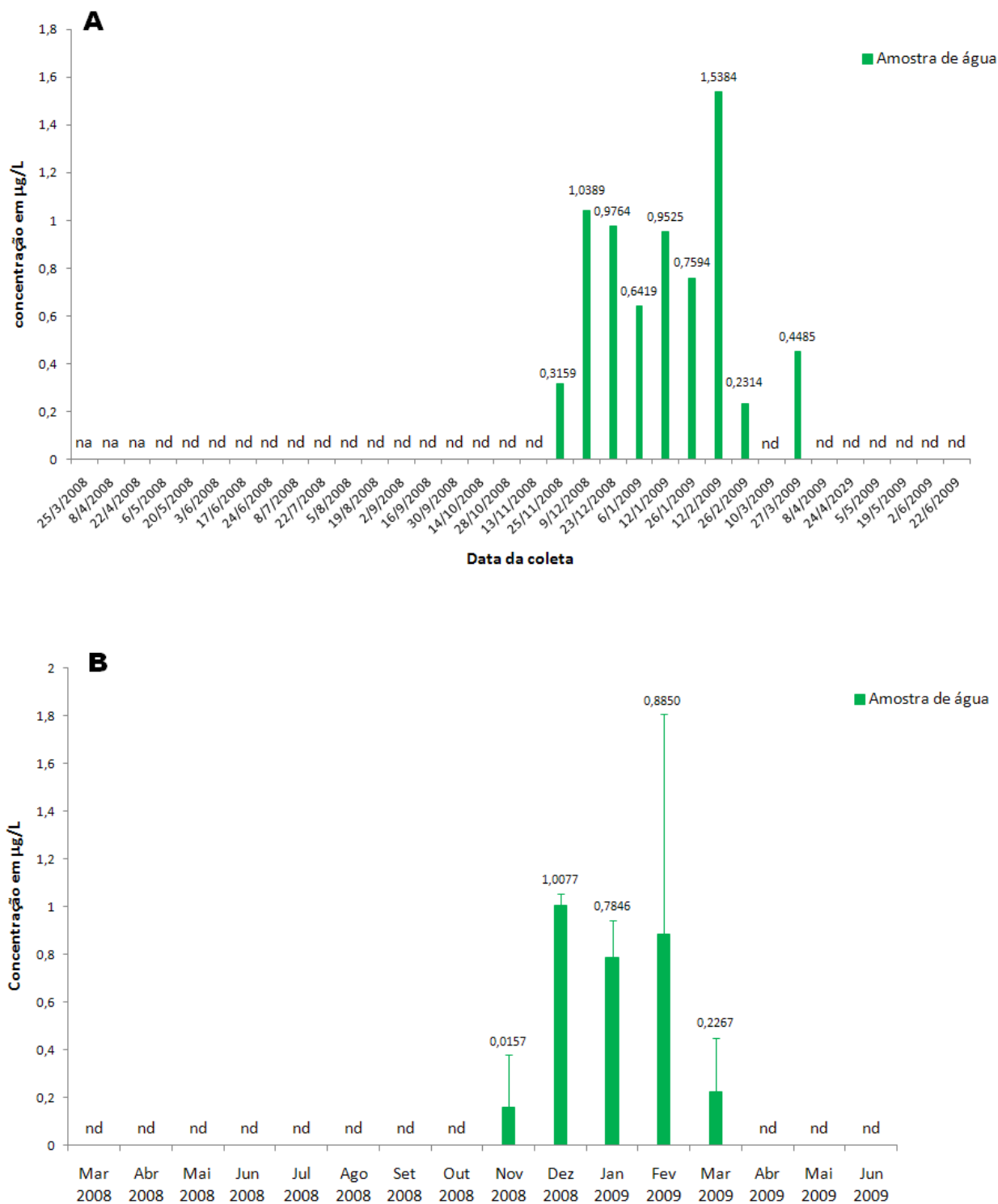
**Figura 9:** Monitoramento pluviométrico realizado nos anos de 2008 e 2009 na estação pluviométrica instalada na ETE sul (15° 59' 39"S, 47° 54' 40"WGr), referente a pluviosidade mensal (mm). Fonte: CAESB.



**Figura 10:** Monitoramento realizado pelo Programa Limnológico da CAESB no lago Paranoá em ponto de coleta de água localizado na ETE sul no período de janeiro de 2008 a julho de 2009. Temperatura da água superficial (°C).

Tendo em vista o conhecimento da dinâmica do fitoplâncton e a sua biomassa na área de estudo durante o período de amostragem do presente estudo como balizador da expectativa do potencial de contaminação da biota por cianotoxinas, foi realizada a amostragem de água superficial para verificação da concentração de microcistina na água.

Em 70% das amostras superficiais de água coletadas nas imediações da ETE Sul, não foi possível detectar a presença de microcistina e naquelas que apresentaram resultado positivo essa concentração variou entre 0,2314 µg/L a 1,5384 µg/L (Figura 11). Esse maior valor de microcistina foi detectado no auge da Estação Chuvosa (amostra do dia 12/02/2009), ou seja, aproximadamente três meses após a fase de maior crescimento do fitoplâncton (Figura 8). Não foi detectada a presença de microcistina nos meses de março a outubro de 2008 e nos meses de abril a junho de 2009. O intervalo de detecção de microcistina ocorreu entre novembro de 2008 e março de 2009, coincidindo com o final da Estação Seca e início da Estação Chuvosa, sendo que o mês que apresentou a maior média de concentração, foi dezembro de 2008, com  $1,007 \pm 0,044$  µg/L.

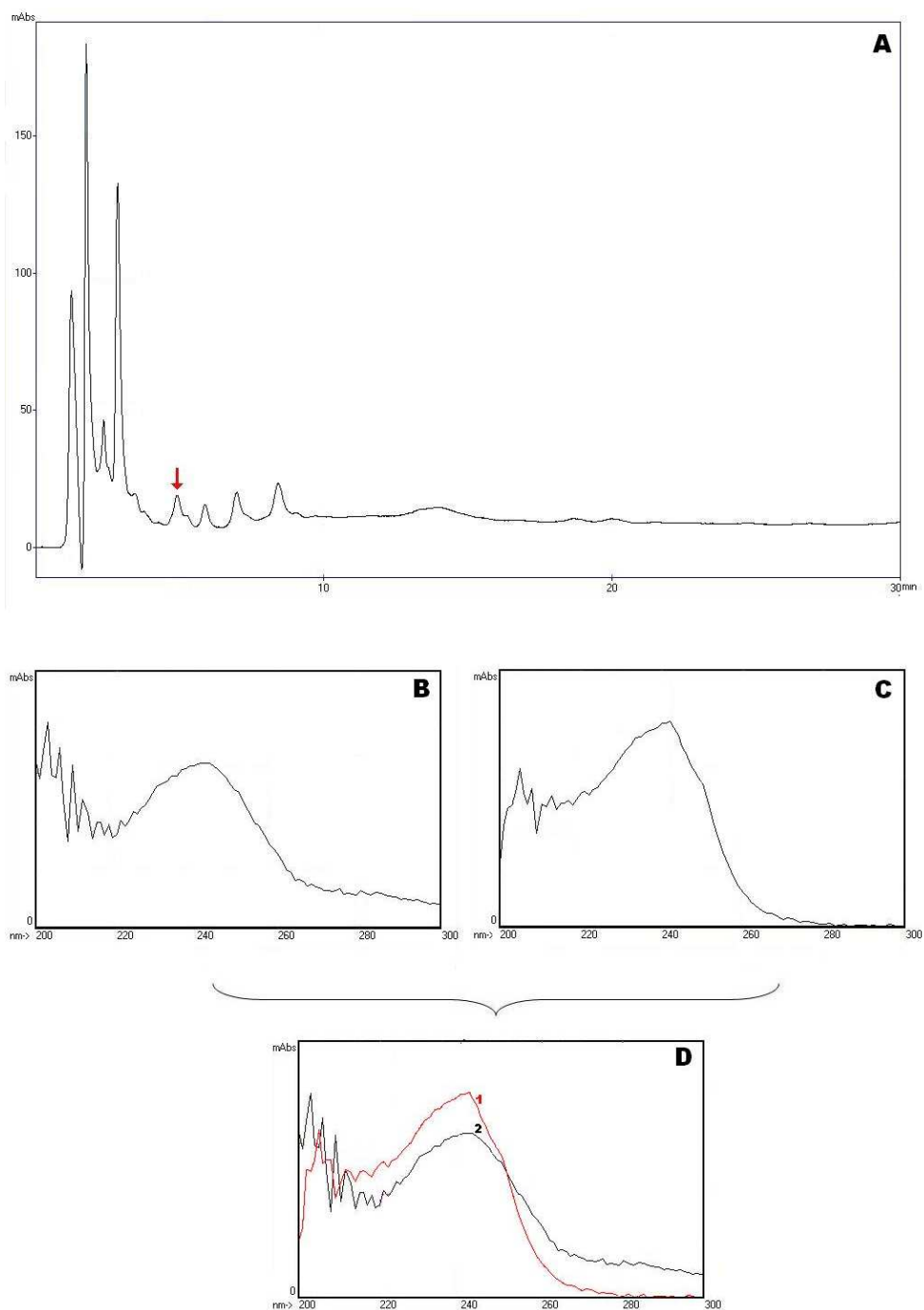


**Figura 11: (A)** Concentração de microcistina detectada em amostras de água coletadas em frente à ETE sul dentro do período de monitoramento de março de 2008 a junho de 2009. **(B)** Média de concentração mensal em amostras de água coletadas em frente à ETE sul dentro do período de monitoramento de março de 2008 a junho de 2009.

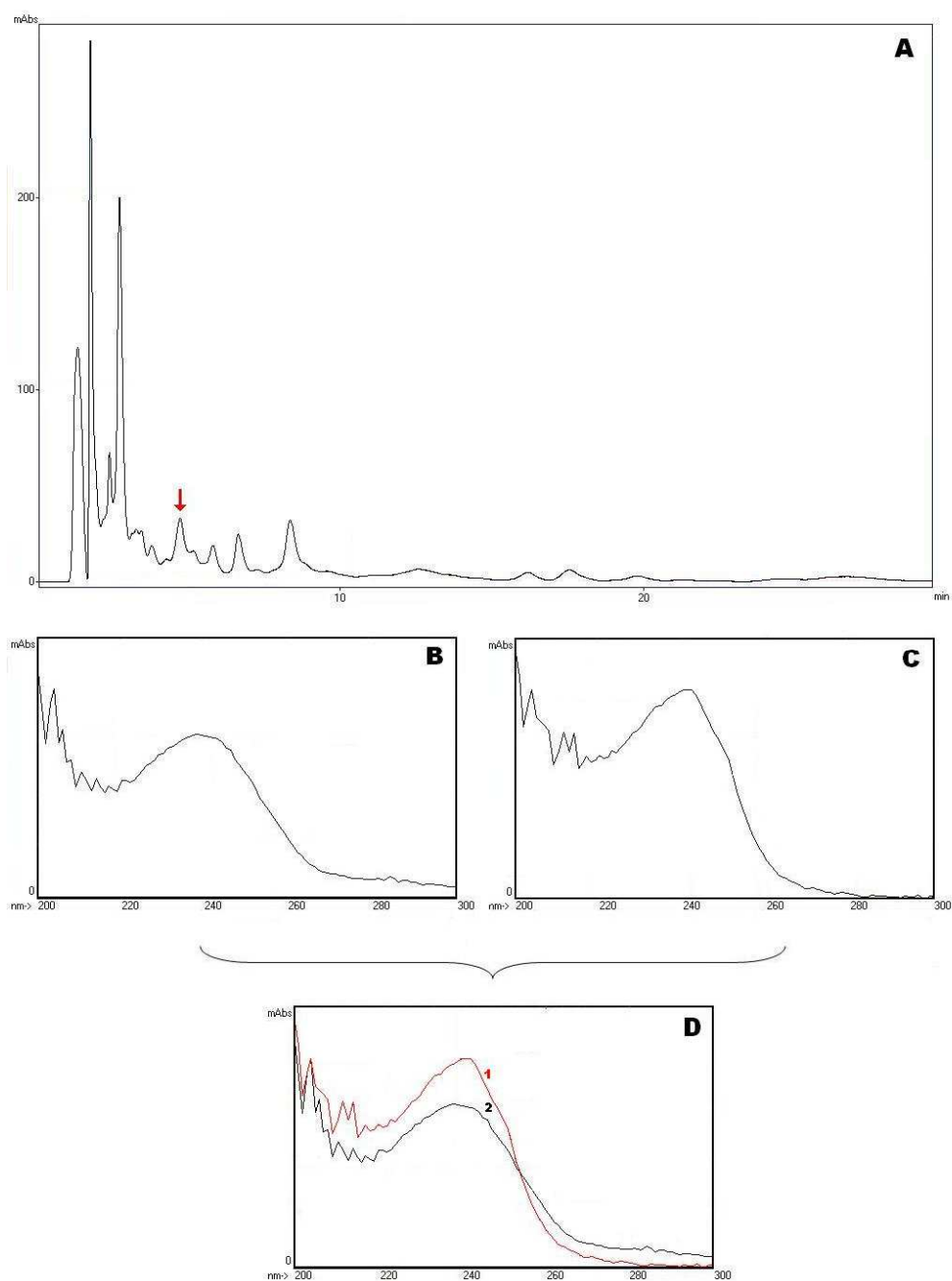
## 5.2- Análises dos tecidos dos peixes por HPLC

Um total de 102 exemplares de *Oreochromis niloticus*, resultado de 34 campanhas de coleta ocorridas no período de março de 2008 a junho de 2009, foi analisado no laboratório para a investigação de acúmulo de microcistina nos tecidos hepático e muscular. No laboratório, esses animais, previamente identificados individualmente foram submetidos à biometria (medida do comprimento total em cm e pesagem do conteúdo total em g) e à pesagem do conteúdo retirado da musculatura e totalidade do fígado. Os peixes analisados tiveram uma grande variação de tamanho, com comprimento total oscilando de 6 a 29 cm, com média de  $19,16 \pm 3,42$  cm, e peso total compreendido entre 71 e 437 g, com média de  $140,99 \pm 63,95$  g. As amostras de filé (musculatura) e conteúdo total de fígado retirado de cada exemplar variaram de 9,2 a 69,78 g (média de  $22,33 \pm 10,24$  g), e de 1 a 7 g (média de  $1,95 \pm 1,05$  g), respectivamente.

