

VII-069 - AVALIAÇÃO DE MICROCISTINA PRODUZIDA POR CEPA DE CIANOACTÉRIA HEPATOTÓXICA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH**Georgette Cristina Salvador Lázaro⁽¹⁾**

Bióloga (Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Licenciatura em 2007 e Bacharelado em 2008) e Tecnóloga em Saneamento Ambiental (Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, 2008). Mestranda em Engenharia Ambiental (UFES). Pesquisadora do Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES e Laboratório de Fitoplâncton (LabFito) da UFES.

Sérvio Túlio Alves Cassini:

Biólogo (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 1975), PhD Microbiologia pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCU), EUA (1988), Pós Doutorado em Microbiologia Ambiental pela Universidade do Tennessee – EUA (1997), Professor Adjunto da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Pesquisador responsável pelo Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES.

Camilo Dias Junior

Biólogo (Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ, 1979). Mestre em Ecologia e Recursos Naturais (Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, 1990). Doutor em Ecologia e Recursos Naturais (Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, 1998). Professor adjunto da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Pesquisador responsável pelo Laboratório de Fitoplâncton (LabFito) da UFES.

Paulo Wagner Pereira Antunes

Bioquímico (Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2006). Mestre em Bioquímica Agrícola (Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2008). Doutorando em Engenharia Ambiental (Universidade Federal do Espírito Santo - UFES). Pesquisador do Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES.

Bruno Mariano Farias

Graduando em Licenciatura em Química (Instituto Federal do Espírito Santo - IFES). Pesquisador voluntário do Laboratório de Saneamento (LabSan) da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

Endereço⁽¹⁾: Av. Fernando Ferrari, nº 514, Laboratório de Saneamento, Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo – Goiabeiras - Vitória – ES - Brasil – CEP: 29075-910 - Tel: +55 (27) 4009-2165 - e-mail: georgettesalvador@gmail.com.

RESUMO

Avaliar a influência de fatores físicos, químicos e bióticos nas ocorrências de florações de cianobactérias e produção de microcistinas são essenciais para entender a dinâmica dos ecossistemas aquáticos envolvidos nesses processos. Experimentos com cultivos de cianobactérias em laboratório permitem obter dados sobre o comportamento morfofisiológico das culturas sob condições em que diversos fatores podem ser controlados. Dessa forma, é possível investigar individualmente os fatores que interferem nas florações e na produção de microcistinas das culturas. Sendo assim, o presente trabalho avalia as condições das culturas de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4, descrita como produtora de microcistina-LR, mantidas sobre condições controladas e com diferentes valores de pH (ácido (4,52), neutro (7,52) e básico (10,50)) . Para avaliação do crescimento das culturas foi realizado contagem em câmara de Neubauer e determinação de concentração de clorofila a, para quantificação de microcistina as amostras das culturas foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os estudos realizados demonstraram que o aumento de biomassa nem sempre implicará, em maior produção de microcistina, e que a produção dessa toxina pode estar atrelada a um número reduzido de células da cultura.

PALAVRAS-CHAVE: *Microcystis aeruginosa*, Microcistina, Condições de pH, CLAE.

INTRODUÇÃO

A deteriorização da qualidade da água e a proliferação excessiva de cianobactérias nos corpos d'água brasileiros é cada vez mais crescente, devido às pressões antrópicas e ao processo de eutrofização artificial, que trazem prejuízos ecológicos e socioeconômicos, especialmente aos mananciais superficiais destinados ao abastecimento público. Neste contexto, a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (MS), publicada em 25 de março de 2004 estabelece a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas com ênfase nas

toxinas hepatotóxicas (microcistinas e cilindrospermopsinas) em águas de mananciais destinadas ao consumo humano. Enquanto que a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) prevê análise quantitativa de cianobactérias e a determinação do biovolume das mesmas.

As cianobactérias ou cianofíceas, também conhecidas como algas azuis, são microorganismos procarióticos, aeróbios e fotoautótrofos, podendo ser unicelulares, filamentosas ou coloniais (YOO et al., 1995). Sabe-se que esses organismos possuem uma grande diversidade metabólica, que, aliado às suas características fisiológicas, permite, sob determinadas circunstâncias, o crescimento exuberante em determinados ambientes aquáticos, promovendo o que se denominam florações de cianobactérias (TOWNSEND et al., 1996; ESTEVES, 1998).

