

Eixo Temático ET 06-007 - Poluição Ambiental

OCORRÊNCIAS DE MICROCISTINAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, HISTÓRICO, LEGISLAÇÃO E MÉTODOS DE ANÁLISES

Maria Virgínia da Conceição Albuquerque¹, Amanda da Silva Barbosa Cartaxo¹,
Maria Célia Cavalcanti de Paula e Silva¹, Catarina Simone Andrade do Canto²,
Valderi Duarte Leite³, Wilton Silva Lopes³

¹Bióloga, Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental - UEPB.

²Dra. em Engenharia Química - USFCar.

³Prof. Dr. do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UEPB.

RESUMO

As microcistinas são as hepatotoxinas mais relatadas na literatura científica, sendo reportadas em grande parte do mundo, nomeadamente em vários países da Ásia, América do Norte, Leste da Europa e Norte de África. Estas cianotoxinas são classificadas como heptapeptídeos cíclicos, os quais possuem em comum a estrutura cíclica, contendo cinco aminoácidos fixos, e dois aminoácidos variáveis. Os fatores que levam à formação da toxina ainda não são conhecidos. Há fortes indícios de correlação entre a formação desta e a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio. Diante disso, este estudo, objetivou levantar mais informações sobre o tema da pesquisa – cianotoxinas, especificamente as microcistinas, envolvendo as características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. Utilizou-se como metodologia, a revisão de literatura de cunho qualitativo descritivo, que possibilitou um aprofundamento sobre o tema proposto, por meio das bases de dados: Web of Science, Scopus e na biblioteca eletrônica Scientific Electronic Library Online (SciELO). Diversos estudos já comprovaram que as cianotoxinas presentes em água destinadas ao abastecimento público não são removidas pelo sistema de tratamento convencional de água, além de poderem ter sua concentração aumentada durante o processo, em virtude da lise celular, principalmente do lodo acumulado nos decantadores, ocasionando a liberação de concentrações significativas dessas toxinas presentes no interior das células, onde dessa forma, a água “potável” funciona como fonte de exposição à população, fazendo-se necessário, o monitoramento da água de forma estabelecida pela Portaria de Consolidação nº 5, do anexo XX / 2017.

Palavras-chave: Eutrofização; Cianobactérias; Cianotoxinas.

INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico e a urbanização intensificaram as atividades antrópicas como a agricultura, a indústria, a mineração. Os descartes de resíduos sólidos causam impactos negativos sobre a qualidade dos recursos hídricos, principalmente dos reservatórios superficiais destinados ao abastecimento humano. Esgoto sem tratamento ou inadequadamente tratados, efluentes industriais e agrícolas, como fertilizantes químicos são despejados diretamente em corpos hídricos, alterando as características físico-químicas, biológicas e consequentemente seus usos (ESTEVES, 2011).

A eutrofização antrópica é comum em diversos países devido à ocupação desordenada das bacias hidrográficas e à poluição antropogênica. A urbanização, a agropecuária e o desmatamento aumentam a carga de nutrientes, especialmente nitrogênio inorgânico (nitrato, nitrito e amônia) e fósforo inorgânico (ortofosfato), nos reservatórios, contribuindo para uma maior ocorrência do processo de eutrofização em mananciais (OLIVER et al., 2012).

Um efeito associado à eutrofização e ao aumento da biomassa é a redução da diversidade fitoplanctônica e em consequência passam a predominar gêneros e espécies que se adaptaram melhor às condições eutróficas de elevadas concentrações de nutrientes, condutividade elétrica, pH e sombreamento, como as cianobactérias que crescem de forma abundante nas denominadas florações (VASCONCELOS, 2011).

A maior preocupação no que diz respeito às cianobactérias em corpos d'água não são as florações em si, mas sim a capacidade que algumas espécies têm de produzir metabólitos secundários tóxicos - cianotoxinas. Existem estudos que indicam que na mesma floração, pode haver tanto linhagens produtoras de toxinas como não produtoras, sendo que, até o presente momento, não há qualquer informação que explique o porquê deste fato (SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001).