A fim de verificar e quantificar a presença de microcistina-LR nas amostras analisadas, o primeiro aspecto que foi considerado foi o tempo de retenção ( $T_r$ ) das frações cromatográficas que mantiveram-se na faixa de 4 a 8 minutos de corrida, pois corresponde a faixa de tempo de retenção do padrão da microcistina-LR quando aplicado ao sistema de cromatografia. Em seguida, os espectrogramas de ultravioleta (200-300 nm) obtidos de cada fração cromatográfica nas amostras foram comparados ao espectrograma do padrão de microcistina-LR e a partir dessa comparação foi gerado um índice de similaridade ( $I_s$ ), conforme exemplificado nas Figuras 12,13 e 14.

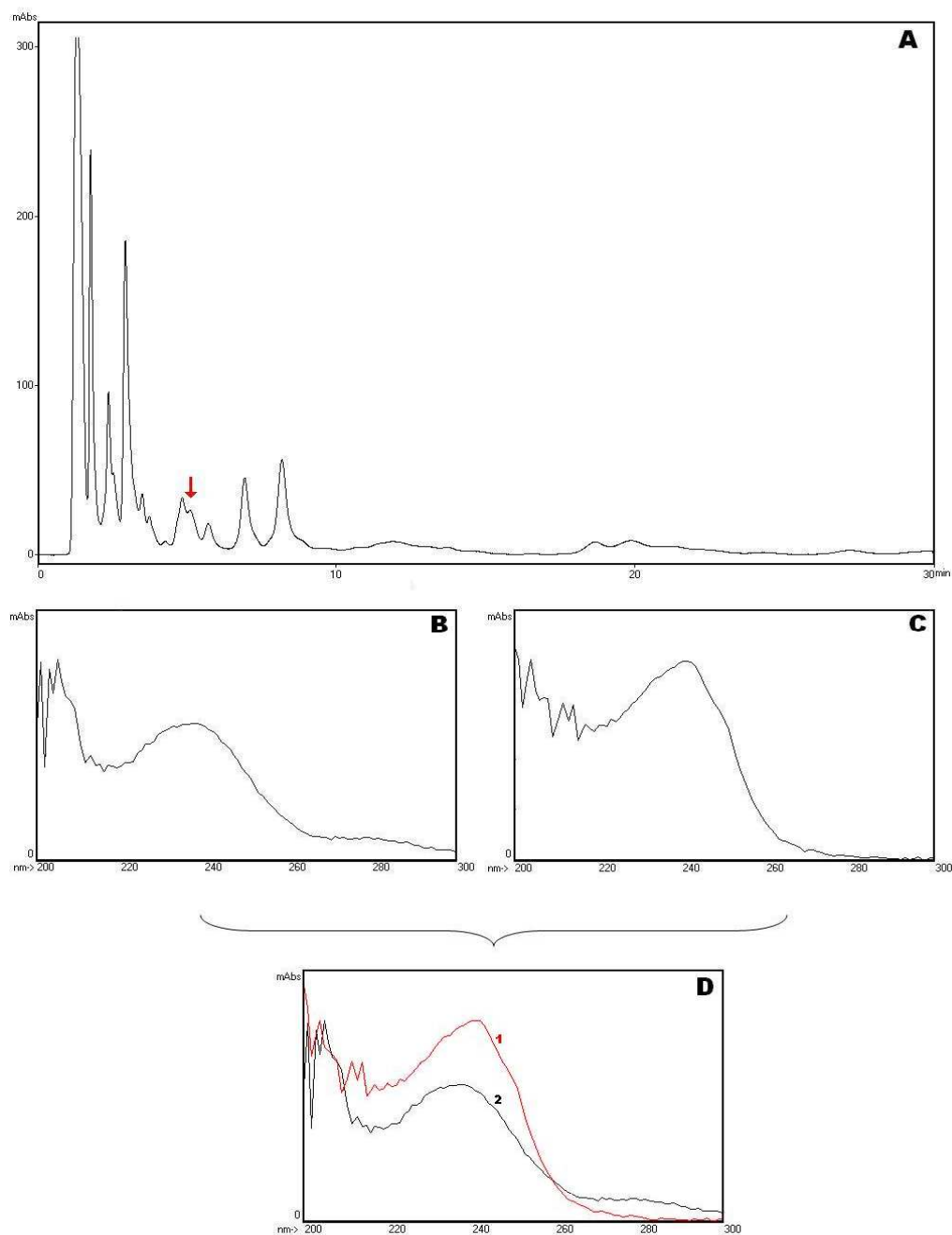


**Figura 12:** (A) Cromatografia da amostra da água coletada em frente à ETE sul no dia 10/03/2009. Indicação pela seta da fração cromatográfica com tempo de retenção de 4.90 minutos. (B) Espectrograma da fração cromatográfica da amostra com tempo de retenção de 4.90 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. (C) Espectrograma da fração cromatográfica do padrão de MC-LR com tempo de retenção de 6.20 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. (D) Comparação dos espectrogramas do padrão de MC-LR (1) e da amostra (2) demonstrando  $I_s$  de 96.



**Figura 13:** (A) Cromatografia da amostra 80 de fígado coletado no dia 03/10/2009. Indicação pela seta da fração cromatográfica com tempo de retenção de 4.68 minutos. (B) Espectrograma da fração cromatográfica da amostra com tempo de retenção de 4.68 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. (C) Espectrograma da fração cromatográfica do padrão de MC-LR com tempo de retenção de 6.31 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. (D) Comparação dos espectrogramas do padrão de MC-LR (1) e da amostra (2) demonstrando  $I_s$  de 99.





**Figura 14:** (A) Cromatografia da amostra 81 de músculo coletado no dia 03/10/2009. Indicação pela seta da fração cromatográfica com tempo de retenção de 5.07 minutos. (B) Espectrograma da fração cromatográfica da amostra com tempo de retenção de 5.07 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. (C) Espectrograma da fração cromatográfica do padrão de MC-LR com tempo de retenção de 6.23 minutos com detecção UV em 238nm avaliado na variação de 200-300nm. (D) Comparação dos espectrogramas do padrão de MC-LR (1) e da amostra (2) demonstrando  $I_s$  de 97.

Nas análises dos fígados no universo amostral de 102 exemplares de tilápia, em 61% das amostras não foi detectada a presença de microcistina e no restante das amostras (39%) a concentração variou de 0,0326 a 5,5549  $\mu\text{g/g}$  (Figura 15). O maior valor de microcistina em fígado ocorreu no final da Estação Seca (amostra 51, do dia 28/10/08), sendo que nos outros dois exemplares coletados no mesmo dia não foi detectada a presença de microcistina nesse tecido.

Durante o monitoramento realizado, compreendendo 16 (dezesesseis) meses de amostragem, foi confirmada a presença de microcistina em 9 (nove) desses meses nas amostras de fígado, a saber, junho, julho, outubro, novembro, dezembro do ano de 2008 e janeiro, fevereiro, março e abril de 2009. A maior média de concentração de microcistina em fígados ocorreu no mês de outubro de 2008 e foi de  $0,9258 \pm 2,2678 \mu\text{g/g}$  (Figura 17).

Em referência a análise de tecido muscular, não foi detectada a presença de microcistina em cerca de 70% dos extratos analisados. Nos casos onde foi confirmada a bioacumulação dessa cianotoxina, a sua concentração variou de  $0,0087\mu\text{g/g}$  a  $0,1803\mu\text{g/g}$  (Figura 16), sendo esta maior concentração em músculo detectada em meados da Estação Seca (amostra 25 do dia 08/07/2008).

A presença de microcistina em amostras de músculo foi confirmada em 10 (dez) meses: junho, julho, outubro, novembro, dezembro do ano de 2008 e janeiro, fevereiro, março, abril e maio de 2009. O maior valor de concentração média em músculos foi de  $0,0569 \pm 0,0112 \mu\text{g/g}$  e ocorreu no mês de dezembro de 2008 (Figura 17).

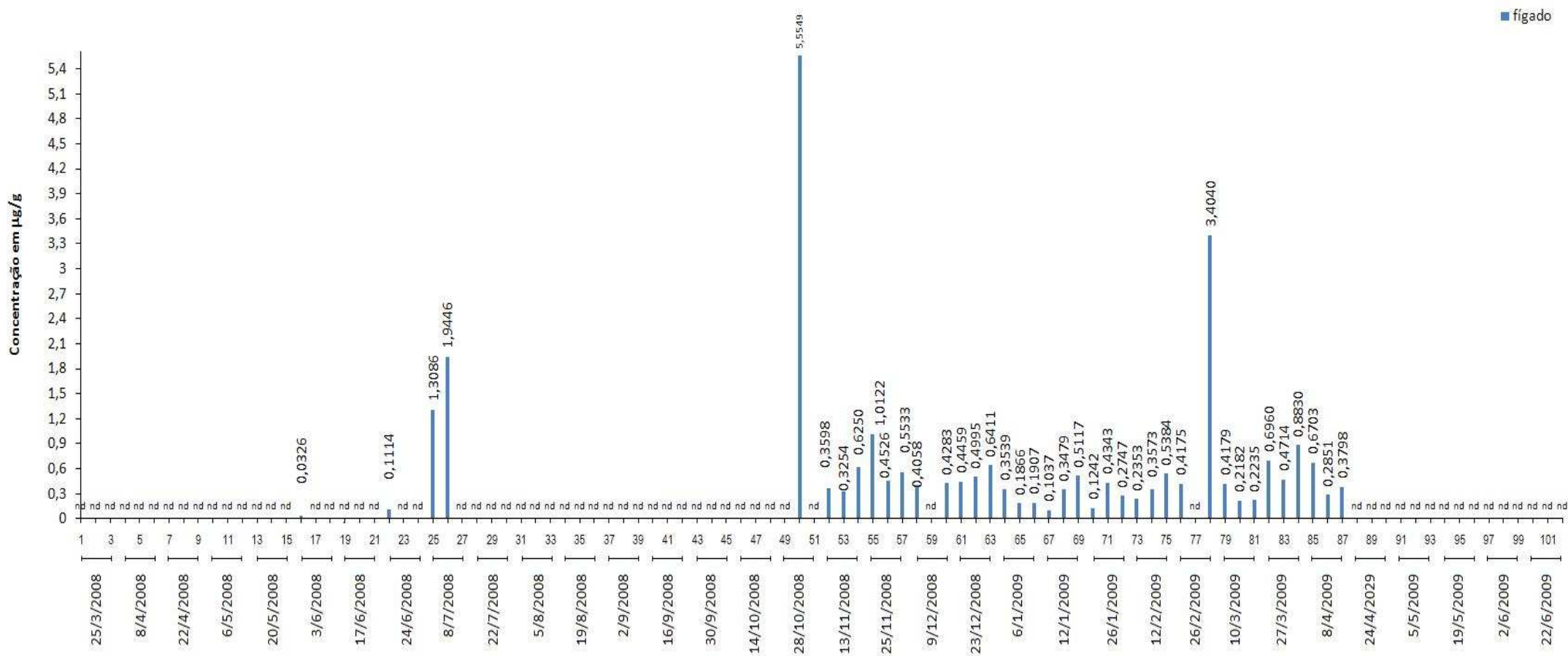
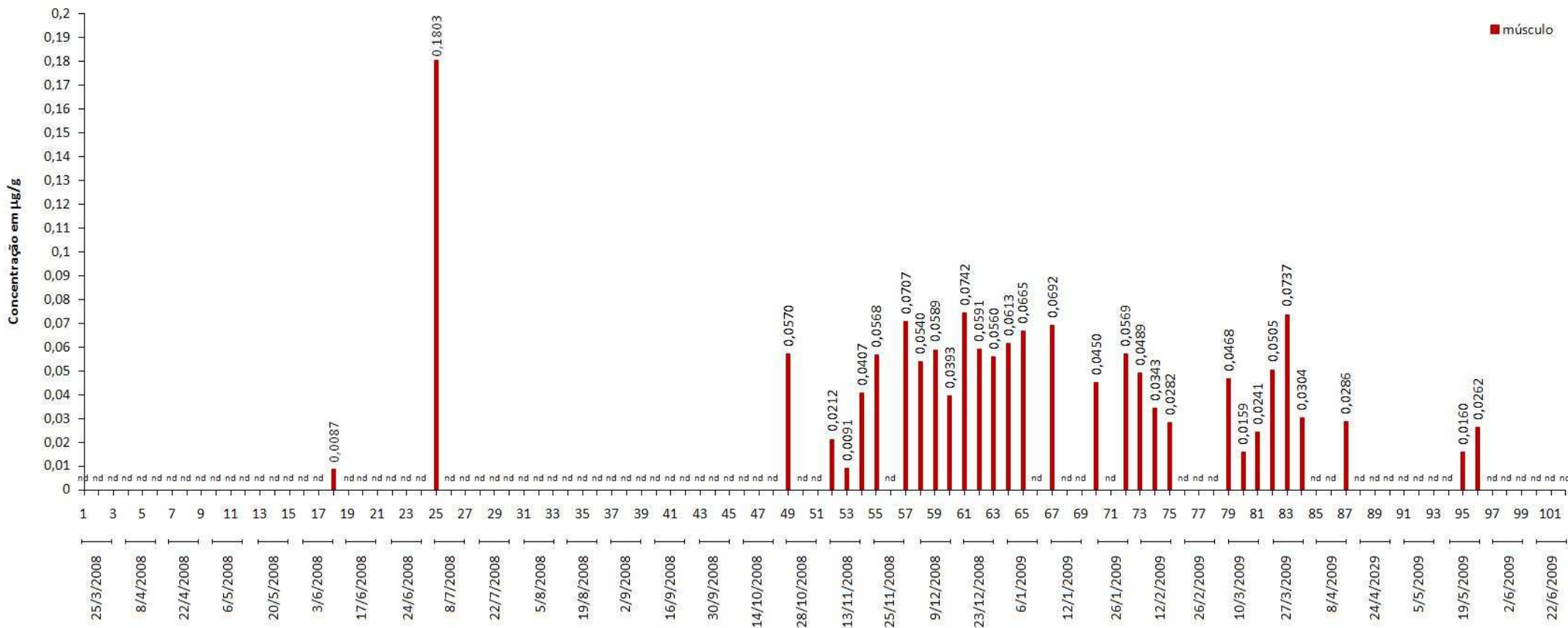
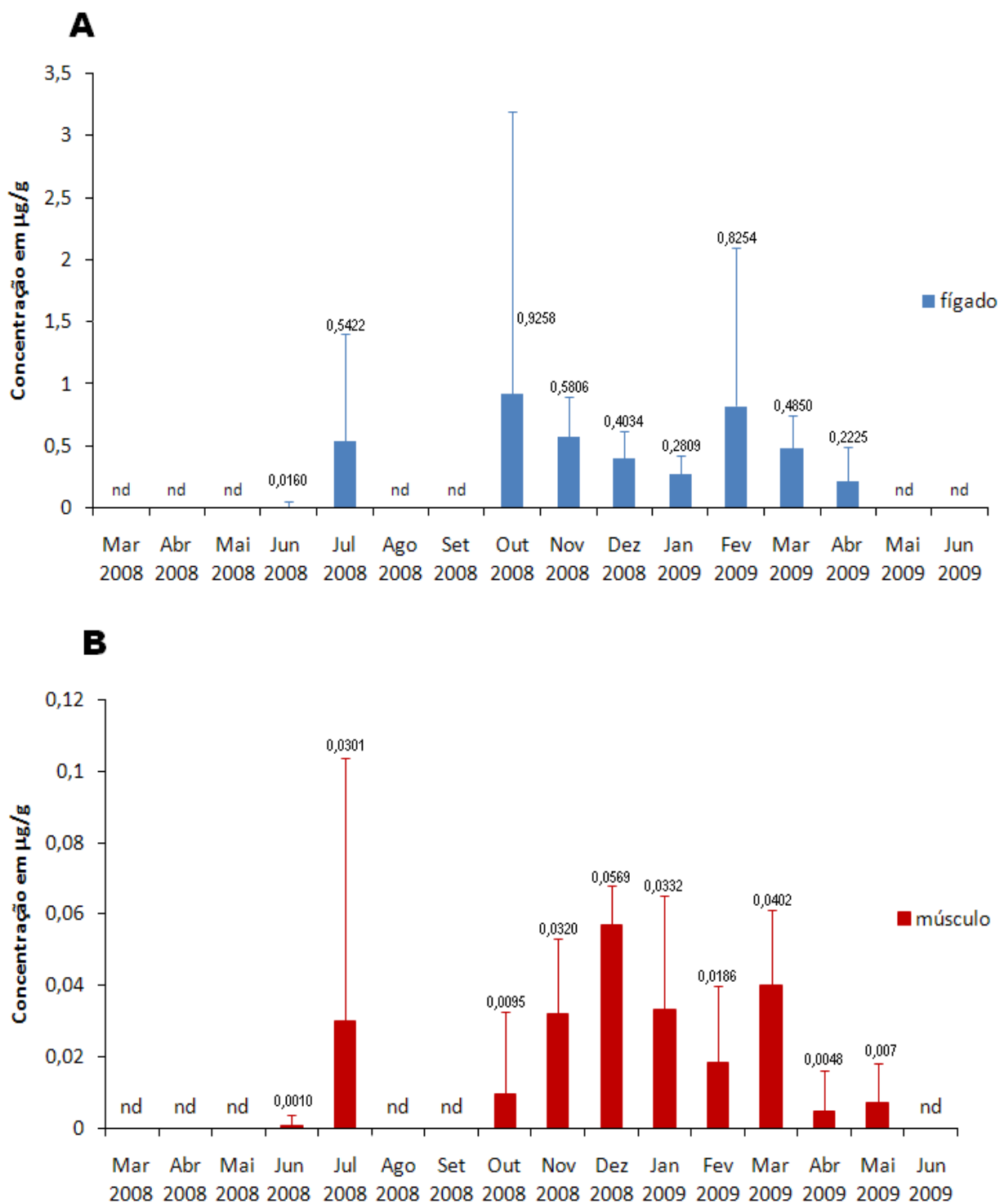


