

Cianotoxinas em um manancial dominado por *Cylindrospermopsis raciborskii* e a avaliação da toxicidade aguda deste ambiente⁽¹⁾

Débora Monteiro Brentano⁽²⁾; Gabriela Correa Cardoso⁽³⁾; Bruna Souza⁽⁴⁾

Resumo Expandido

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do Edital nº 12, da Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação.

⁽²⁾ Professor; IFSC; Florianópolis, SC; brentano@ifsc.edu.br; ^(3,4) Estudantes do Curso Técnico de Meio Ambiente; IFSC;

RESUMO: A floração de cianobactérias é um problema por afetar mananciais de abastecimento público. Muitas cianobactérias, como a *Cylindrospermopsis raciborskii* são potencialmente produtoras de toxina. A avaliação desta produção pode ser mensurada através de efeitos sobre o zooplâncton, por exemplo. O presente trabalho avaliou a toxicidade aguda da água bruta da Lagoa do Peri, relacionando-a com a produção de cianotoxinas “in locu” e com a porção intra ou extracelular. A água da Lagoa do Peri foi amostrada mensalmente, durante um ano, e submetida a testes de toxicidade aguda com a amostra bruta, filtrada e sonicada. Utilizou-se como organismo-teste o microcrustáceo *Daphnia magna*. Posteriormente, a concentração de toxinas dissolvidas mensurada para a Lagoa do Peri foi relacionada à toxicidade aguda. Observou-se que a amostra bruta provocou toxicidade aguda ao organismo-teste *Daphnia magna* em todos os meses testados e foi considerado significativamente maior que a toxicidade provocada pela amostra sonicada ($P=0,0042$). A amostra filtrada não provocou toxicidade ao organismo-teste em qualquer mês, diferindo das demais. A relação entre a concentração de cianotoxinas dissolvida na Lagoa do Peri e a toxicidade aguda da amostra bruta para *Daphnia magna* é fraca, o que aponta para o fato de que o efeito sobre o zooplâncton deve-se a toxina presente no meio intracelular e/ou ao efeito mecânico ocasionado pelo tricoma alongado das cianobactérias. Dentre as toxinas, STX apresentou a maior concentração para o período, diferindo significativamente da concentração de MCYST e CYL ($P<0,0001$). Não se observou relação entre a sazonalidade e a toxicidade aguda.

Palavra Chave: cianobactéria, *Daphnia magna*, abastecimento público.

INTRODUÇÃO

A Lagoa do Peri é um manancial que vem sendo utilizado pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), desde o ano 2000, para abastecimento de 102 a 113 mil habitantes na Ilha de Santa Catarina (Pereira e Zanin, 2012).

Ocorre que diversas pesquisas sobre a comunidade fitoplantônica da Lagoa do Peri tem registrado a presença constante da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* desde 1996, com crescente aumento de densidade (Komárková *et al.*, 1999; Laudares-Silva, 1999; Grellmann, 2006).

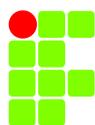
Ohtani *et al.* (1992) pela primeira vez isolaram, a partir desta cianobactéria, um alcaloide incomum, a cilindrospermopsina (CYN). A citotoxina CYN é inibidora da síntese de proteínas, o que provoca lesão necrótica generalizada em mamíferos que afeta órgãos como fígado, rins, pulmões, baço e intestino (Nogueira, 2006). Recentemente, provou-se mutagenicidade provocada por CYN através de evidências *in vitro* e também observou-se

evidências para a sua carcinogenicidade *in vivo* (Humpage *et al.*, 2000; Falconer e Humpage, 2001).

Cepas brasileiras de *C.raciborskii* isolada demonstraram-se produtoras também de saxitoxinas (STX) (Lagos *et al.*, 1999; Molica *et al.*, 2002, 2005). Saxitoxinas podem ser altamente tóxicas para os animais e, em doses elevadas o suficiente, letais para humanos (Landsberg, 2002).

Atualmente sabe-se que diferentes cepas de *C. raciborskii* podem produzir cianotoxinas diferentes e a simples presença de cianobactérias não é condição determinante para a presença de cianotoxinas.