Os fatores que levam à formação da toxina ainda não são conhecidos. Há fortes indícios de correlação entre a formação desta e a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio. As cianotoxinas, em sua maioria, são liberadas no meio aquático com a morte celular, ocasionando danos na biota aquática, desde intoxicação até a morte de animais e seres humanos (IBELINGS et al., 2007). São classificadas de acordo com sua estrutura química – apresentando peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos, ou conforme seu efeito toxicológico (ou sua biotoxicidade), sendo denominados dermatotóxicos, neurotóxicos ou hepatotóxicos.

OBJETIVO

Diante do exposto, este estudo faz uma descrição sobre as ocorrências de microcistinas em águas superficiais, avaliando suas características, histórico, legislação e métodos de análises.

METODOLOGIA

Com a finalidade de obter-se um perfil das publicações, este trabalho possui natureza exploratória-descritiva. É exploratória, uma vez que apresenta caráter preliminar e busca levantar mais informações sobre o tema da pesquisa – cianotoxinas, especificamente as microcistinas; e descritiva pois permitiu identificar características importantes desta área de conhecimento, envolvendo as características gerais, histórico, legislação e métodos de análises.

Para tanto, utilizou-se como metodologia, a revisão de literatura de cunho qualitativo descritivo, que possibilitou um aprofundamento sobre o tema proposto, sendo realizada uma busca bibliográfica por meio das bases de dados: Web of Science, Scopus e na biblioteca eletrônica Scientific Electronic Library Online (SciELO), em função de sua abrangência e efetividade, principalmente no que tange os temas desta pesquisa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microcistinas

As hepatotoxinas constituem um grupo de cianotoxinas notavelmente estudada nos últimos anos devido ao seu efeito nocivo que pode acometer diversos órgãos e tecidos de mamíferos e outras espécies de animais trazendo consequências fisiológicas e dano celular dos hepatócitos (METCALF et al., 2012). Os principais tipos de hepatotoxinas são as nodularinas, as cilindrospermopsinas e as microcistinas.

As microcistinas são as hepatotoxinas mais relatadas na literatura científica. Ocorrências de microcistinas foram reportadas em grande parte do mundo, nomeadamente em vários países da Ásia, América do Norte, Leste da Europa e Norte de África (FRISTACHI & SINCLAIR, 2008).

Classificadas como heptapeptídeos cíclicos, os quais possuem em comum a estrutura cíclica, contendo cinco aminoácidos fixos, (-D-Ala1-X2-D-MeAsp3-Y4-Adda5-D-Glu6-Mdha7), sendo D-Alanina (posição 1), ácido D-metil-aspartico (posição 3), Adda (3-amino-9-

metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6- ácido dienólico) (posição 5), Ácido D-glutâmico (posição 6) e N-metildehidroalanina (Mdha) (posição 7), e dois aminoácidos variáveis nas posições 2 (X) e 4 (Y), normalmente L-aminoácidos (BOTES et al., 1984; MSAGATI et al., 2006) que contribuem para as diferentes isoformas (WELKER & VON DÖHREN, 2006). A estrutura geral da microcistina-LR está apresentada na Figura 1.

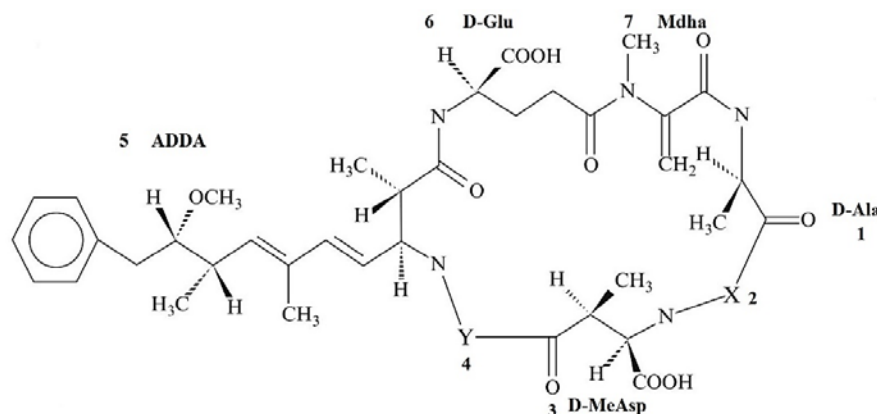


Figura 1. Estrutura geral da microcistina - LR. Fonte: METCALF et al. (2012).