Figura 15: Concentração de microcistina (µg/g) presente em tecido de fígado, referente a coletas realizadas dentro do período amostral de março de 2008 a junho de 2009. Foram coletados três exemplares de *Oreochromis niloticus*. a cada campanha de coleta. nd→ não detectado.



**Figura 16:** Concentração de microcistina (µg/g) presente em tecido muscular, referente a coletas realizadas no período amostral de março de 2008 a junho de 2009. Foram coletados três exemplares de *Oreochromis niloticus* a cada campanha de coleta. nd → não detectado.

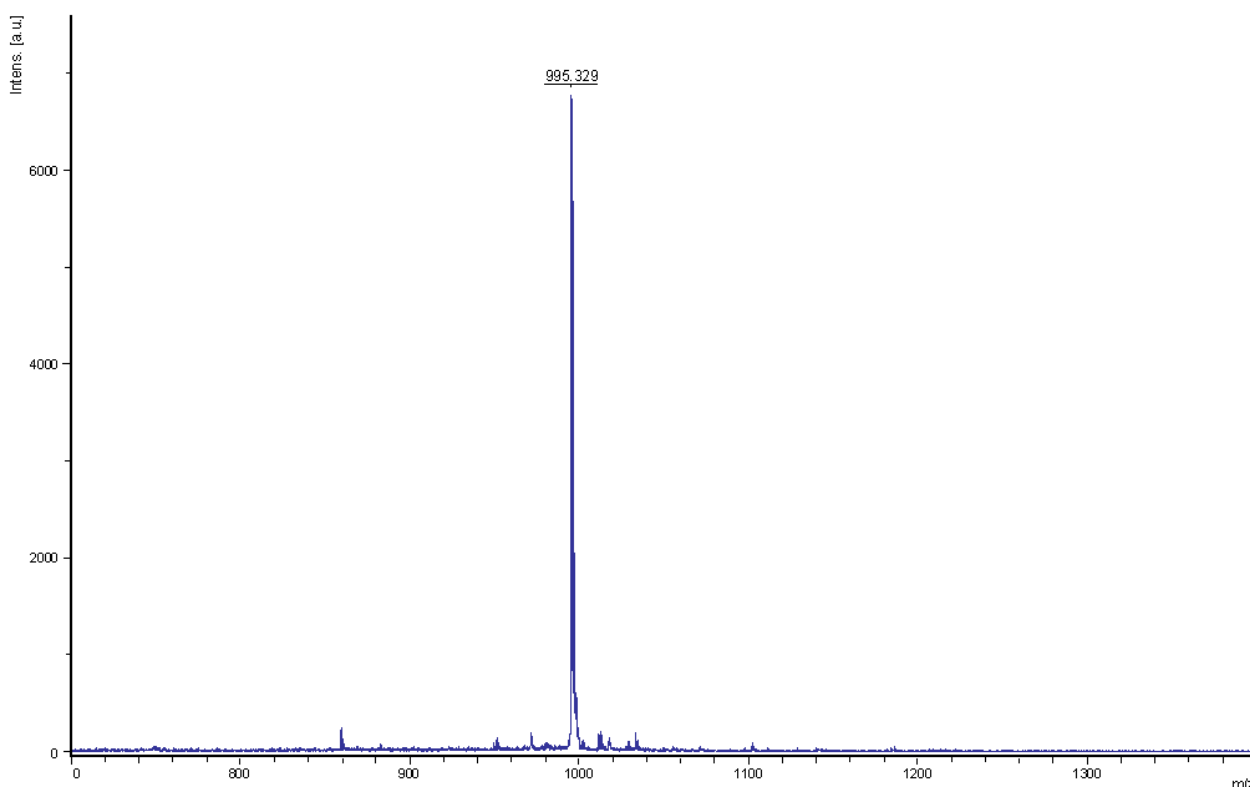


**Figura 17: (A)** Média de concentração de microcistina mensal detectada em amostras de fígado durante o período de março de 2008 a junho de 2009. **(B)** Média de concentração de microcistina mensal detectada em amostras de músculo durante o período de março de 2008 a junho de 2009. *nd*→ não detectado.

### 5.3- Análise de espectrometria de massa

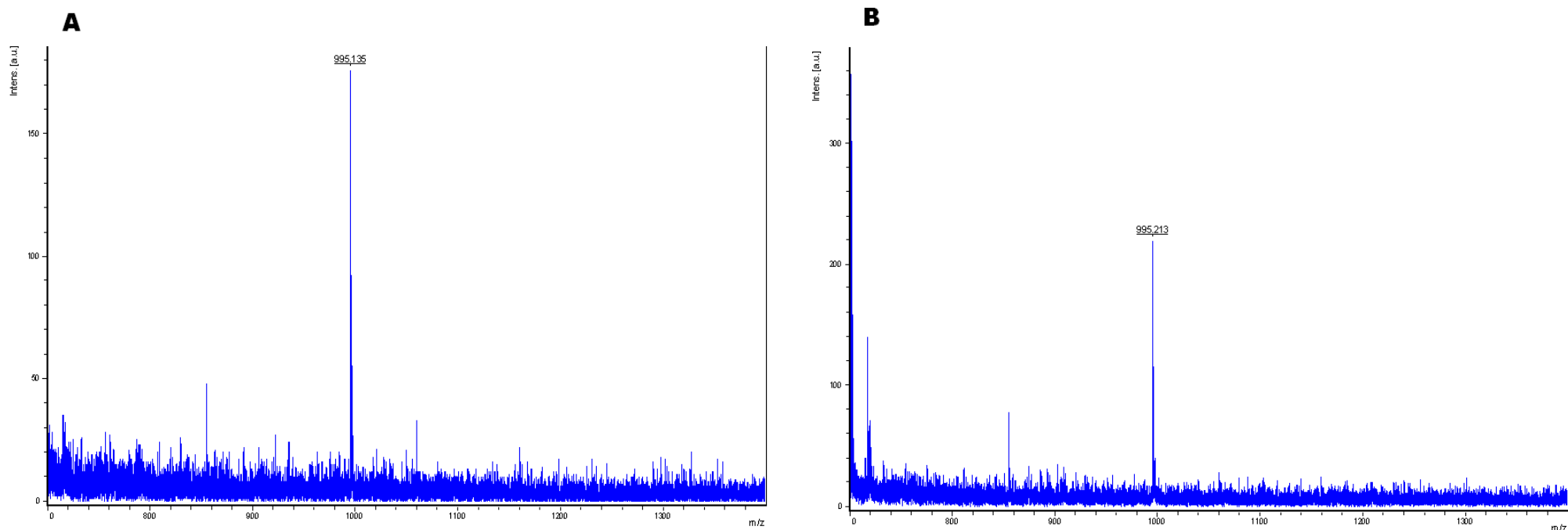
As análises de espectrometria de massa de frações cromatográficas selecionadas por apresentarem  $I_s$  maior que 95 em relação ao padrão de MC-LR confirmaram a presença dessa cianotoxina em tecidos de *Oreochromis niloticus* proveniente do lago Paranoá.

O espectrograma constituinte da Figura 18 mostra o componente de massa 995,329 m/z referente ao massa molecular a Microcistina-LR Padrão (Sigma, St. Louis).

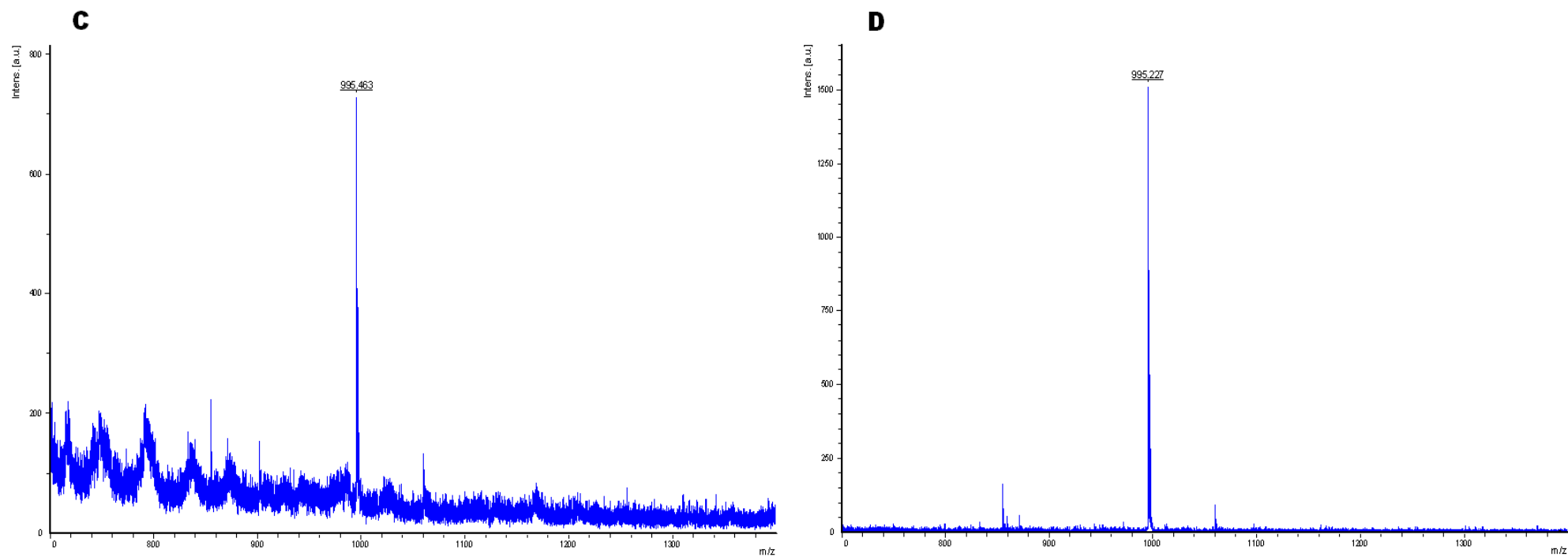


**Figura 18:** Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF do Padrão de Microcistina-LR (Sigma, St Louis) evidenciando o íon 995,329 m/z.

O mesmo componente de massa molecular de 995 m/z foi detectado em frações cromatográficas dos exemplares de *O. niloticus* que após análise por HPLC, evidenciaram a presença de microcistina através da alta similaridade entre frações cromatográficas e padrão de MC-LR, conforme ilustrado nas Figuras 19 e 20.



**Figura 19:** Espectrogramas de massa em sistema MALDI-TOF similares a massa molecular do padrão de MC-LR (Sigma, St Louis) de 995,329m/z. **(A)** Fração da amostra 48 de fígado de *Oreochromis niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 5.17 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,135 m/z. **(B)** Fração da amostra 49 de fígado de *O. niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 7.20 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,213 m/z.



**Figura 20:** Espectrogramas de massa em sistema MALDI-TOF similares a massa molecular do padrão de MC-LR (Sigma, St Louis) de 995,329m/z. **(C)** Fração da amostra 30 de fígado de *Oreochromis niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 5.20 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,463 m/z. **(D)** Fração da amostra 79 de fígado de *O. niloticus* correspondente ao tempo de retenção de 4.65 minutos no sistema de cromatografia sugerindo a presença de MC-LR pela ocorrência de íon 995,135 m/z.