Neste contexto, Ferrão-Filho *et al.* (2010) propôs o uso de testes de toxicidade com *Daphnia* como método eficaz para a detecção de toxinas em água bruta. Moser (2011) avaliou a toxicidade da Lagoa do Peri, utilizando como representante do zooplâncton, *Daphnia magna*. Os resultados mostraram toxicidade aguda para *Daphnia magna* e efeitos genotóxicos induzindo a formação de



micronúcleos em peixes e cultura celular, bem como a formação de cometas em peixes.

O presente trabalho avaliou a toxicidade aguda da água bruta da Lagoa do Peri, relacionando-a com a produção de cianotoxinas “in locu” e com a porção intra ou extracelular.

METODOLOGIA

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Ecotoxicologia do IFSC, tendo como parceiro o Laboratório de Ecologia de Águas Continentais da UFSC e área de estudo a Lagoa do Peri, durante o período de 12 meses.

A Lagoa do Peri, localizada entre as latitudes sul 27°42’59” e 27°46’45” e as longitudes oeste 48°30’33” e 48°31’59”, está situada 3 m acima do nível do mar, com o qual se conecta através de um canal de sentido único lagoa→mar (Canal Sangradouro) (Laudares-Silva, 1999; Oliveira, 2002).

Foram realizadas três coletas por estação do ano, em um ponto central de máxima profundidade da Lagoa do Peri, totalizando 12 coletas, onde coletou-se 500mL para análise de toxicidade aguda em cada momento de coleta, na profundidade de extinção do disco de Secchi.

O organismo-teste eleito para avaliação de toxicidade aguda foi o microcrustáceo *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea). O objetivo deste teste foi determinar a concentração da amostra que produz um efeito deletério na população exposta durante um curto período de tempo sob condições controladas (Rand, 1995).

O teste consistiu na exposição de neonatos (2 a 26h) de *D. magna* a diluições diferentes da amostra teste e a um controle (meio de cultivo convencional), durante o período de 48h e foi realizado conforme NBR 12713 (ABNT, 2009). Foram expostos 20 indivíduos por diluição, sendo colocados 10 organismos em cada becker de 25 mL. O resultado foi expresso em CE(I)50 48h (concentração efetiva inicial mediana), utilizando-se os métodos estatísticos Probit Method (Weber, 1993) para dados paramétricos e Trimmed Sperman-Karber Method (Hamilton *et al.*, 1977) para dados não paramétricos que representaram o efeito agudo (imobilidade) sobre 50% da população exposta a amostra. Os resultados também foram expressos como FT – Fator de Toxicidade.

Os testes foram realizados com amostra bruta; filtrada ($\varnothing=0,7 \mu\text{m}$), para a avaliação da toxicidade

do meio extracelular; e sonicada (42KHz), visando a avaliação da toxicidade do meio intra e extracelular.

Os valores da concentração de cianotoxinas foram obtidos junto ao Ministério Público e gerados pela Companhia Catarinense de Água e Saneamento – CASAN.

As análises estatísticas foram realizadas com o Programa Computacional R (R Core Team, 2013) e como programa Statistica 8.0 (Statsoft, 2007). A diferença de toxicidade aguda entre as amostras bruta e sonicada foi testada através do teste t de Student. Comparou-se a variância da concentração das diferentes cianotoxinas entre si e no tempo utilizando ANOVA. Relacionou-se o FT e a concentração de cianotoxinas por um período de seis meses (out/2013 a março/2014) através de Análise de Componentes Principais – PCA para visualizar a relação entre a toxicidade aguda da amostra bruta e a concentração de cianotoxinas no meio extracelular. Além das toxinas de interesse SXT e CYN, trabalhou-se também com microcistina (MCYST).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra bruta provocou toxicidade aguda ao organismo-teste *Daphnia magna* em todos os meses testados. O FT variou de 4 a 16 e foi considerado significativamente maior que a toxicidade provocada pela amostra sonicada ($P=0,0042$), cujo FT variou de 1 a 8. A amostra filtrada não provocou toxicidade ao organismo-teste em qualquer mês, diferindo das demais (Tabela 1).

Tabela 1 – Toxicidade aguda para o organismo-teste *Daphnia magna* frente a amostra da Lagoa do Peri bruta, filtrada e sonicada.