A primeira identificação química desta hepatotoxina foi feita por Bishop et al. (1959), que a isolou de uma cultura de *Microcystis aeruginosa*, daí a origem do nome. A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael et al. (1988) e compreende um heptapeptídeo monocíclico extremamente estável e resistente a agentes químicos, hidrólise ou oxidação em pH próximo de neutro podendo permanecer ativa mesmo em temperaturas acima de 100 °C (ŠEJNOHOVÁ et al., 2012).

Existem mais de 90 análogos de microcistina diferenciadas pela constituição dos L-aminoácidos, nas posições “2” e “4” apresentando massa molar diferenciada (SCOTT et al., 2012). Dentre os análogos tóxicos mais frequentes destacam-se: MC– LR constituída dos aminoácidos leucina e arginina; MC–RR (arginina-arginina); MC–LA (leucina-alanina) e MC–YR (tirosina-arginina). A massa molecular das moléculas destas microcistinas variam de 1.038,20; 1.045,19; 995,17 e 910,06 para MC–RR, YR, LR e LA respectivamente, conforme se apresenta na Tabela 1.

Tabela 1. Principais variáveis da microcistina.

Variável	Massa molar (M)	Posição 4	Posição 2	Carga em pH 6,0-8,5
MC-YR	1045,19	Arginina	Tirosina	0 (--&++)
MC-RR	1038,20	Arginina	Arginina	-1 (--&+)
MC-LR	995,17	Arginina	Leucina	-1 (-- &+)
MC-LA	910,06	Alanina	Leucina	-2 (--)

Fonte: HO et al., 2011.

Um dos aspectos mais relevantes das microcistinas é o único aminoácido C20 (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-trimetildeca-4,6-dienólico) abreviado como Adda (Figura 5), que embora ele sozinho não seja tóxico, a estereoquímica e a hidrofobicidade da sua cadeia desempenham um papel fundamental na atividade biológica de MC-LR. (ANTONIOU et al., 2008). No entanto, a porção Adda é relatada como a principal responsável pela toxicidade da microcistina e a alteração da sua estrutura é um passo fundamental para a redução da toxicidade das toxinas que a possuem (ANDERSEN et al., 2014).

As microcistinas possuem habilidade limitada em atravessar membranas na ausência de um transporte ativo, sua entrada nos hepatócitos se dá por meio dos transportadores de ácidos biliares, causando inibição das enzimas fosfatases 1 e 2A, com consequente hiperfosforilação das proteínas e desorganização do citoesqueleto. Esta desorganização leva à retração dos hepatócitos, o que, por sua vez, acarreta na retração dos capilares e aumento dos espaços intercelulares, ao passo que o sangue passa a fluir por estes espaços formados, o que é capaz de provocar lesões teciduais e hemorragia hepática (PEGRAM et al. 2008, JI et al. 2011).

Estas toxinas não atuam somente como promotoras, mas também como agentes iniciadores de tumores por sua capacidade genotóxica, como apresentada pela microcistina-LR (ZEGURA et al., 2011). Contudo, não se sabe ainda quais são os mecanismos envolvidos na indução tumoral, pois há falta de modelos celulares para estudos de toxicidade in vitro. Nos casos de exposição recreacional, podem ocorrer irritações cutâneas e problemas gastrointestinais, a exemplo de complicações no fígado.