#### 5.4- Análise por ELISA

Formam escolhidas algumas amostras de água bem como de músculo de peixes para a quantificação de microcistina por ensaio imunocompetitivo (ELISA). Nesse ensaio, o kit utilizado (Abraxis©) quantifica microcistinas e nodularinas, diferentemente da análise por HPLC, a qual somente quantificou a MC-LR. Além disso, o kit ELISA é específico para amostras de água e foi adaptado para análise de tecidos. Tendo em vista a expectativa da presença de mais de uma variável de MC em um mesmo habitat, aliada a maior sensibilidade de detecção pelo ensaio imunocompetitivo, seria de se esperar que o ensaio ELISA apresentasse detecção de maiores concentrações.

A disponibilidade reduzida de kit impôs limitações no número de amostras possíveis de serem analisadas por esta técnica. Diante disso, optou-se por priorizar as amostras de água e de músculo que confirmaram a presença de MC-LR pela técnica de HPLC, pois as vísceras não representam tecidos comumente utilizados para consumo humano.

Contrariando a expectativa, quando comparado os resultados das amostras de músculo pelas duas técnicas, mais de 80% dos resultados por HPLC foram maiores do que os valores detectados pelo ELISA. Por outro lado, em relação a comparação das amostras de água pelas duas técnicas, apenas em um resultado a concentração detectada por HPLC foi maior que o ensaio imunoenzimático que teve 90% de sua detecção com valores de concentração acima do encontrado por HPLC.

Dentre as amostras analisadas, os resultados encontrados mostraram-se significativamente diferentes pelo Teste “T” de Student de comparação de médias com alfa fixado em 5%, apenas em amostras de músculo (Tabelas 1), diferentemente dos resultados para amostras de água (Tabela 2).

**Tabela 1:** Comparação das concentrações de MC encontradas pelas técnicas de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e teste imunoenzimático ELISA. Análise de músculo de *Oreochromis niloticus*.

Técnica Amostra	HPLC µg/g	ELISA µg/g
<b>Músculo</b>		
No. 18 (03/06/2008)	0,0087	0,0127
No. 25 (08/07/2008)	0,1803	0,0372
No. 49 (28/10/2008)	0,0570	0,0086
No. 52 (13/11/2008)	0,0212	0,0138
No. 53 (13/11/2008)	0,0091	0,0172
No. 54 (13/11/2008)	0,0407	0,0156
No. 55 (25/11/2008)	0,0568	0,0097
No. 57 (25/11/2008)	0,0707	0,0115
No. 58 (09/12/2008)	0,0540	0,1153
No. 59 (09/12/2008)	0,0589	0,1193
No. 60 (09/12/2008)	0,0393	0,0818
No. 61 (23/12/2008)	0,0742	0,0004
No. 62 (23/12/2008)	0,0591	0,0082
No. 63 (23/12/2008)	0,0560	0,0109
No. 64 (06/01/2009)	0,0613	0,0086
No. 65 (06/01/2009)	0,0665	0,0008
No. 67 (12/01/2009)	0,0692	0,0058
No. 70 (26/01/2009)	0,0450	0,0320
No. 72 (26/01/2009)	0,0569	0,0021
No. 73 (12/02/2009)	0,0489	0,0043
No. 74 (12/02/2009)	0,0343	0,0097
No. 75 (12/02/2009)	0,0282	0,0005
No. 79 (10/03/2009)	0,0468	0,0114
No. 80 (10/03/2009)	0,0159	0,0079
No. 81 (10/03/2009)	0,0241	0,0007
No. 82 (27/03/2009)	0,0505	0,0865
No. 83 (27/03/2009)	0,0737	0,0229
No. 84 (27/03/2009)	0,0304	0,0136
No. 87 (08/04/2009)	0,0286	0,0067
No. 95 (19/05/2009)	0,0160	0,0051
No. 96 (19/05/2009)	0,0262	0,0222

Análise por HPLC refere-se à detecção somente de MC-LR. Análise por ELISA com kit comercial Abraxis®, detecção de microcistinas e nodularinas.  $p=0,0015$

**Tabela 2:** Comparação das concentrações de MC encontradas pelas técnicas de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e teste imunoenzimático ELISA. Análise de amostras de água coletada no braço do Riacho Fundo do lago Paranoá, em frente à ETE sul.

Técnica Amostra	HPLC µg/L	ELISA µg/L
<b>Água</b>		
No. 16 (25/11/2008)	0,3159	>5
No. 17 (09/12/2008)	1,0389	15,20
No. 18 (23/12/2008)	0,9764	2,35
No. 19 (06/01/2009)	0,6419	3,17
No. 20 (12/01/2009)	0,9525	3,52
No. 21 (26/01/2009)	0,7594	3,54
No. 22 (12/02/2009)	1,5384	0,23
No. 24 (10/03/2009)	0,2314	2,14
No. 25 (27/03/2009)	0,44853	1,80

Análise por HPLC refere-se à detecção somente de MC-LR. Análise por ELISA com kit comercial Abraxis®, detecção de microcistinas e nodularinas.  $p=0,0938$ .

## 6- Discussão

Existe uma preocupação mundial com a qualidade da água de reservatórios urbanos. Nas últimas décadas, esses vêm sofrendo crescentes descargas de despejos domésticos, industriais e agrícolas que favorecem o enriquecimento nutricional resultando em alterações do estado trófico dos ecossistemas. A primeira resposta do processo de eutrofização dos lagos e represas é o aumento da produtividade da comunidade fitoplanctônica, em especial a intensificação da dominância de cianobactérias. O crescimento de cianobactérias desencadeia um desequilíbrio na homeostasia do ecossistema com variações nas características físicas, químicas e biológicas da água, impactando em toda a cadeia alimentar (Esteves 1988).

O lago Paranoá, exemplo emblemático de reservatório urbano que em menos de uma década após a sua criação já se apresentava em acelerado processo de eutrofização, passou a ser reconhecido como um caso pioneiro de oligotrofização após ter sido submetido a um amplo processo de despoluição. O resultado principal desse processo de controle da eutrofização foi a redução drástica da biomassa algal (em média de 90%), identificada como desencadeadoras de diversos episódios de mortalidade de peixes.

Muito embora o espelho d'água do lago Paranoá apresente 95% de sua superfície considerada balneável, a região do braço do Riacho Fundo ainda encontra-se em estado eutrófico. Análises qualitativas e periódicas da CAESB (dados não publicados) indicam que apesar de não haver mais a ocorrência freqüente de florações algais no braço do Riacho Fundo, ainda existe a presença de cianobactérias de alguns gêneros potencialmente tóxicos como, *Aphanocapsa*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Phormidium*.

A detecção de microcistina-LR na água superficial coletada nas imediações da ETE sul ocorreu apenas após o período máximo de crescimento fitoplanctônico, ou seja, entre novembro de 2008 e março de 2009, coincidindo com o final da estação seca e início da estação chuvosa. Apesar do maior valor detectado (1,5384 µg/L em 12/02/2009) encontrar-se acima do valor de 1 µg/L estabelecido pela legislação brasileira (Portaria N° 518 de 25 de março de 2004

do Ministério da Saúde ) com base no limite proposto pela OMS (Chorus & Bartram 1999), em média, as concentrações mantiveram-se abaixo desse valor. Além disso, não foi detectada a presença desta cianotoxina em 70% das amostras analisadas, correspondentes aos meses de março a outubro de 2008 e de abril a junho de 2009.

Tendo em vista os freqüentes relatos na literatura associando a ocorrência de maior concentração de microcistina na água com o período de florações de cianobactérias, ou seja, de maior biomassa algal (Matthiensen *et al.*, 1999; Minillo *et al.*, 2000; Deberdt, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Ke *et al.*, 2007), os resultados encontrados no presente estudo criam uma expectativa de baixa contaminação por microcistinas nas águas do lago Paranoá. Mesmo na única área ainda considerada eutrófica dentro desse ecossistema, o Braço do Riacho Fundo, a ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas é esporádica, o que representaria uma baixa produção de cianotoxinas e conseqüentemente um risco bem reduzido de contaminação neste cenário atual.

A luz do presente estudo, onde a presença de microcistina na água da única área eutrófica deste ecossistema (Braço do Riacho Fundo) só foi detectada em 26% das amostras, e em concentrações de 0,2314 a 1,5384µg/L, com média de  $0,7670 \pm 0,4115$  µg/L, ou seja com valores médios menores que o limite proposto pela OMS (1 µg/L), existe uma boa expectativa quanto à futura captação de água para abastecimento na região central do lago Paranoá, área de melhor qualidade da água deste ecossistema. Mesmo o único valor acima do limite estabelecido pela OMS, que foi de 1,53 µg/L, deve ser considerado com reservas, uma vez que a legislação brasileira permite que em um período amostral de doze meses até três amostra alcancem 10µg/L.

De qualquer forma, a literatura está repleta de relatos concernentes a problemas de saúde humana causados por cianotoxinas. Um dos primeiros episódios de envenenamento por cianotoxinas, no caso nodularina, foi observado no lago Alexandrina no sul da Austrália em 1978 (Dawson, 1998). Desde então, diversos episódios de envenenamento de animais domésticos e selvagens associados a cianotoxinas já foram relatados (Carmichael, 1992 e 1994; Codd, 1995; Dawson, 1998; Falconer *et al.*, 1994; Skulberg, 1984). No

Brasil, um dos incidentes mais graves resultou em diversos casos de hepatotoxicose e algumas mortes de pacientes renais crônicos, após sessões de hemodiálise com água contaminada por microcistinas (Azevedo, 1996; Jochimsen *et al.*, 1998). Apesar disso, estudos recentes não relatam episódios de mortes causadas em humano pela ingestão direta de água contaminada por microcistina (Chen *et al.*, 2007), fato este justificado devido ao fato da presença dessas toxinas conferirem gosto, odor e sabor a água. Por outro lado, a ingestão de organismos contaminados por cianotoxinas representa um grande risco à saúde pública, uma vez que é uma importante rota de exposição de humanos a essas toxinas (Deblois *et al.*, 2008).

As cianobactérias representam um componente importante na dieta alimentar de ciprinídeos e ciclídeos (Zurawell *et al.*, 2005) e os peixes filtradores, dentre eles a tilápia, são comumente indicados como agentes de controle biológico das comunidades planctônicas com foco na redução das população de cianobactérias (Northcott *et al.*, 1991; Starling, 1998). Como a principal via de absorção dessas toxinas é gastrointestinal, a detecção de MC acumulada em tecidos de peixes ocorre logo após o período em que essas toxinas são detectadas na coluna d'água (Magalhães *et al.*, 2001).

Diversos estudos realizados sob condições laboratoriais confirmaram a capacidade de peixes de bioacumularem microcistina em seus tecidos (Rabergh *et al.*, 1991; Kotak *et al.*, 1996; Wiegand *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1995; Sahin *et al.*, 1996; Lawrence & Menard, 2001; Malbrouck *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2003 e 2004; Soares *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Jos *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Mohamed & Hussein, 2006; Prieto *et al.*, 2006; Cazenave *et al.*, 2005 e 2006; Giordano, 2007). Porém, ainda são poucos os experimentos, *in situ*, ou seja, com peixes coletados diretamente do próprio reservatório que comprovaram tal bioacumulação (Magalhães *et al.*, 2001 e 2003; Xie *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007 e 2009; Gkelis *et al.*, 2006; Deblois *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Visto que, as microcistinas são hepatotoxinas, o fígado tem papel fundamental no processo de bioacumulação de microcistinas, representando o órgão alvo de animais vertebrados (Carmichael 1992, 1994; Funasa 2003; Malbrouck *et al.* 2003; Moreno *et al.* 2005; Tsukamoto & Takahashi 2007).

A bioacumulação de MCs em fígado (em invertebrados, hepatopâncreas) foi confirmada em diversos organismos aquáticos como peixes (Williams *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004; Giordano, 2007; Zhang *et al.*, 2009), gastrópodes (Ozawa *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005), camarões (Chen & Xie, 2005a), bivalves (Chen & Xie, 2005b).

A acumulação de microcistinas em peixes pode variar tanto com o tempo de exposição à cianotoxina, quanto com o tempo de duração de florações. Em climas tropicais e subtropicais, onde as florações são constantes, pode ocorrer uma exposição crônica aumentando o potencialmente os níveis de contaminação por microcistinas (Deblois *et al.*, 2008). De acordo com Ibelings & Chorus (2007), as cianotoxinas podem bioacumular em peixes por diferentes rotas: (a) através da alimentação direta do fitoplâncton por espécie fitoplanctófaga, como a carpa prateada (*H. molitrix*); (b) acumulação de microcistina dissolvida via epitelial (guelras e pele); (c) ou exposição via cadeia alimentar (por exemplo, consumo, pelos peixes, de mexilhões que filtraram cianobactéria tóxica na água).

No presente estudo, em 61% das amostras de fígado não foi detectada a presença de microcistina e apenas 39% dessas apresentaram resultados positivos para essa cianotoxina. Este fato está diretamente relacionado com os resultados encontrados na amostragem da água, sendo que, a detecção de MC-LR nos fígados ocorreu após a confirmação da presença desta toxina na água da localidade de pesca dos espécimes. No período de detecção, a concentração média de cianotoxina foi de  $0,2590 \pm 0,6924 \mu\text{g/g}$ . As maiores concentrações de microcistina em fígado, alcançaram  $5,5549 \mu\text{g/g}$  (Figura 13), ocorrência esta do final da Estação Seca (mês de outubro/2008), coincidindo com o período de maior biomassa do fitoplâncton (Figura 8) e maior valor de clorofila-a (setembro/2008).

Estes valores são relativamente baixos quando comparados a estudos presentes na literatura. Em um lago eutrófico chinês, Taihu, a bioacumulação em fígado do peixe *Carassius auratus auratus* Linnaeus variou entre  $0,4618$  a  $3,6268 \mu\text{g/g}$  (Song *et al.*, 2007). Porém, nesse mesmo lago, Zhang *et al.* (2009), verificou valores bem mais baixos de bioacumulação em fígados de

seis espécies nativas. Enquanto na espécie considerada fitoplanctívora, *Hypophthalmichthys molitrix* variou de 0,020 a 0,10 µg/g; nas duas espécies consideradas onívoras, *Carassius auratus* e *Cyprinus carpio* os valores se situaram entre 0,016 e 0,019 µg/g e entre 0,031 e 0,17 µg/g respectivamente. Já nas três espécies consideradas carnívoras, variou de 0,019 a 0,039 µg/g em *Culter ilishaeformis*, foi inferior a 0,008 µg/g em todo o corpo de *Neosalanx taihuensis* e teve valor máximo detectado da ordem de 0,007µg/g em *Colia ectenes*. Estes perfis de bioacumulação em fígado podem ser diretamente associados a diferentes concentrações de microcistinas detectadas na água dentro do período amostral de cada um dos estudos, sendo concentração máxima de MC na água de 1,810 µg/g (Song *et al.*, 2007) e 780,2µg/g (Zhang *et al.*, 2009).