Essas são resultado da interação de fatores físicos, químicos e bióticos, caracterizadas por um crescimento explosivo, autolimitante e de curta duração dos microorganismos de uma ou poucas espécies, frequentemente produzindo colorações visíveis nos corpos de águas naturais (Torgan, 1989), isso geralmente, têm grande impacto negativo nos corpos d'água alterando as características de qualidades, tais como odor e sabor, que podem ser devido a presença de metabólitos secundários específicos produzidas por certos gêneros de cianobactérias, denominados genericamente de cianotoxinas.

As cianobactérias produzem várias toxinas, incluindo neurotoxinas (anatoxinas e saxitoxinas), hepatotoxinas, cilindrospermopsinas e endotoxinas lipopolissacarídeas (LPS) (CARMICHAEL e FALCONER, 1993). Em todo o mundo, estima-se que a proliferação de cianobactérias produtoras de hepatotoxinas é mais comumente encontrada que proliferações neurotóxicas. As hepatotoxinas são peptídeos cíclicos cuja ocorrência já foi notificada em todos os continentes, dentre esse grupo de cianotoxinas a mais encontrada é a microcistina (SIVONEN e JONES, 1999).

Diversos métodos laboratoriais, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os imuno-ensaios (ELISA), a inibição da fosfatase e a biologia molecular, são empregados para detectar e identificar cianotoxinas, principalmente microcistinas, seja em amostras de águas de ecossistemas aquáticos assim como em culturas de células de cianobactérias (HARADA et al., 1999). Dentre estes procedimentos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método analítico comumente utilizado com frequência para a determinação de microcistinas (NICHOLSOM; BURCH, 2001), sendo associado, em geral, ao sistema de detecção por arranjo de diodos (PDA).

Por outro lado, o cultivo e os estudos ecofisiológicos em laboratório com culturas de cianobactérias têm permitido a obtenção de um melhor conhecimento sobre as estratégias e fatores que estimulam a resposta adaptativa das espécies desta comunidade frente às inúmeras situações que normalmente podem ocorrer nos ecossistemas aquáticos, tornando as extrapolações para estes ambientes mais realistas (Zevenboom, 1987 *apud* FERREIRA, 2007). Estudos mostram que alguns fatores podem propiciar tanto a produção de microscitina, como o crescimento explosivo de cianobactérias. A ocorrência de florações de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos é coincidente com ventos fracos ou ausentes, juntamente com temperatura da água acima de 20°C, pH em torno de 8, concentrações de nutrientes nitrogenados e de fósforo não-limitantes e relação N:P solúveis próxima a 13:1 (Yunes et al., 1996).

Sendo assim, o presente estudo relacionou as diferentes condições de pH com as mudanças observadas no crescimento e produção de microcistina de uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) mantida em laboratório sob condições controladas (temperatura, luminosidade e fotoperíodo). Tais informações contribuirá para uma melhor compreensão da ecofisiologia da espécie em questão, cujas florações são muito comuns nos ambientes aquáticos brasileiros, além de servir de subsídio para pesquisas futuras.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento simulando florações com diferentes condições de pH foi realizado em batelada a partir de culturas da cepa tóxica *Microcystis aeruginosa* Kützinger (NPLJ-4), durante 20 dias. Para tanto, o meio de cultura ASM-1 modificado (1 g de NaHCO₃ para 1 L de ASM-1) foi preparado e, antes de autoclavar, o pH foi ajustado para cada tratamento: ácido (4,52), neutro (7,52) e básico (10,50). Tais tratamentos foram realizados em triplicata, com concentrações iniciais de 10⁵ células•mL⁻¹ de *M. aeruginosa* e incubados a 23,4°C±0,25°C (dia) e 22,0°C ± 0,25°C (noite), fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e intensidade luminosa

artificial entre 61 a 69 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proveniente de lâmpadas fluorescentes de 20 Watts, sendo realizado mudança de posição de cada Erlenmeyer nas prateleiras da incubadora, agitação manual (2 vezes ao dia: manhã e tarde) e retirada de alíquotas a cada 2 dias.