Plantas aquáticas e terrestres também podem sofrer efeitos ao serem expostas à microcistinas, uma vez que nelas também há a presença das fosfatases 1 e 2A. Bittencourt-Oliveira et al. (2014) descreveram vários relatos de redução de biomassa em plantas aquáticas expostas a estas toxinas, assim como redução na produção das fosfatases, estresse oxidativos, redução na atividade fotossintética e até apoptose celular em plantas terrestres. Outro aspecto relacionado à contaminação de plantas com microcistinas, corresponde à sua capacidade de bioacumulação nestes microrganismos, e possível biomagnificação na cadeia trófica. Deste modo, plantas irrigadas com água contaminada se tornam mais uma preocupação em relação à saúde pública, revelando outra fonte de exposição às toxinas.

No Brasil, o primeiro caso comprovado de presença de microcistinas ocorreu em um lago eutrófico na cidade de São Paulo, onde *Microcystis aeruginosa* foi coletada e isolada de uma floração ocorrida em junho de 1988. Observou-se que a cepa produzia duas variantes de microcistinas: LR e outra no LF - (AZEVEDO et al., 1994). Posteriormente, linhagens tóxicas de *Microcystis aeruginosa* foram reportadas em diversas regiões brasileiras (SÁ et al., 2010).

Legislação: padrões e limites nacionais para cianotoxinas

No Brasil, o primeiro relato de intoxicação por cianotoxinas ocorreu em 1988, quando, ao que tudo indica, cerca de 200 pessoas foram contaminadas por microcistina advinda de uma floração de cianobactérias presente na água do reservatório de Itaparica, na Bahia, levando 88 pessoas ao óbito (TEIXEIRA et al., 1993). A segunda tragédia em território nacional foi relatada em Caruaru, no estado de Pernambuco, onde se registrou a presença de microcistina na água utilizada para a lavagem dos aparelhos de hemodiálise do Instituto de Doenças Renais e também a presença de cilindrospermopsina (CYN) no carbono e resinas desses aparelhos. Esta água foi proveniente da represa Tabocas, onde havia floração de cianobactérias. Este triste episódio resultou na morte de 52 pacientes dos 101 que sofreram intoxicação (CARMICHAEL et al., 2001).

Esses incidentes contribuíram para alterações dos padrões de potabilidade com recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) culminando com a inserção de compostos novos como parâmetro de controle da qualidade para água de consumo humano, tendo em vista os riscos aos diversos efeitos tóxicos que esses compostos representam para a saúde pública. Seguindo os guias da OMS, no mundo todo, a determinação de microcistina é mais um parâmetro obrigatório de controle da qualidade da água para consumo humano e ainda diversos países já incorporaram outras cianotoxinas; no Brasil a situação é semelhante e a microcistina passou a ser um parâmetro obrigatório de análise na água de consumo, na Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde, que foi sucedida pela Portaria 518 de 29 de março de 2004, posteriormente substituída pela Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011, e então revogada Portaria de Consolidação nº 5, do anexo XX / 2017.

Esta Portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade determina o Valor Máximo Permitido (VMP) de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC, sendo que este valor inclui o somatório das concentrações

de todas as variantes de microcistinas na água para consumo humano e também determina o valor de 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ equivalente STX para saxitoxina (BRASIL, 2017).

A referida portaria estabelece o monitoramento mensal de microcistinas no reservatório quando o número de células de cianobactérias for inferior ou igual a 10.000 cel.mL^{-1} e monitoramento semanal quando este valor exceder 20.000 cel.mL^{-1} . Se houver cianotoxinas no manancial deverá-se realizar análise e identificar os gêneros de cianobactérias, no ponto de captação do manancial superficial, assim como comunicar imediatamente às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis.

Métodos de detecção e quantificação de cianotoxinas

Existem diversos métodos analíticos utilizados para detectar e quantificar cianotoxinas dissolvidas (fração extracelular) na água e em células de cianobactérias (fração intracelular). Esses métodos podem variar quanto ao nível de sofisticação bem como ao grau de informações que eles fornecem.