Já no lago Erie, localizado entre os Estados Unidos e o Canadá, Wilson *et al.* (2008) relata concentrações de MC acumuladas em fígado de *Perca flavences* variando entre 0,017 a 1,182 µg/g, em situações onde a clorofila-a atingiu concentrações de 47 µg/L. Magalhães *et al.* (2001) detectou concentrações de cianotoxinas que variaram de 0 a 31,1 µg/g, com média de 6,3 µg/g em fígado de *Tilapia rendalli* na lagoa Jacarepaguá localizada no Rio de Janeiro, Brasil, também em condições extremas de florações algais. De acordo com Deblois *et al.* (2008), em um estudo realizado em dois reservatórios hidroelétricos brasileiros, em áreas eutrofizadas, os valores de bioacumulação de microcistina em fígado de *O. niloticus*, a mesma espécie de tilápia analisada no presente estudo, apresentaram médias de concentração bem mais altas, de  $10,1 \pm 1,3$  µg/g referente a variação de concentração de 9,2 – 11,2 µg/g em Furnas e média de  $14,4 \pm 7,2$  µg/g variando de 2,7 – 32,1 µg/g em Funil. Neste mesmo estudo, a análise de outra espécie de tilápia, a *T. rendalli*, evidenciou menores concentrações de bioacumulação em fígado com média de  $1,3 \pm 0,8$  µg/g e valores que oscilaram de 0,8 a 2,4 µg/g.

Em recente estudo realizado nos anos de 2006 e 2007, envolvendo a análise de fígado de carpas prateadas (*H. molitrix*) cultivadas em tanques-rede para fins de controle da eutrofização na área do braço do Riacho Fundo, no lago Paranoá, Starling & Starling (2009) também confirmaram a presença de



microcistina no fígado dos peixes, com valores bem mais baixos que variaram de 0,0388 a 0,2698 µg/g.

A grande maioria dos estudos envolvendo a bioacumulação de cianotoxinas na cadeia alimentar foi realizada em áreas eutróficas de ecossistemas lacustres acometidos por florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas, sendo que a transferência dessas para os organismos aquáticos ocorre logo após a detecção dessa toxina na água (Magalhães *et al.*, 2001). Evidências neste sentido foram também relatadas em um estudo realizado com truta arco-íris, sendo que a presença de MC-LR já foi detectada em amostras de sangue e fígado decorridos três dias de exposição à cianotoxina (Tencalla & Dietrich, 1997). Além disso, a detecção de baixas concentrações de cianotoxinas na coluna d'água não significa obrigatoriamente que a detecção nos tecidos de organismos aquáticos será baixa. Em um estudo com carpa prateada em laboratório, Xie *et al.* (2004) identificaram que apesar da concentração de MC-RR ter sido baixa no tanque, já havia elevada concentração dessa cianotoxina no sangue dos peixes bem como sinais claros de bioacumulação em fígado e músculo desses indivíduos. Magalhães *et al.* (2001) também detectaram a presença de microcistinas em tecidos de peixes mesmo quando a toxina não era mais detectada na água. Além disso, um outro estudo com *O. niloticus*, sob condições laboratoriais, demonstrou que 90% da toxina administrada oralmente bioacumulou no fígado (Zhao *et al.*, 2006)

A acumulação de microcistinas nos tecidos desses organismos aquáticos representa risco a saúde humana, pois os sintomas de intoxicação por essas toxinas envolvem fraqueza, anorexia, palidez de mucosas, vômito, frio, diarreia (Carmichael e Schwartz, 1984), além de promoverem o desenvolvimento de tumores hepático (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

Com base em estudos de toxicidade oral em níveis subcrônicos, realizados com camundongos por Fawell *et al.* (1994) e com porcos, realizados por Falconer *et al.* (1994), foi estabelecida e como ingestão diária aceitável ("tolerable daily intake"- TDI) de 0,04µg/Kg de peso corpóreo/dia (Chorus & Bartram, 1999). Valores propostos de concentração máxima tolerável de microcistina-LR em água potável e alimento foram calculados com base no

peso corporal, na quantidade de água ou alimento ingerido e um fator de alocação relativa de consumo MC em água ou alimentos.

Para água potável, os valor de referência máxima aceitável da OMS de 1 µg de MC-LR/L foi calculado a partir de um TDI de 0,04 µg/kg de peso corpóreo/dia, assumindo como referência um adulto que peso 60 kg, um consumo diário de 2 litros de água e que 80% da exposição diária total a essa cianotoxina é através do consumo de água e os 20% restante inclui a exposição por outras fontes (Chorus & Bartram, 1999).

Conforme pode ser visto na Tabela 3, diversos trabalhos realizados com diferentes espécies, dentre as quais peixes, moluscos e crustáceos, apresentaram valores relativos à quantidade máxima recomendada de consumo destes organismos (TDI) acima do proposto pela OMS.

No estudo realizado com *T. rendalli* em uma situação de floração intensa na lagoa de Jacarepaguá (valores de fitoplâncton atingindo  $10^7$  células/mL), as concentrações de microcistina em músculo atingiram a concentração de 0,337µg/g, valor este considerado pelos autores 42 vezes acima do limite proposto. Neste estudo, durante os três anos de amostragem, 71,7% das amostras foram consideradas acima do TDI, representando um grande risco o consumo desses peixes (Magalhães *et al.*, 2001).

Mohamed *et al.* (2003), analisou *O. niloticus* em uma estação de piscicultura no Egito com “Bloom” de cianobactérias, sendo os resultados máximos de microcistina na água de 1,2 mg/g e a concentração da toxina no músculo do peixe tendo atingido 0,102 µg/g, quantidade que foi considerada cinco vezes acima do proposto pela OMS.

Na bacia de Sepetiba, localizada no Rio de Janeiro, foi investigada a bioacumulação de microcistinas em crustáceos e peixes (espécies não identificadas). A análise quantitativa do fitoplâncton apresentou resultados abaixo do valor recomendado pela OMS de 20.000 cél/mL, assim como a concentração de microcistinas na água também se situou abaixo de 1 µg/L com valor máximo de 0,12 µg/L. No entanto, em 19% das amostras de músculo dos peixes, a concentração de microcistina ficou acima do TDI (Magalhães *et al.* 2003).

**Tabela 3:** Comparação de valores máximos de MC-LR presentes na dieta humana. Concentrações bioacumuladas em partes comestíveis (músculos/ pé/ abdômen) de diferentes organismos aquáticos, exemplos retirados da literatura. Quantidade máxima de consumo diário do alimento (em gramas) para atingir a dose diária tolerável (TDI) de 0,04 µg/ kg de peso corpóreo/dia proposto pela OMS, considerando como base um adulto pesando 60kg.

Nome da espécie	Local de amostragem	Método de análise	Concentração da toxina (MC-LR <sub>equivalente</sub> .)	x crítica TDI (g)	Fonte
<b>Peixe</b>					
<i>Oreochromis niloticus</i>	lagoa no Egito	ELISA	0,045- 0,102 µg/g	53 - 23	Mohamed <i>et al.</i> 2003
<i>Tilapia rendalli</i>	lagoa Jacarepaguá (Brasil)	ELISA	0,337 µg/g	7	Magalhães <i>et al.</i> 2001
Peixe (espécie não citada)	Sepetiba Bay, Brazil	ELISA	0,04 µg/g	60	Magalhães <i>et al.</i> 2003
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,066 µg/g	36	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Parabramis pekinensis</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,026 µg/g	92	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Carassius auratus</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,497 µg/g	4	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Cyprinus carpio</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,026 µg/g	92	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Culter erythropterus</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,079 µg/g	30	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Culter ilishaeformis</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,109 µg/g	22	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,078 µg/g	30	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Coilia ectenes</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,182 µg/g	13	Xie <i>et al.</i> 2005
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,096 µg/g	25	Chen <i>et al.</i> 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	Yliki (Grécia)	ELISA	0,145 µg/g	16	Gkelis <i>et al.</i> 2006

<i>Carassius gibelio</i>	Kastoria (Grécia)	ELISA	0,085 µg/g	28	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Carassius gibelio</i>	Kerkini (Grécia)	ELISA	0,144 µg/g	16	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	Pamvotis (Grécia)	ELISA	0,337 µg/g	7	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Silurus aristotelis</i>	Pamvotis (Grécia)	ELISA	0,238 µg/g	10	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Pamvotis (Grécia)	ELISA	1,442 µg/g	1	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	Pamvotis (Grécia)	ELISA	0,019 µg/g	126	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Silurus glanis</i>	Pamvotis (Grécia)	ELISA	0,035 µg/g	68	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Carassius auratus</i>	Pamvotis (Grécia)	ELISA	0,336 µg/g	7	Gkelis <i>et al.</i> 2006
<i>Perca flavencens</i>	Erie (EUA)	ELISA	0,004 µg/g	600	Wilson <i>et al.</i> 2008
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,075 µg/g	32	Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Carassius auratus</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,013 µg/g	184	Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Cyprinus carpio</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,17 µg/g	14	Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Culter ilishaeformis</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,027µg/g	88	Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Neosalanx taihuensis</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	<0,008 µg/g	>300	Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Colia ectenes</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,0074 µg/g	324	Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Carassius auratus auratus</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,337 µg/g	7	Song <i>et al.</i> 2007
<b>Gastrópode</b>					
<i>Bellamya aeruginosa</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,01 µg/g	240	Chen <i>et al.</i> 2005
<i>Bellamya aeruginosa</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,380 µg/g	6	Song <i>et al.</i> 2007
<b>Camarão</b>					
<i>Palaemon modestus</i>	Lago Chaohu (China)	HPLC	0,13 µg/g	18	Chen e Xie 2005

---

<i>Macrobrachium nipponensis</i>	Lago Chaohu(China)	HPLC	0,04 µg/g	60	Chen e Xie 2005
<i>Macrobrachium nipponensis</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,754 µg/g	3	Song <i>et al.</i> 2007
<b>Mexilhão</b>					
<i>Cristaria plicata</i>	Lago Taihu (China)	HPLC	0,730µg/g	3	Song <i>et al.</i> 2007

---

Concentração da toxina presente nessa tabela refere-se ao valor máximo de microcistina-LR equivalente detectada nas partes comestíveis (peso fresco) dos organismos aquáticos analisados em cada estudo. Concentrações mínimas e máxima de MC-LR detectadas em músculo de *O. niloticus* por Mohamed *et al.* (2003). Em *T. rendalli*, Magalhães *et al.* (2001), 71,7% das amostras analisadas encontravam-se acima do TDI. Na bacia do Sepetiba apenas 19 % das amostra (espécies não identificadas) foi considerada acima do TDI. Coeficiente de 0.5 foi utilizado para converter peso seco em peso fresco e um coeficiente de 0.2 foi utilizado para converter MC-RR em MC-LR equivalente por Xie *et al.* (2005). Coeficiente de 0.5 foi utilizado para converter peso seco em peso fresco por Chen *et al.* (2006). Coeficientes de 4.55,4,4.22,4.68,3.93 e 6.24 foram utilizados para converter peso seco em peso fresco de *C. carpio*, *C. auratus*, *H. molitrix*, *C. ilishaeformis*, *N. taihuensis* e *C. ectenes* por Zhang *et al.* (2009) e nesse mesmo estudo 82% das amostras os níveis de MC, em músculo, foram considerados abaixo do TDI. Song *et al.* (2007) determinou que 89,5% as concentrações de MC em músculo ficaram acima do TDI. Em *B. aeruginosa* só foi considerada em pé (músculo), pois em alguns casos esses indivíduos são ingeridos inteiros e a concentração de MC aumentaria e ficaria acima do TDI em Chen *et al.* (2005) e Song *et al.* (2007). Coeficiente de 0.5 foi utilizado para converter peso seco em peso fresco e um coeficiente de 0.2 foi utilizado para converter MC-RR em MC-LR equivalente por Chen & Xie (2005), as concentrações apresentadas referem-se somente ao abdômen (músculo) e apenas 31% da amostras ficaram acima do TDI. O consumo diário na maioria dos estudos exceto Mohamed *et al.* (2003) Xie *et al.* (2005) e Chen *et al.* (2007). Em vermelho, valores (g) de TDI crítico ao consumo com base no valor recomendado de ingestão de pescado proposta pela OMS de 12kg/pescado/ano por pessoa, o que representa consumo diário de 55g.

Por outro lado, no lago Erie, sob uma situação de dominância de *M. aeruginosa* no fitoplâncton, Wilson *et al.* (2008), encontrou concentrações máximas de microcistina da ordem de 0,0040 µg/g em músculo de *Perca flavescens*. Tais resultados obtidos para esta espécie onívora, não trariam risco de consumo desse pescado para saúde humana.

Outras espécies planctófagas como a carpa prateada também foram objeto de estudos de bioacumulação de cianotoxinas. Chen *et al.* (2006), no lago Taihu, localizado na China, em um experimento de cultivo em tanques-rede numa região eutrófica, avaliaram a incorporação de MCs em diversos compartimentos de *H. molitrix* e apesar da grande quantidade de MC no intestino (24,3mg/g), concentrações bem mais baixas foram detectadas no músculo (0,197µg/g). No lago Paranoá, as concentrações de microcistina em músculo de carpa prateada cultivada em tanques-rede, localizados no braço do Riacho Fundo atingiram um valor médio de 0,0037µg/g, valor este considerado bem abaixo do TDI (Starling & Starling 2009).

Estudo envolvendo outra carpa chinesa também planctófaga, a carpa cabeça-grande (*Aristichthys nobilis*), mantida em tanque-rede, foi realizado no lago Taihu por Chen *et al.* (2007). Embora os níveis de bioacumulação de microcistina em músculo tenham atingido a concentração de 0,375 µg/g, somente em três meses do ano foi verificado risco de consumo desse peixe.

Em outro estudo realizado também no lago Taihu, região eutrófica da bacia Meiling, Zhang *et al.* (2009) verificaram uma maior bioacumulação de cianotoxina em músculo nas espécies onívoras seguidas das fitoplanctófaga e por fim as carnívoras, sendo que o TDI só foi ultrapassado em tecido de carpa comum (espécie onívora) em apenas uma amostra de um mês.