Data	Água Bruta		Água Filtrada		Água Sonicada	
	CE(I)50 48h %	FT	CE(I)50 48h %	FT	CE(I)50 48h %	FT
17/07/2013	NA	>1	NA	NA	NA	NA
21/08/2013	NA	>16	não tóxica	1	NA	NA
24/09/2013	NA	>16	não tóxica	1	NA	NA
15/10/2013	70,7	>16	não tóxica	1	NA	8
19/11/2013	NA	4	não tóxica	1	NA	4
10/12/2013	30,6	8	não tóxica	1	NA	1
22/01/2014	16,3	16	não tóxica	1	NA	8
18/02/2014	11,4	16	não tóxica	1	20,2	8
18/03/2014	34,6	16	não tóxica	1	44,9	8

NA= dado não disponível

O fato de a amostra bruta da Lagoa do Peri apresentar efeito sobre o zooplâncton e a filtrada não, evidencia que tal efeito não é oriundo apenas da concentração de toxinas do meio extracelular. A filtração remove as células de cianobactérias, mas a porosidade do filtro permite a passagem das toxinas dissolvidas.

Diante desta observação, não se descarta a ação mecânica descrita na literatura. Os filamentos de cianobactérias, na maioria das vezes, são grandes demais para serem ingeridos pelas espécies zooplanctônicas, o que pode causar uma diminuição na eficiência alimentar desses organismos (Gliwicz e Lampert, 1990) e também bloquear o seu aparato de filtração (DeMott *et al.*, 2001).

Contudo, a ação mecânica levaria a um efeito crônico de difícil identificação em 48h. Assim, suspeita-se da presença das toxinas no meio intracelular. A herbivoria pode liberar as toxinas do meio intracelular, provocando efeito tóxico, o mesmo observado para a amostra sonicada.

Este aspecto ratifica a relação fraca encontrada no ordenamento por PCA (PC1=1,3; 64,9% e PC2=1,0; 23,1%) entre a concentração de cianotoxinas na Lagoa do Peri e a toxicidade aguda da amostra bruta para *Daphnia magna*, quando são plotados nos eixos a concentração de cianotoxinas e a toxicidade aguda encontrada (Figura 1).

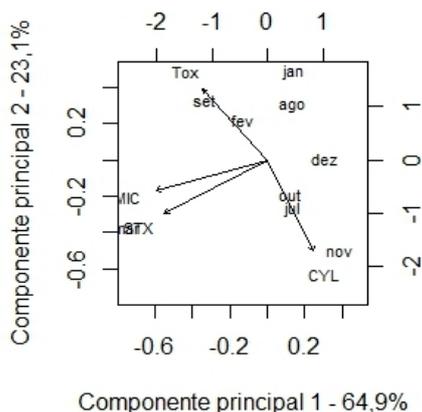


Figura 1 – Relação de ordenamento entre a concentração de cianotoxinas na Lagoa do Peri e a toxicidade aguda da amostra bruta para *Daphnia magna*.

Dentre as toxinas, STX apresentou a maior concentração para o período, diferindo significativamente da concentração de MCYST e CYL ($P < 0,0001$), conforme se pode observar na figura 2.

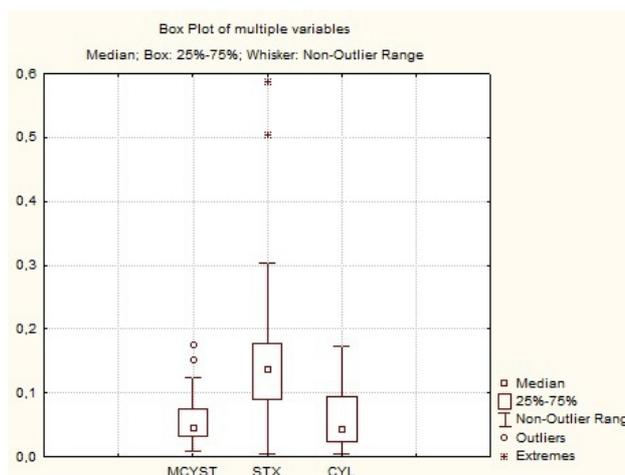


Figura 2 – Concentração de cianotoxinas na Lagoa do Peri para o período de estudo.

No outono, registrou-se as maiores concentrações de cianotoxinas ($0,19 \pm 0,17 \mu\text{g.L}^{-1}$), com diferença das demais estações ($P < 0,0001$) seguido da primavera ($0,10 \pm 0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$), inverno ($0,09 \pm 0,06 \mu\text{g.L}^{-1}$) e verão ($0,06 \pm 0,04 \mu\text{g.L}^{-1}$). Não se observou relação entre a sazonalidade e a toxicidade aguda.