Métodos relativamente simples e com baixo custo podem ser usados para avaliar rapidamente o risco potencial e permitir a agilidade na tomada de decisões. Por outro lado, técnicas analíticas altamente sofisticadas podem ser aplicadas para determinar, com precisão, o tipo e quantidade de cianotoxinas. Tanto as técnicas, quanto as metodologias podem ser selecionadas dependendo dos equipamentos e do grau de especificidade, assim como, o tipo de informação requerida. Os métodos mais utilizados na quantificação e identificação de cianotoxinas compreendem os bioensaios, testes imunoenzimático (ELISA) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os bioensaios são testes de avaliação toxicológica realizados em animais ou grupo de células. Em geral, são utilizados para adquirir informações sobre a toxicidade, permitindo relacionar a presença de florações e os seus impactos no ambiente natural. Ainda que sejam capazes de oferecer uma triagem simples e rápida quanto à presença de cianobactérias, os bioensaios não possuem sensibilidade suficiente para detecção de uma cianotoxina específica, eles possuem apenas o potencial para correlacionar as classes de toxinas aos seus efeitos adversos. Estes testes devem, portanto, estar associados a técnicas qualitativas e quantitativas de análises de cianotoxinas, para a detecção específica da toxina. Além disso, o uso de animais, como camundongos, em testes de toxicidade tem sofrido implicações éticas, com fortes oposições públicas. Testes com animais invertebrados tais como *Daphnia sp.*, *Drosophila melanogaster*, *Artemia salina*, larvas de mosquito dentre outros, têm sido investigados, no entanto não apresentam especificidade e não são validados para o monitoramento de rotina (MCELHINEY E LAWTON, 2005, MOUNTFORT et al., 2005).

Outra metodologia utilizada em ensaios de detecção e quantificação de cianotoxinas, especialmente microcistinas e nodularinas, é o método imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Baseado em uma reação imuno-enzimática inversamente proporcional à concentração da toxina, este teste reporta valores de concentração de microcistina total de uma amostra, eliminando a necessidade de uma ampla faixa de padrões analíticos. O manuseio fácil e rápido, na forma de kits, permite a sua aplicação com o mínimo de treinamento técnico e simples processamento da amostra. Além disso, reporta análises de alto desempenho, com sensibilidade de detecção na faixa de ppb ($\mu\text{g.L}^{-1}$) os resultados podem ser obtidos em 90 minutos (RAPALA et al., 2002). Vários kits de teste de ELISA estão disponíveis comercialmente no mercado: Abraxis LLC, Pensilvânia Inc., EnviroLogix Inc., Strategic Diagnostic Inc., Wako Chemicals. Contudo, a possibilidade de reações cruzadas entre variedades de microcistinas têm colocado algumas restrições no uso destes kits, principalmente quando são avaliadas microcistinas hidrofóbicas (LAWTON et al., 2010). Trata-se ainda de uma técnica de custo elevado, o que inviabiliza a sua utilização na avaliação da qualidade de águas, principalmente nas comunidades de médio e pequeno porte. Além disso, os kits de diferentes fabricantes podem resultar em diferentes valores detectados (METCALF et al., 2012, ARANDA-RODRIGUEZ et al., 2015).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem se destacado nos últimos anos devido à alta sensibilidade de separação dos componentes do analito. Os métodos de separação por cromatografia em coluna implicam em interações físico-químicas entre os compostos presentes na amostra e a fase estacionária da coluna cromatográfica, e sua aplicação permite a análise qualitativa ou quantitativa de vários microcontaminantes de interesse ambiental. A cromatografia em coluna permite separar constituintes de uma mistura através de sua distribuição em duas fases: uma estacionária (fixa na coluna cromatográfica) e outra móvel (OEHRLE et al., 2010).