Em estudo conduzido no lago Chaohu, localizado no sul da China, Xie *et al.* (2005) realizaram análises de diversos órgãos de peixes de diferentes níveis tróficos (fitoplanctófagos, herbívoros, onívoros e carnívoros). As maiores concentrações de microcistinas foram detectadas no intestino e sangue seguido por fígado, bile e rins, e por último o músculo, cuja bioacumulação foi muito reduzida. Com referência as espécies, as maiores concentrações foram detectadas em peixes carnívoros e onívoros e as mais baixas em peixes

fitoplanctófagos e herbívoros. Uma provável explicação dada pelos autores é de que os peixes carnívoros poderiam acumular mais microcistinas pelo fato de apresentarem outras rotas no trato gastrointestinal, enquanto os peixes fitoplanctófagos teriam condições de degradar microcistinas mais ativamente, além também considerarem a possibilidade da ocorrência da combinação destes mecanismos supracitados.

Apesar da expectativa de que os peixes que se alimentam diretamente de cianobactérias tóxicas poderiam acumular mais microcistinas, peixes fitoplanctófagos e herbívoros tendem a bioacumular menos. Xie *et al.* (2004) sugerem que talvez por uma questão de adaptação ao habitat eutrófico, a carpa prateada desenvolveu um mecanismo para degradar MC-LR, eliminando a maior parte pelas fezes.

Ibelings *et al.* (2005), conclui não haver evidências de biomagnificação de microcistinas na cadeia alimentar, quando analisando a transferência desta cianotoxina desde o plâncton até as aves aquáticas em lago Holandês. Uma justificativa para que ciclídeos, no caso as tilápias, acumulem mais microcistinas do que espécies carnívoras é que esses organismos apresentam íleo longo e com grande superfície e alta capacidade de absorção (Ibelings & Chorus, 2007).

No presente estudo, em 70% das amostras de músculo não foi detectada a presença de microcistina e apenas 30% dessas apresentaram resultados positivos para essa cianotoxina. A maior concentração de microcistina em músculo foi registrada em meados da seca (mês de julho) e atingiu o valor de 0,1803  $\mu\text{g/g}$  (Figura 14), enquanto nas demais amostras em que a toxina foi detectada, a concentração foi mais baixa com média de  $0,0443 \pm 0,0197 \mu\text{g/g}$ , sendo que a média de concentração da toxina durante todo o experimento foi de  $0,0148 \pm 0,0282 \mu\text{g/g}$ . Confrontando esses resultados com os limites de dose diária tolerável (TDI) estabelecidos pela OMS, observa-se que a maior concentração de microcistina encontrada está acima do TDI, enquanto o valor médio verificado nas amostras onde a cianotoxina foi detectada encontra-se exatamente no limite de TDI e o valor médio global de microcistina durante o

período de monitoramento está abaixo do TDI, cujo valor de referência neste caso seria de 0,04 µg/g.

Um ponto crucial para a definição do da dose diária tolerável (TDI) é a quantidade de pescado ingerida diariamente. Enquanto os estudos de *Zhang et al.*, (2009), *Magalhães et al.* (2001 e 2003), *Deblois et al.* (2008), *Chen et al.* (2006) e *Song et al.* (2007) estabeleceram um consumo médio diário de peixe da ordem de 300g para um indivíduo adulto de 60 kg, *Xie et al.* (2005), *Mohamed et al.* (2003) e *Chen et al.* (2007) estabeleceu o consumo diário de 100-200 g.

Com base nos dados de pesquisas realizadas pela Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP-PR), os valores de referência para consumo de pescado per capita no Brasil variam de 6,8 kg a 8 kg/pessoa/ano (equivalendo a um consumo diário de 18 a 21 g), sendo que a OMS incentiva o consumo de peixes em busca do aumento dessa taxa visando atingir 12 kg/pessoa/ano (32 g diários). Já no Canadá, esse valor é em média 16 kg/pessoa/ano (43 g/dia) e no Japão esse valor atinge 65 kg/pessoa/ano (178 g/dia). A média mundial ficou estabelecida em 20 kg pessoa/ano (55 g/dia).

Considerando que a ingestão diária de tilápia do Nilo, baseada em índices de consumo de pescado de média mundial, seja de 55 g/pessoa/dia (equivalente a 20 kg/pessoa/ano) foi possível estimar a quantidade de microcistina que estaria sendo bioacumulada. Para o presente trabalho, com base em uma dieta de consumo diário de 55g, e ainda considerando as médias de concentrações detectadas mensalmente (Figura 15), somente no mês de dezembro de 2008 (estação chuvosa), ocasião em que a concentração média foi de  $0,0569 \pm 0,0112$  µg/g, houve extrapolação do limite do TDI. Neste caso específico, a ingestão alcançou 3,13 µg de MC-LR/dia, sendo que nos demais meses os valores de ingestão não ultrapassaram 2,2 µg de MC-LR/dia. Considerando um adulto 60 kg, esta concentração de microcistina encontra-se abaixo do TDI (0,04 µg/kg de peso corpóreo/ dia), que poderia alcançar o valor de 2,4 µg de MC. Cabe ainda ressaltar que apesar de somente em 1 em 16 meses de monitoramento apresentar concentrações acima do TDI. Porém, no período transição entre a seca e chuva e período chuvoso propriamente dito,



logo após o período de crescimento máximo do fitoplâncton a partir do mês de setembro (Figura 8), foi verificada a ocorrência das maiores concentrações de microcistinas nos músculos, as quais poderiam trazer risco a saúde humana pelo consumo de pescado especificamente nesse período.

Aliado ao fato de que as microcistinas ligam-se covalentemente e irreversivelmente a proteínas fosfatases e esses compostos não são extraíveis pelo método utilizado no presente estudo, William *et al.* (1997a, b) verificou, ainda, que somente 24% do total de MC-LR presente em fígado de salmão do Atlântico era extraível com metanol.

A perda de material durante a extração também pode ocorrer. Zhang *et al.* (2009), verificou que 26%, 14% e 9% de microcistinas -RR, -YR e -LR, respectivamente, foram perdidas durante a extração.

Apesar de dados da literatura geralmente indicarem que os processos de extração podem subestimar a presença de cianotoxinas, nesse estudo supõe-se que a concentração da microcistina-LR tenha sido superestimada. Isto porque mesmo após a purificação das amostras por SPE, quando aplicada no HPLC, frações cromatográficas antecessoras a microcistina-LR podem ter interferido causando um incremento no cálculo da área da microcistina-LR feito pelo software utilizado.

Outro fato importante a ser considerado refere-se à definição da dose diária tolerável, sendo esta baseada tanto em relatos de danos causados a seres humanos após o consumo de água potável contendo cianobactérias, quanto em um número limitado de trabalhos com experimentação animal, gerando resultados de LOAEL (“Lowest Observed Adverse Effect Level”) e NOAEL (“No Observed Adverse Effect Level”), os quais foram divididos por fatores de segurança adequados.

No estudo de Fawell *et al.* (1994) de 13 semanas de administração oral (gavagem) de microcistina em camundongos, definiu-se como NOAEL, ou seja, dose de nenhum nível de efeito adverso observável, a concentração de 40µg/kg peso corpóreo/dia, a partir de exame histopatológico do fígado e alterações do nível sérico enzimático. Em seguida, foi aplicado fator de segurança de 1.000 (10 de variabilidade intra-espécies, 10 para a variabilidade inter-espécies e 10 para as limitações do banco de dados, nomeadamente a

falta de dados sobre a toxicidade crônica e carcinogenicidade), que deu origem a uma TDI provisória de 0,04 µg/kg de peso corpóreo/dia para o consumo de MC-LR.

Outro estudo realizado com suínos, no qual os porcos receberam por 44 dias extratos de *Microcystis* na água potável, gerou um LOAEL, dose de menor nível de efeito adverso observado, de 100 µg MC-LR/ kg de peso corpóreo/ dia. A este valor, foi aplicado um fator de incerteza global de 1500, sendo 10 para variabilidade intra-espécie, 3 ao invés de 10 para a variabilidade inter-espécies (porque suínos assemelham mais fisiologicamente aos seres humanos do que roedores), 5 para a extrapolação de um LOAEL para um NOAEL (10 foi considerado inadequado devido à baixa incidência de efeitos no grupo de menor dose e forma deduzida da curva dose-resposta) e 10 para um período de exposição menor. Como resultado deste cálculo, chegou-se a um TDI provisório de 0,067 µg/ kg de peso corpóreo/ dia, muito embora o valor mais restritivo de 0,04 µg/ kg de peso corpóreo/ dia tenha sido adotado na recomendação da OMS (Chorus & Bartram, 1999).

Ibelings & Chorus (2007) traçou que um consumo de uma única dose de 25 µg não apresentaria efeitos colaterais a uma criança pesando 10kg, ou seja 2,5 µg/kg, mas o TDI foi estabelecido com base em dados de exposição crônica a microcistinas.

No presente estudo, a preocupação quanto ao consumo de filé de peixe contaminado por microcistinas foi mais evidente no período de transição seca-chuva, no qual a concentração detectada de MC-LR nos tecidos foi maior. Isso confirma uma influência sazonal, na qual o lago passa por um período de inversão térmica nos meses de frio intenso de maio a agosto o que promove ressuspensão de matéria orgânica no ecossistema e favorece o crescimento de fitoplâncton nos meses seguintes e por fim a transferência de cianotoxinas para os organismos aquáticos com a detecção dessas em seus tecidos.

Ressalta-se ainda que os valores de referência para o cálculo basearam-se na média de consumo de pescado mundial de 20 kg / ano / por pessoa, valores muito acima do índice de consumo de pescado referentes ao Brasil (6,8 a 8 kg/ano).

Portanto, à luz dos resultados do presente estudo, não há restrições ao consumo de *O. niloticus*, provenientes do braço do Riacho Fundo do lago Paranoá por seres humano no que se refere a contaminação por Microcistina-LR. Até mesmo no período de maior detecção desta cianotoxina, ou seja, na transição da Estação Seca para a Chuvosa, os valores obtidos incorporaram alguns fatores de segurança adicionais, a saber: (a) a técnica pode ter superestimado a presença da MC-LR, (b) a média de consumo de pescado utilizada neste trabalho foi bem maior que a média real de consumo de pescado brasileira e, (c) o valor de TDI utilizado foi o mais restritivo e já tendo incorporado um fator de segurança.

No entanto, tendo em vista a tendência mundial de intensificação do processo de eutrofização, convém recomendar o monitoramento constante da bioacumulação de MCs em tecidos de peixes do lago Paranoá.

Outra questão importante a ser considerada refere-se a precisão e reprodutibilidade dos métodos empregados para detecção das cianotoxinas.

No presente estudo, os resultados apresentados são referentes a detecção de MC-LR em amostras de água e em tecidos (fígado e músculo) de *Oreochromis niloticus* pela técnica de HPLC, com confirmação da massa molecular em análise de MALDI/TOF.

Nos últimos anos, diferentes técnicas de análise, além da detecção por HPLC, vêm sendo testadas para verificar a presença de microcistinas. Como exemplo disso, têm-se métodos não muito específicos de exploração de propriedades bioquímicas de microcistinas que baseam-se na capacidade destas de inibição de proteínas fosfatases, e ensaios imunológicos, bastante específicos, que utilizam anticorpos (McElhiney & Lawton, 2005). O método ELISA é um método promissor, principalmente pelo fato de gerar resultado em um rápido intervalo de tempo e grande sensibilidade podendo detectar baixa concentrações. Ueno et al. (1996) desenvolveu uma técnica de ELISA com limite de detecção de 0,05 µg/L pra amostras de água e já existe uma grande diversidade de kits disponíveis para a comercialização (e.g. AbraxisLLC, Pennsylvania, USA; Wako Chemicals, Osaka, Japan; EnviroLogix Inc., Portland, ME, USA; Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE, USA).

No presente trabalho, algumas amostras também foram analisadas por ELISA (Abraxis©), sendo o kit capaz de detectar microcistinas e nodularinas. Os resultados das amostras de músculo quando comparados ao valor detectado por HPLC mostraram significativamente menores, fato este que pode indicar ter havido superestimativa das amostras tratadas com HPLC, podendo ainda essa diferença ser justificada pelo fato do kit ser específico para a detecção de cianotoxinas em amostras de água e não tecidos. Por outro lado, os resultados encontrados nas amostras de água por ELISA não foram estatisticamente distintos daqueles obtidos pela técnica do HPLC, o que reforça o argumento acima baseado na especificidade do Kit ELISA para análise de água.

## 7- Conclusões

- 1) A bioacumulação de microcistina em fígado e músculo de *O. niloticus* foi confirmada nos peixes provenientes do lago Paranoá. As concentrações dessa cianotoxina não foram detectadas em 61% das amostras de fígado e quando presentes variaram de 0,0326 µg/g a 5,5549 µg/g. Já em músculo não foi detectada a presença de microcistinas em 70% das amostras e quando detectada a concentração da cianotoxina variou de 0,0087µg/g a 0,1803µg/g.
- 2) Dados referentes ao monitoramento mensal realizado nos anos de 2008 e 2009 pela CAESB, baseados nos valores referentes aos parâmetros de transparência, fósforo total e clorofila-a classificam o braço do Riacho Fundo ainda como eutrófico e com ocorrência de cianobactérias. E apesar de não ser confirmada a presença de microcistina em 70% das amostras de água da região, nos meses em que a toxina foi determinada nos tecidos dos peixes essa também teve presença confirmada na água.
- 3) A presença de MCs na coluna d'água manteve-se diretamente associada à sazonalidade do ecossistema. Ao final da estação seca, após fase de maior crescimento fitoplanctônico setembro e outubro de 2009, a detecção de microcistinas ocorreu nas análises de água e de tecidos de peixes. A presença da cianotoxina na água foi confirmada nos meses de novembro e dezembro de 2008 e janeiro, fevereiro e março de 2009, com maior concentração atingida no mês de dezembro. Nesses mesmos meses MCs foram detectadas em fígado e músculo dos *Oreochromis niloticus*, também com a maior concentração ocorrida no mês de dezembro.

- 4) Os resultados encontrados de bioacumulação de microcistina em músculo (filé) não impõem restrições ao consumo de *O. niloticus* proveniente do Lago Paranoá. O mês de dezembro de 2008 foi o único mês em que a concentração de microcistina esteve acima do TDI, fato este perfeitamente aceitável no âmbito de avaliação de risco alimentar.
  
- 5) Tendo em vista indicações na literatura relativas à perda de material durante o processo de extração bem como a possibilidade de superestimativa da concentração de MC-LR pela técnica de HPLC no presente estudo, recomenda-se análise periódica dos peixes do lago Paranoá quanto a incorporação de microcistinas.