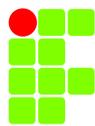
O prosseguimento deste trabalho demanda relacionar efeitos sobre o zooplâncton com a concentração de toxinas do meio intracelular e com a densidade de *C. raciborskii*, para isolar a ação do efeito mecânico, não sendo conclusivo até o momento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSC pelo financiamento da pesquisa; à Bióloga Cláudia Ariane Gomes da Fonseca pelo apoio laboratorial; à Prof^a Cristiane Felisbino Silva pelo apoio ao projeto; à Acadêmica do Curso de Meio Ambiente Calini Moser Zacchi; à equipe do Laboratório de Ecologia de Águas Continentais da UFSC; e, ao Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce.

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2009. 23 p.
- DEMOTT W. R., 1995. Optimal foraging by a suspension-feeding copepod: responses to short-term and seasonal variation in food resources. *Oecologia*, 103, 230-240.



- FERRÃO-FILHO, A.; SOARES, M. C. S.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F.O. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollution** 158 (2010) 2084 a 2093.
- GLIWICZ, Z. M. & W. LAMPERT, 1990. Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. *Ecology*, 71(2): 691-702.
- GRELLMANN, C. (2006). **Aspectos da morfologia e ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszinska) Seenayya ET Subba Raju e produção de cianotoxinas na Lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. (M.Sc. Thesis).
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for calculation of EC50 and LC50 values in bioassays. **Burlington research inc. fci. tecnol.** n. 11, v. 7, p. 114-119. 1977.
- HUMPAGE, A.R., FENECH, M., THOMAS, P., FALCONER, I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutat. Res.** 472, 155–161.
- KOMÁRKOVÁ J, LAUDARES-SILVA R, SENNA PAC. 1999. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, **Brazil. Algological Studies** 94:207-222.
- LAGOS, N., ONODERA, H., ZAGATTO, P.A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S.M.F.O., OSHIMA, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon** 37, 1359 e1373.
- LANDSBERG, J.H., 2002. Saxitoxins. In: STICKNEY, R.R. (Ed.), *The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. Reviews in Fisheries Science*, vol. 10, pp. 191e204.
- LAUDARES-SILVA R. 1999. **Aspectos limnológicos, variabilidade espacial e temporal na estrutura da comunidade fitoplanctônica da Lagoa do Peri, Santa Catarina, Brasil.** Dissertação, Universidade de São Carlos.
- MOLICA, R.J.R., OLIVEIRA, E.J.A., CARVALHO, P.V.V.C., COSTA, A.N.S.F., CUNHA, M.C.C., MELO, J.L., AZEVEDO, S.M.F.O., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycology** 41, 606e611.
- MOLICA, R.J.R., OLIVEIRA, E.J.A., CARVALHO, P.V.V.C., COSTA, A.N.S.F., CUNHA, M. <http://www.R-project.org/C.C.>, Melo, J.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae** 4, 743e753.
- MOSER, M. C. **Avaliação ecotoxicológica do Manancial da Lagoa do Peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – Florianópolis – SC – Fevereiro, 2011. 125p.
- NOGUEIRA, I. C. G; LOBO-DA-CUNHA, A.; VASCONCELOS, V. M. 2006. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. **Aquatic Toxicology** 80 (2006) 194–203.
- OHTANI, I., MOORE, R.E., RUNNEGAR, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **J. Am. Chem. Soc.** 114,7941–7942.
- OLIVERA, J. S. 2002. **Análise sedimentar em zonas costeiras: subsidio ao diagnóstico ambiental da Lagoa do Peri - Ilha de Santa Catarina - SC, Brasil.** Florianópolis. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina.
- PEREIRA, A. ; ZANIN, V. C. **Os mananciais da Ilha. CASAN – Companhia Catarinense de Água e Saneamento.** 2012. Disponível em: <http://novo.casan.com.br/menuconteudo/index/url/manancias-da-ilha#1031>. Acessado em março de 2014.
- R Core Team. **R: A Language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria. 2013. URL .
- RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995. 1125p.
- STATSOFT. **Statistica 8.0.** Software package. 2007.
- WEBER, C. I. **Method for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms.** Cincinnati, Ohio: EPA, 1993. 253p.