Ainda segundo Oehrle et al. (2010), nas análises de microcistinas é comum o uso de colunas de fase reversa C18, com separação realizada pelo gradiente de hidrofobicidade. Este gradiente abrange diferentes polaridades, permitindo a análise de todas as variantes de microcistinas. A identificação pode ser realizada por um detector ultravioleta combinado (CLAE-UV), ou por uma análise sequencial em espectrometria de massa (CLAE-EM). Embora a análise de toxinas por CLAE seja capaz de fornecer informações precisas e específicas sobre a identidade e a quantidade de cada variante de microcistina, na ordem de nanogramas, o método requer elevado custo, instrumentação e pessoal especializado, cuidados na preparação da amostra e a comparação com padrões da toxina.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) é uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para determinação de compostos orgânicos. Esta permite que compostos pré-separados sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade e sensibilidade, ou seja, os compostos eletricamente carregados, ou íons, são selecionados e medidos de acordo com a razão massa/carga (m/z), resultados da ação de campos elétricos ou magnéticos gerados na região do analisador do equipamento que, comumente, pode estar disposto em diferentes configurações. Um espectrômetro de massas é constituído de unidades fundamentais como: uma fonte de ionização, na qual são gerados os íons na fase gasosa, um analisador e um detector, conforme mostra, figura 2.

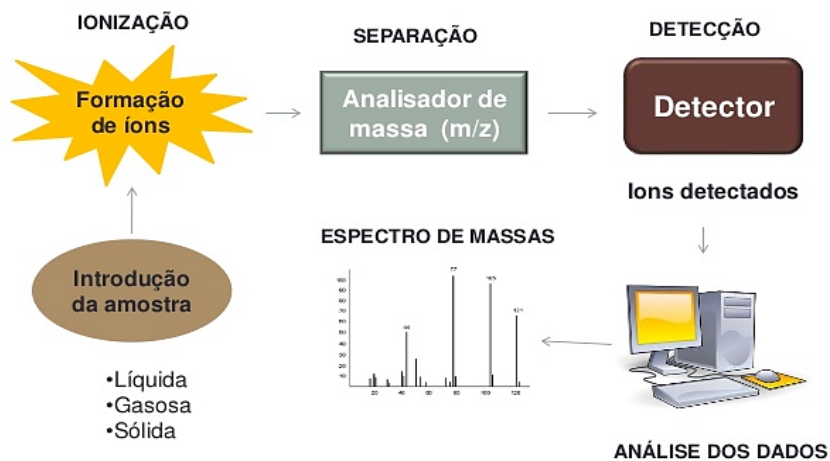


Figura 2. Unidades fundamentais de um espectrômetro de massas. Fonte: INMETRO (2016).

CONCLUSÃO

As cianobactérias têm apresentado dominância nos ambientes aquáticos e tendem a persistirem, tornando-se um problema preocupante, em virtude de vários gêneros serem capazes de formar florações e produzirem toxinas que podem afetar tanto a biota aquática como seres humanos. Vale ressaltar que diversos estudos já comprovaram que as cianotoxinas presentes em água destinadas ao abastecimento público não são removidas pelo sistema de tratamento ‘convencional de água, além de poderem ter sua concentração aumentada durante o processo,

em virtude da lise celular, principalmente do lodo acumulado nos decantadores, ocasionando a liberação de quantidades significativas das toxinas presentes no interior das células, onde dessa forma, a água “potável” funciona como fonte de exposição à população, fazendo-se necessário, o monitoramento da água de forma estabelecida pela Portaria de Consolidação nº 5, do anexo XX / 2017, a fim de evitar riscos potenciais adversos à saúde humana e garantir o controle da qualidade da água oferecida ao público.