## 8- Referências Bibliográficas

- Altafin, I. G., Mattos, S. P., Cavalcanti, C. G. B. & Estuqui, V. R. 1995. Paranoá Lake - Limnology and Recovery Program. In: J. G. Tundisi, Bicudo, C. E. M. & Matsumura-Tundisi, T. (Eds.). Limnology in Brazil, Brazilian Academy of Science & Brazilian Limnological Society, 325-349.
- Angelini, R.; Bini, L. M.; Starling, F. L. R. M. 2008. Efeitos de diferentes intervenções no processo de eutrofização do Lago Paranoá (Brasília-DF). *Oecologia Brasiliensis*, 12 (3): 560 -567.
- Azevedo, S. M. F. O. 1996. Toxic Cyanobacteria and the Caruaru Tragedy. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 83-84.
- Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W.; Jochimsen, E.; Rinehart, K.; Lau, S.; Shaw, G. & Eaglesham, G. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicology*, 181: 441-446.
- Borges, A. M. 2004. Efeito da temperatura da água na produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 65p.
- Burnett, J. A. B.; Mattos, S. P.; Azzolin, N. M. P. 2001. IX- Intervenções da companhia de saneamento. In: Fonseca, F. O. Olhares sobre o lago Paranoá. 1ª Edição. Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Brasília, 199-211.
- Campbell, K. L. I. 1981. Fishes of the genus *Sarotherodon* (Pisces, Cichlidae) of springs along the northern Uaso Ngiro, Kenya. *Journal East Africa Natural History Society and National Museum*, 173: 1-12.
- Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445-449.

Carmichael, W. W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. Scientific American, January, 64-70.

Carmichael, W. W. 1997. The Toxins of Cyanotoxins. Advances in Botanical Research, 27: 211- 256.

Carmichael W. W. & Schwartz, L. D. 1984. Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. In: Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins Journal of Applied Bacteriology, 72: 445-449.

Carmichael W. W.; Beasley, V. R.; Bunner, D. L.; Eloff, J. N.; Halconer, I. R.; Gorham, I. R.; Harada, K. I.; Yu, M. J.; Krishnamurthy, T.; Moore R. E.; Rinehart, K. L.; Runnegar, M. T. C.; Skulberg, O. M.; Watanabe, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon, 26: 971-973.

Carmichael, W. W.; An, J. S.; Azevedo, S. M. F. O.; Lau, S.; Rinehart, K. L.; Jochimsen, E. M.; Holmes, C. E. M. & Silva J. B. 1996. Analysis for microcystins involved in an outbreak of liver failure and death of human at a hemodialysis center in Caruaru, Pernambuco-Brazil. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 85-86.

Carmichael, W. W.; Azevedo, S. M. F. O.; An, J. S.; Molica, R. J. R.; Jochimsen, E. M.; Lau, S.; Rinehart, K. I.; Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environmental Health Perspectives, 109 (7): 663-668.

Caulton, M. S. 1977. A quantitative assessment of the daily ingestion of *Panicum repens* L. by *Tilapia rendalli* Boulanger (*Cichlidae*) in Lake Kariba. Trans. Rhod. Sci. Assoc., 58 (6): 38-42.



- Cavalcanti, C. G. B.; Pinto, M. T.; Freitas, H. J. & Moreira, R. C. A. 1997. Paranoá lake restoration: impact of tertiary treatment of sewage in the watershed. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 689-693.
- Cazenave, J.; Wunderling, D. A.; Bistoni, M. A.; Ame, V. M.; Krause, E.; Pflugmacher, S. & Wiegang, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquatic Toxicology*, 75: 178-190.
- Cazenave, J.; Bistoni, M. A.; Pesce, S. F. & Wunderling, D. A. 2006. Differential detoxification and antioxidant responses in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology*, 76: 1-12.
- Chen, C. Y. & Chou, H. N. 2001. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins by purple clam *Hiatula rostrata* Lightfoot. *Toxicon*, 39: 1029-1034.
- Chen, J. & Xie, P. 2005a . Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, 45: 615-625.
- Chen, J. & Xie, P. 2005b. Seasonal Dynamics of the Hepatotoxic Microcystins in Various Organs of Four Freshwater Bivalves from the Large Eutrophic Lake Taihu of Subtropical China and the Risk to Human Consumption. *Toxicology*, 20: 572-584.
- Chen, J., Xie, P., Guo, L.G., Zheng, L. & Ni, L.Y. 2005. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environmental Pollution*, 134: 423-430.

- Chen, J.; Xie, P.; Zhang, D.; Ke, Z. & Yang, H. 2006. *In situ* studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture*, 261: 1026-1038.
- Chen, J.; Xie, P.; Zhang, D. & Lei H. 2007. *In situ* studies on the distribution patterns and dynamics of microcystin in a biomanipulation fish - bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental pollution*, 147: 150-157.
- Chen, J.; Zhang, D.; Xie, P.; Wang, Q. & Ma, Z. 2009. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Science of the Total Environment*, 407: 3317-3322.
- Chorus, I. & Bartram, J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, 416p.
- Codd, G. A. 1995. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Science Technology*, 32 (4): 149-156.
- Dhaussy, A. L.; Dhaussy, P. & Lazzaro, X. 1998. Avaliação do Estoque pesqueiro por ecossondagem. IN: Fundação de sustentabilidade de desenvolvimento. Serviço de levantamento hidroacústico (ecossondagem) no Lago Paranoá. Relatório final. Brasília, 50-72.
- Dawson, R. M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36: 953–962.
- Deberdt, G. L. B. 2002. Estudo de cianobactérias em reservatório com elevado grau de trofia (reservatório de Salto Grande - Americana - SP). Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, 207p.

- Deblois, C. P.; Rodriguez, R. A.; Giani, A. & Bird, D. F. 2008. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon*, 51: 435–448.
- DeMott, W. R.; Zhang, Q. X. & Carmichael, W. W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 36: 1346-1357.
- Diana, J. S.; Dettweiler, D. J. & Lin, C. K. 1991. Effect of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the ecosystem of aquaculture ponds and significance to the trophic cascade hypothesis. *Canadian Journal of Fisheries. Aquatic Sciences*, 48: 183-190.
- Dittmann, E.; Neilan, B.A.; Erhard, M.; Döhren, H. & Börner, T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology*, 26: 779-787.
- Dittmann, E.; Erhard, M.; Kaebernick, M.; Scheler, C.; Neilan, B.; Von Döhren, H. & Börner T. 2001. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*, 147: 3119-3133.
- Dornelles, L. O. C. & J. Dias-Neto. 1985. Sugestão para uma exploração racional do Lago Paranoá. Paper presented in the first meeting of engineers from Brasília. Brasília-DF, 6 p.
- Esteves, F. A. 1988. Fundamentos de limnologia. Interciência. FINEP. Rio de Janeiro, 122-567.
- Falconer, I. R. 1991. Tumor promoting and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria environmental toxicology and water quality: *An International Journal*, 6: 77-184.

- Falconer, I. R.; Steffensen, M. D. B. D.; Choice, M. & Coverdale, O. R. 1994. Toxicity of blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environmental toxicology and water quality: An international journal*, 9: 131- 139.
- Felizatto, M. R.; Itonaga, L. C.; Pinto, M. A. T. & Cavalcanti, C. G. B. 1999. Statistical tendency analysis of lake Paranoá limnological data and trophic state classification based on cepis methodology. 20º congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental-ABES. Rio de Janeiro,176.
- Fawell, J. K., Mitchell, R. E., Everett, D. J. & Hill, R. E. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse. I: Microcystin-LR. *Human and Experimental Toxicology*, 18: 162-167.
- Fernando, C. H. 1983. Zooplankton and fish production with special reference to the tilapias. In: L. Fishelson & Z, Yaron (Eds.), *Proc. Int. Symp. Tilapia in aquaculture*, Tel Aviv, 95-104.
- Fernando . C. H. 1994. Zooplankton, fihs and fisheries in tropical freshwater. *Hydrobiologia*, 272: 105-123.
- Ferrante, J. E. T.; Rancon, L. & Braga-Netto, P. 2001. III- Meio físico. In: Fonseca, F. O. *Olhares sobre o lago Paranoá*. 1ª Edição, Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Brasília, 45-79.
- Ferrão-Filho, A. S.; Suzuki, B. K. & Azevedo, S. M. F. O. 2002. Accumulation of microcystins by a otropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology*, 59: 201–208.
- França, V. C.; Gurgel, J. J. S. & Braga, R. A. 1964. Exame biológico-pesqueiro do lago “Israel Pinheiro” (Brasília, Brasil). Internal Report from DNOCS, Fortaleza-CE, Brazil, 35-51.

- Fryer, G. & Iles, T. D. 1972. The Cichlid Fishes of the Great Lakes of Africa: their Biology and Evolution. Oliver & Boyd, Edinburgh, 641 p.
- Fujiki, H. 1992. Is the inhibition of Protein Phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? *Molecular Carcinogenesis*, 5: 91-94.
- FUNASA. 2003. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Ministério da Saúde. Brasília, 51p.
- Getachew, T. & Fernando, C. H. 1989. The food habits of a herbivorous fish (*Oreochromis niloticus* Linn.) in lake Awasa, Ethiopia. *Hydrobiologia*, 174: 195-200p.
- Giordano, S. B. 2007. Estudos sobre a incorporação de Microcistinas de cianobactérias em carpa Prateada – *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica. Universidade Federal do Rio Grande, 73p.
- Gkelis, S.; Lanaras, T; Sivonen, K. 2006. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquatic Toxicology*, 78: 32–41.
- Grando, J. V. 1989. Considerações sobre o estágio atual da ictiofauna e aspectos alimentares de quatro espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 98 p.
- Ibeling, B. W. & Chorus, I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150: 177-192.

- Ibelings, B. W.; Bruning, K.; Jonge, J.; Wolfstein, K.; Dionisio Pires, L. M.; Postma, J.; Burger, T. 2005. Distribution of Microcystins in a Lake Foodweb: No Evidence for Biomagnification. *Microbial Ecology*, 49: 487-500.
- ISDF/UnB/CAESB/IBGE. 1997. Avaliação da Qualidade Sanitária do Pescado do Lago Paranoá. Final Report to the Brasilia Foundation for Research Support (FAP-DF), 120 p.
- Jang, M. H.; Ha, K.; Joo, G. J. 2003. Toxin-mediated interaction between cyanobacteria and native fishes in the eutrophic Hoedong Reservoir, South Korea. *J. Freshw. Ecol.*, 18: 639-646.
- Jang, M. H.; Ha, K.; Lucas, M. C.; Joo, G. J.; Takamura, N. 2004. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquatic Toxicology*, 68: 51–59.
- 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.; Jarvis, W. R. 1998. Liver failure and death following exposure to microcystins toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 338: 873-888.
- Jos, A.; Pichardo, S.; Prieto, A. I.; Repetto, G.; Vázquez, C. M.; Moreno, I.; Cameán, A. M. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 72: 261–271.
- Ke, Z.; Xie, P.; Guo, L.; Liu, Y.; Yang, H. 2007. In situ study on the control of toxic *Microcystis* blooms using phytoplanktivorous fish in the subtropical Lake Taihu of China: A large fish pen experiment. *Aquaculture*, 265: 127–138.

- Kearns, K. D. & Hunter, M. D. 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology*, 2: 291-297.
- Keshavanath, P.; Beveridge, M. C. M.; Barird, D. J.; Lawton, L. A.; Nimmo, A. & Codd, G. A. 1994. The functional grazing response of phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strain of cyanobacterial *Microcystis aeruginosa*. *Journal of fish Biology*, 45: 123-129.
- Kolding, J. 1993. Population dynamics and life-history styles of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Ferguson's Gulf, Lake Turkana, Kenya. *Env. Biol. Fishes*, 37: 25-46.
- Kotak, B. G.; Semalulu, S.; Fritz, D. L.; Prepas, E. E.; Hrudehy, S. E. & Coppock, R. W. 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol*, 34: 517-525.
- Krishnamurthy, T., W. W. Carmichael & E. W. Sarver, 1986. Toxic peptides from freshwater Cyanobacteria (blue-green algae) I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. *Canadian Journal Comp. Med. Vet. Sci.*, 29: 221-228.
- Lambert, T. W.; Boland, M. P.; Holmes, C. F. B. & Hrudehy, S. E. 1994. Quantification of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.*, 28 (4): 753-755.
- Lawrence, J. F. & Menard, C. 2001. Determination of microcystin in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection

after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *J. Chromatography, A* 992: 111-117.

Lawton, L. A. & Edwards, C. 2001. Purification of microcystins. *J. Chromatogr.*, 912: 191–209.

Lazzaro, X. 1991. Feeding convergence in South American and African zooplanktivorous cichlids *Geophagus brasiliensis* and *Tilapia rendalli*. *Env. Biol. Fish.*, 31: 283-293.

Lazzaro, X. & F. L. R. M. Starling. 2005. Using Biomanipulation to Control Eutrophication in a Shallow Tropical Urban Reservoir (Lago Paranoá, Brazil). In: Reddy, M. V. (Ed.). *Restoration and Management of Tropical Eutrophic Lakes*. Science Publishers, Inc. Enfield. NH. USA, 361-388p.

Li, X. Y.; Chung, I. K.; Kim, J. I. & Lee, J. A. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to Microcystis under laboratory conditions. *Toxicon*, 44: 821-827.

Li, L.; Xie, P. & Chen, J. 2005. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.- inject with extracted microcystins. *Toxicon*, 46: 533-545.

Lowe-McConnell, R. H. 1982. Tilapias in fish communities, In: R. S. V. Pullin & R. A. Lowe-McConnell (eds.). *The Biology and Culture of Tilapias*. ICLARM Conference Proceedings, 7: 83-113.

MacKintosh, C.; Beattie, K. A.; Klumpp, S.; Cohen, P. & Codd G. A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants *FEBS Letters*, 264 (2): 187-192.

Magalhães V. F., Soares R. M. & Azevedo S. M. F. O. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro,



Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39: 1077-1085.

Magalhães V. F., Marinho M. M., Domingos P., Oliveira A. C., Costa S. M., Azevedo L. O. & Azevedo S. M. F. O. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42(3): 289-295.

Malbrouk, C.; Trausch, G.; Devos, P. & Kestemont, P. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile gold fish *Carassius auratus* L. comparative Biochemistry and Physiologic Part C. *Toxicol. Pharmacol.*, 135 (1): 35-48.

Matthiensen, A.; Yunes, J. S. & Codd, G. A. 1999. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Rev. Brasil. Biol.*, 59(3): 361-376.

Mattos, S. P. & Starling, F. L. R. M. 2001. Comunidade fitoplanctônica do lago Paranoá. In: Fonseca, F. O. Olhares sobre o lago Paranoá. 1ª Edição. Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Brasília, 83-84.

Mattos, S. P.; Estuqui, V. R. & Cavalcanti, C. G. B. 1997. Lake Paranoá (Brazil): Limnological aspects with emphasis on the distribution of zooplanktonic community (1982 to 1994). *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 542-547.