Devido à grave hepatotoxicidade, à capacidade de bioacumulação e promoção tumoral, intrínsecas às microcistinas, bem como aos sinais frequentemente inespecíficos, pesquisas relacionadas a estas cianotoxinas devem ser incentivadas a fim de se detectar a contaminação de alimentos e da água destinada principalmente ao consumo humano e animal. É necessário evitar intoxicações por essas cianotoxinas, o contato com água possivelmente contaminada por cianobactérias e pela microcistina, pode ocasionar exposições crônicas e o desenvolvimento de carcinogênese hepática. Setores responsáveis pelo abastecimento de água pública devem estar diariamente atentos às florações em sistemas aquáticos de abastecimento público.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, J. et al. Revealing the degradation intermediates and pathways of visiblelightinduced NF-TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR, **Applied Catalysis B: Environmental** 154–155 259–266, 2014.
- ANTONIOU, M.G.; SHOEMAKER, J.A.; CRUZ, A.A.; DIONYSIOU, D.D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v.51, p.1103-1118, 2008.
- BISHOP, C. T.; ANET, E. F. L. J. & GORHAM, P. R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37: 453-471, 1959.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; HEREMAN, T. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; MACEDO-SILVA, I.; DIAS, C. T.; SASAKI, F. F. C.; MOURA, A. N. Phytotoxicity associated to microcystins: a review. **Brazilian Journal of Biology**. V. 74, n. 4, p. 753-760, 2014.
- BOTES, D. P.; TUIMAN, A. A.; WESSELS, P. L.; VILJOEN, C. C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D. H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R. J. & HAMMOND, S. J.. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions, v. 1: 2311-2318, 1984.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria de Consolidação nº 05/2017. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.
- CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.
- ESTEVEZ, F.A. Fundamentos de limnologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FRISTACHI, A. & SINCLAIR, J. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms: workgroup report. In: Hudnell, H. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. 1ª Ed., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: **Springer**, 45-103, 2008.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2016.

- JI, Y., LU, G., CHEN, G., HUANG, B., ZHANG, X., SHEN, K. & WU, S. Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF- κ B /iNOS **Pathway in INS-1 Cells.**, Int. J. Mol. Sci. , v. 12(7), 4722-4734. 2011
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.; CLARK, D.P. **Microbiology Brock**. 13. ed. Pearson Education, p. 2012.
- METCALF, J.S.; CODD, G.A. Cyanotoxins. In Freshwater Benthic Environments. In: WHITTON, B.A. (Org.) **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**, New York: **Springer**, p.1-13, 2012.
- MSAGATI, T. A.; SIAME, B. A. & SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78: 382-397, 2006.
- MOUNTFORT, D.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. **Toxicon**. v. 45. p. 199-206, 2005.
- OEHRLE, S.A.; SOUTHWELL, B. AND WESTRICK, J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 55. p. 965-972, 2010.
- PEGRAM, R. A.; HUMPAGE, A. R.; NEILAN, B. A.; RUNNEGAR, M. T.; NICHOLS, T.; THACKER, R. W.; PFLUGMACHER, S.; ETHERIDGE, S. M. & LOVE, A. H. Cyanotoxins Workgroup Report. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 619: 317-381.2008
- RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. **Analytica Chimica Acta**. n.466, p.213-231, 2002.
- SÁ, L. L. C.; VIEIRA, J. M. S.; MENDES, R. A.; PINHEIRO, S. C. C.; VALE, E. R.; ALVES, F. A. S.; JESUS, I. M.; SANTOS, E. C. O. & COSTA, V. B. Occurrence of toxic cyanobacterial bloom in the left margin of the Tapajós river, in the Municipality of Santarém (Pará State, Brazil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1: 159-166, 2010.
- SCOTT, A.J.T.; MARCARELLI, M. Cyanobacteria. In Freshwater Benthic Environments. In: WHITTON, B.A. (Org.) **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**, New York: Springer, p.271-289, 2012.
- ŠEJNOHOVÁ, L.; MARŠÁLEK, B. Microcystis. In: WHITTON, B.A. (Org.) **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**, New York: **Springer**, p.1-13, 2012.
- TEIXEIRA, M.G.L.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Epidemia de gastroenterite área da barragem de Itaparica, Bahia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.114, p.502-512, 1993.
- VASCONCELOS, J.F.; BARBOSA, J.E.L.; DINIZ, C.R.; CEBALLOS, B.S.O. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, n.2, v.39, p.1-20, 2011.
- ZEGURA, B.; STRASER, A. & FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutat Res**, v. 727: 16-41.2011