McElhiney, J. & Lawton, L. A. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 219-230.

Menezes-Júnior, A.; Sinoti, M. L. & Saraiva, R. C. F. 2001. II- Histórico. In: Fonseca, F. O. Olhares sobre o lago Paranoá. 1ª Edição. Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Brasília, 25-43.

- Miller, M. C. 3rd; Mohrenweiser, H. W. & Bell, D. A. 2001. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, 120: 269-280.
- Minillo, A.; Ferreira, A. H. F.; Yogui, G. T. & Yunes, J. S. 2000. Concentrações de microcistinas e toxicidade nas formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da Lagoa dos Patos, RS. IN: Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira-Neto, A. L. *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*, São Carlos, RiMa. 521-536.
- Mohamed, Z. A. 2001. Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50: 4-8.
- Mohamed, Z. A. & Hussein, A. A. 2006. Depuration of microcystin in tilapia fish exposed to natural population of toxic cyanobacteria: a laboratory study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 63: 424-429.
- Mohamed, Z. A.; Carmichael, W. W. & Hussein, A. A. 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.*, 18: 137–141.
- Molica, R. & Azevedo, S. 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecol. Bras.*, 13(2): 229-246.
- Monteiro, N.J.C., Boher, M.B.C. & Yunes, J.S. 1998. Avaliação preliminar da toxicidade de cianobactérias da lagoa dos patos em testes com *Daphnia similis*. Colóquio Brasileiro Sobre Algas Nocivas, Itajaí, 5 a 8 de outubro, 66p.
- Moreno, I.; Repetto, G.; Carballal, E.; Gago, A. & Camean, A. M. 2005. Cyanobacteria and microcystins occurrence in the Guadiana River (SW Spain). *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 85 (7): 461-474.

- Nishiwaki-Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Sugunuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W. W. & Fujiki, H. 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, 118:420-424.
- Northcott, M. E.; Beveridge, M. C. M. & Ross, L. G. 1991. A laboratory investigation of the filtration and ingestion rates of tilapia, *Oreochromis niloticus*, feeding on two species of blue-green algae. *Environ. Biology of Fishes*, 31: 75-85.
- Okeyo, D. O. 1989. Herbivory in freshwater fishes: a review. *Bamidgeh*, 41 (3): 79-97.
- Oliveira, L. P. H. & L. Krau. 1970. Hidrobiologia geral aplicada particularmente à veiculadores de esquistossomos - hipertrofia, mal moderno das águas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 68: 89-118.
- Ozawa, K.; Yokoyama, A.; Ishikawa, K.; Kumagai, M.; Watanabe M. F.; Park, H. D. 2003. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *The Japanese Society of Limnology*, 4:131–138.
- Paerl H. W. & Millie, D. F. 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35(6): 160-167.
- Pereira, C. E. B. & Cavalcanti, C. G. B. 1996. Lago Paranoá - Rumo à Recuperação. XXII Assembléia Nacional da ASSEMAE. Belo Horizonte, Brazil, 18 p.
- Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Oberemm, A.; Beattie, K. A.; Krause, E.; Codd, G. A. & Steinberg, C. E. W. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1425 (3): 527-533.

- Philomeno, M. G. 2003. A estrutura da comunidade fitoplanctônica em dois períodos sazonais no Lago Paranoá, Brasília- DF. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 103p.
- Philomeno, M. G. 2007. A comunidade fitoplanctônica e a restauração do Lago Paranoá, Brasília- DF. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, 669p.
- Teixeira-Pinto, M.; Cavalcanti, C. G. B. & Ludovice, M. 1999. A evolução do processo de eutrofização do lago Paranoá – Brasília, após cinco anos de controle nas descargas de nutrientes. Livro de resumos do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES). Rio de Janeiro, 2325-2336.
- Prepas, E. E. ; Kotak, B. G.; Campbell, L. M. ; Evans, J. C.; Hrudey, S. E. & Holmes, C. F. B. 1997. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54: 41-46.
- Prieto, A. I.; Jos, A.; Pichardo, S.; Moreno, I. & Cameán, A. M. 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins -LR and -RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). Aquatic Toxicology, 77: 314–321.
- Raberg, C. M. I.; Bylund, G. & Eriksson, J. E. 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquat. Toxicol., 20: 131-146.
- Rebouças, A. C. 2006. Água doce no mundo e no Brasil. IN: Rebouças, A. C.; B. B. Braga & J. G. Tundisi. Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Conservação. 3ª Edição. Escrituras. São Paulo, 1-35.

- Ribeiro, M. C. L. B.; Starling, F. L. R. M.; Walter, T. & Farah, E. M. 2001. Peixes. IN: Fonseca, F. O., Olhares sobre o Lago Paranoá. 1ª Edição. Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Brasília, 121-128.
- Rinehart, K.L.; Namikoshi, M. & Choi, B.M. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6: 159.
- Runnegar, M. T. C. & Falconer, I. R. 1986. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 24(2): 109-115.
- Sahin, A.; Tencalla, F. G.; Dietrich, D. R. & Naegeli, H. 1996. Biliary excretion of biochemically active cyanobactéria (blue-green algae) hepatotoxin in fish. *Toxicology*, 106: 123-130.
- Shen, Q.; Hu, J.; Li, D. H.; Wang, G. H. & Liu, Y. D. 2005. Investigation on intake, accumulation and toxicity of microcystin in silver carp. *Fresenius Environ. Bull.*, 14: 1124-1128.
- Silvonen, K. & Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, Bartram, editors. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO.
- Sipiä, V.O.; Kankaanpää, H. T.; Pflugmacher, S.; Flinkman J.; Furey, A. & James, K. J. 2001. Bioaccumulation and Detoxication of Nodularin in Tissues of Flounder (*Platichthys flesus*), Mussels (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*), and Clams (*Macoma balthica*) from the Northern Baltic Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 305-311.
- Skulberg, O. M.; Codd, G. A. & Carmichael, W. W. 1984. Toxic blue-green algal a growing. *Ambio*, 13 (4): 244-247.

- Soares, R. M.; Magalhães, V. F. & Azevedo, S. M. F. O. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxin) in *Tilapia rendalli* (Cichilidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 70: 1-10.
- Song, L.; Chen, W.; Peng, L.; Wan, N.; Gan, N. & Zhang, X. 2007. Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Water Research*, 41: 2853-2864.
- Sperling, M. V. 1996. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. DESA-UFMG, 243p.
- Starling, F. L. R. M. 1993. Control of eutrophication by silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the tropical Paranoá reservoir (Brasília, Brazil): a mesocosm experiment. *Hydrobiologia*, 257: 143-152.
- Starling, F. L. R. M. 1998. Development of biomanipulation strategies for remediation of eutrophic problems in urban reservoir, Lago Paranoá, Brazil. Tese de doutorado. Institute of Aquaculture. University of Stirling, 226p.
- Starling, F. L. R. M. & Lazzaro, X. 1997. Experimental investigation of the feasibility of improving water quality by controlling exotic planktivore overpopulation in the eutrophic Paranoá Reservoir. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 789-794.
- Starling, F. L. R. M. & Lazzaro X. T. 2001. Controle da Eutrofização em Lagos e Reservatórios Tropicais por Biomanipulação - Estudo de Caso: Lago Paranoá (Brasília, Brasil). In: De Bernardi, R. & G. Giussani (Eds.) *Biomanipulação para o Gerenciamento de Lagos e Reservatórios – Diretrizes para o Gerenciamento de Lagos – Volume 7. ILEC/IIE*, 203-221.

Starling, F. L. R. M. & Rocha, A. J. A. 1990. Experimental study of the impacts of planktivorous fishes on plankton community and eutrophication of a tropical Brazilian reservoir. *Hydrobiologia*, 200/201: 581-591.

Starling, F.L.R.M., Lazzaro X., Walter T. & Ribeiro M. 2000. Large-scale extensive tilapia production in a tropical eutrophic reservoir (Lago Paranoá, Brasília, Brazil): environmental and socio-economical benefits from biomanipulation. Proc. 5th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Rio de Janeiro, Brazil, 03 a 07 de setembro.

Starling, F. L. R. M.; Lazzaro, X.; Cavalcanti, C. & Moreira, R. 2002. Contribution of omnivorous tilapia to eutrophication of a shallow tropical reservoir: evidence from a fish kill. *Freshwat. Biol.*, 47: 2443-2452.

Starling, F. L. R. M.; Ferreira, J.; Paula, R.; Bittencourt, L. C.; Matsuda, S. T.; Birbeire M. & Arcoverde, C. E. 2003. VI-068 - Monitoramento da pesca ecológica da tilápia como estratégia de manejo para a preservação da qualidade da água de represa urbana de usos múltiplos (Lago Paranoá, Brasília-DF). 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Starling, J. E. M. O & Starling, F. L. R. M. 2009. Avaliação de microcistinas em carpas prateadas (*Hypophthalmichthys molitrix*) cultivadas para o controle da eutrofização no Lago Paranoá (Brasília-DF). XII Congresso Brasileiro de Limnologia. *Ecotoxicologia*, 46.

Strange, R. C.; Spiteri, M. A.; Ramachandrans, S. & Fryer, A. A. 2001. Glutathione-S-transferase family enzymes. *Mutation Research*, 482: 21-26.

Straskraba, M. & Tundisi, J. G. 1999. Reservoir Water Quality Management. Guidelines of Lake Management. Volume 9. International Lake Environmental Committee Foundation, Japan. 229 p.

- SUDEPE. 1980. Estudo do potencial pesqueiro do Lago Paranoá. Annual Report from Brazilian Agency for Fisheries Development (SUDEPE). 58p.
- Tencalla, F., Dietrich, D., 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*. 34: 583–595.
- Teixeira, M. G. L. C.; Costa, M. C. N.; Carvalho, V. L. P. Pereira, M. S. & Hage, E. 1993. Epidemia de gastroenterite na área da Barragem de Itaparica, Bahia. *Bol. of Sanit. Panam.*, 114(6): 502-511p.
- Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; Von Dohren, H.; Borner, T. & Neilan, B. A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, 7: 753-764.
- Tsukamoto, R. Y & Takahashi, N. S. 2007. Cianobactérias + Civilização = Problemas para a Saúde, a Aqüicultura e a Natureza. *Panorama da Aqüicultura*, 24-33..
- Tundisi, J. G. 2003. Água no Século XXI: enfrentando a escassez. Editora RIMA/IIIE. São Carlos. São Paulo, 247p.
- Tundisi, J. G.; Tundisi, M. T.; Abe, D. S.; Rocha, O. & Starling, F. L. R. M. 2006. Limnologia de Águas Interiores: interações, impactos, conservação e recuperação de ecossistemas aquáticos. IN: Rebouças, A. C.; Braga, B. & Tundisi, J. G. Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Conservação. 3ª Edição, Escrituras, São Paulo: 203-240.
- Ueno, Y.; Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Watanabe, M. F.; Park, H. D.; Chen, G. C.; Chen, G. & Yu, S. Z. 1996 Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17: 1317-1321.



- UNEP. 1999. Planning and Manegement of Lakes and Reservoirs, na integrated approach to eutrophication. Technical Publication Series 11. International Environmental Technology Center,Osaka/Shiga, Japan. 375p.
- Vanderploeg, H. A.; James R.; Liebig, J. R.; Carmichael, W. W.; Agy, M.A.; Johengen, T. H.; Fahnenstiel, G. L. & Nelepa, T. F. 2001. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic Microcystis blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 58: 1208-1221.
- Vollenweider, R. A. & Kerekes, J. J. 1981. Background and summary results of the OECD cooperative program on eutrophication . In restoration of Lakes and Inland Waters, EPA/ 440/5-81-010: 25-36
- Walter, T. 2000. Ecologia da Pesca Artesanal no Lago Paranoá: Brasília. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – USP. São Carlos, 230p.
- Wiegand, C.; Pflugmacher, S.; Oberemm, A.; Meems, N.; Beattie, K. A.; Steinberg, C. E. W. & Codd, G. A. 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxification enzymes of early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol., 14: 89-95.
- Williams, D. E.; Kent, M. L.; Andersen, R. J.; Klix, H. & Holmes, C. F. B. 1995. Tissue distribution and clearance of tritium labeled dihydromicrocystin-LR epimers administrated to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. Toxicon, 33: 125-131.
- Williams, D. E.; Dawe, S. C.; Kent M. L.; Andersen, R. J.; Craig, M.; Holmes, C. F. B. 1997a. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicon, 35: 1617-1625.

- Williams, D. E.; Craig, M.; Dawe, S. C.; Kent, M. L.; Andersen, R. J.; Holmes C. F. B. 1997b.  $^{14}\text{C}$  labeled microcystin-LR administrated to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicol*, 35: 985-989.
- Wilson, A. E.; Gossiaux, D. C.; Hoöök, T. O.; Berry, J. P.; Landrum, P.F.; Dyble, J. & Guildford, S. J. 2008. Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 65: 1487-1497.
- Xavier, C. F.; Dias, L. N. & Brunkow, R. F. 2005. Eutrofização. In: Andreoli, C. V. & Carneiro, C. Gestão integrada de Mananciais de abastecimento eutrofizados. Ed. Grafica Capital Ltda, FINEP. 273-302.
- Xie, L. Q.; Xie, P.; Ozawa, K.; Honma, T. Yokoyama, A. & Park, H. D. 2004. Dynamics of microcystin-LR and -RR in the phitoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution*, 127: 431-439.
- Xie, L.; Xie, P.; Guo, L.; Li, L.; Miyabara, Y. & Park, H. D. 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology*, 20: 293–300.
- Zhao, M.; Xie, S.; Zhu, X.; Yang, Y.; Gan, N. & Song, L. 2006. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 261: 960-966.
- Zhang, X.; Xie, P.; Hao, L.; Guo, N.; Gong, Y.; Hu, X.; Chen, J. & Liang, G. 2006. Effects of the phitoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) on plankton and the hepatotoxic microcystins in na enclosure

experiment in a eutrophic lake, Lake Shichahai in Beijing. *Aquaculture*, 257: 173-186.

Zhang, D.; Xie, P.; Liu, Y. & Qiu, T. 2009. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the total environment*, 407: 2191-2199.

Zurawell, R. W.; Chen, H.; Burke, J. M. & Prepas, E. E. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of Microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health B.*, 8: 1- 37.

Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria N.º 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.

Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução N.º 20, de 18 de junho de 1986.** Resolve estabelecer a seguinte classificação das águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional.

<http://maps.google.com.br/maps?hl=ptBR&source=hp&q=lago%20Paranoá&aql=&oq=&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=il> acesso dia 15/02/2010.