Para a determinação das concentrações de clorofila-*a* e montagem da curva de crescimento, amostras de 10 mL ($T = 0, 2, 4$), 7 mL ($T = 6, 8, 10$) e 5 mL ($T = 12, 14, 16, 18$ e 20) retiradas de cada frasco foram filtradas em filtros de fibra de vidro GF-6 (diâmetro de 25 mm, Macherey-Nagel), que foram acondicionados em papel alumínio, depositados em recipiente âmbar contendo sílica gel e armazenados em refrigerador a +4°C para posterior etapa de extração a frio do pigmento. Esta extração foi realizada por maceração do filtro através de *mixer* com haste e utilizando-se 10 mL de acetona 90%, seguida de refrigeração dos extratos a +4°C, ao abrigo da luz, por um período entre 20 a 24 horas, conforme APHA (2005) modificado. Os extratos foram submetidos a centrifugação à velocidade de 3000 rpm durante 20 minutos e a leitura das absorbâncias do sobrenadante dos extratos foi executada em espectrofotômetro e em duplicata, nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm, sendo posteriormente calculado as concentrações de clorofila-*a* (LORENZEN, 1967; APHA, 2005).

Além disso, amostras de 80 mL de cada réplica de cada tratamento do 10º e 20º dia de crescimento de *M. aeruginosa* foram retiradas e armazenadas em freezer -20°C para avaliação de microcistina em sistema HPLC-PDA. Para tanto, as amostras foram fervidas em microondas em 3 ciclos de ebulição, (totalizando 16 minutos), filtradas a vácuo em membranas de fibra de vidro GF-1 (diâmetro de 47 mm, Macherey-Nagel) e acidificadas ao pH 8,1 $\pm 0,05$ por adição de ácido clorídrico (HCl) 1 molar, sendo o filtrado submetido ao processo de concentração e purificação pela técnica de extração em fase sólida (Solid Phase Extraction – SPE), através de cartuchos PP Chromabond® C18ec (6ml, 500mg) e sob ação da gravidade, segundo método modificado de Albuquerque Junior, Melo e Franco (2007).

As etapas de lavagem dos cartuchos, eluição do analito com solução metanol:água:ácido trifluoroacético - TFA (89,9:10:0,1 %v/v), evaporação em banho-maria à 45°C, ressuspensão do resíduo em 1 mL de metanol, filtração em Millex LCR com membranas PTFE (13 mm, 0,22 μm , Millipore) e avaliações cromatográficas por fase reversa foram realizadas de acordo com Martins (2010), sendo utilizada coluna C18 Symmetry 300 (250 x 4,6 mm, 5 μm) com separação realizada pelo gradiente de água e acetonitrila, ambos acidificados com 0,1% de TFA. Enquanto que a detecção de microcistinas foi realizada por análise em fotodiodo (PDA) com o espectro de absorção na faixa de 190 a 300 nm, sendo os picos referentes às variantes de microcistinas foram identificados por máxima absorção no comprimento de onda de 238 nm. Para efeito comparativo, foi utilizado um padrão de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ das variantes de microcistinas: RR (MCY-RR), LR (MCY-LR), YR (MCY-YR) e LA (MCY-LA), que foram previamente misturadas em um *vial*. Os picos encontrados nas amostras do cultivo foram comparados ao do cromatograma obtido para a mistura das variantes de microcistina. Millex LCR com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos (0,45 μm ; 13 mm), não estéril

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das concentrações de clorofila-*a* de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) obtidas das amostras dos tratamentos ácido, neutro e básico revelaram uma fase logarítmica do 6º ao 17º dia de crescimento, com tendência de início de fase estacionária no 18º dia, principalmente nos cultivos de pH neutro e básico. As concentrações de clorofila-*a* variaram de 57,92 a 3.247,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas amostras referentes ao tratamento de pH 4,52; de 35,6 a 2.479,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas amostras do tratamento neutro (pH 7,52) e de 60,75 a 2.475,71 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no cultivo condicionado ao pH básico (pH 10,50) (Figura 1).

Além disso, foram realizadas avaliações da presença de variantes de microcistina nas amostras de cada réplica dos tratamentos ácido, neutro e básico do 10º e 20º dia de crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützinger (cepa tóxica NPLJ-4). Para efeito comparativo, aplicou-se uma mistura de 4 padrões das variantes de microcistina (MCY-RR, MCY-LR, MCY-LA e MCY-YR) a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, todavia a quantificação esteve atrelada apenas à microcistina-LR.

Desta forma, foram obtidos cromatogramas divididos em três regiões de interesse em ambas as amostras dos dias analisados. No cromatograma do 10º dia de crescimento de *M. aeruginosa* foram eluídos picos cromatográficos referentes às variantes de microcistina-RR, LR e YR entre 8,5 e 13 minutos (Figura 2), assim como foram observados pico de microcistina-RR para os três tratamentos (ácido, neutro e básico) e de microcistina-LR para os tratamentos: neutro (pH 7,52) e básico (pH 10,50).

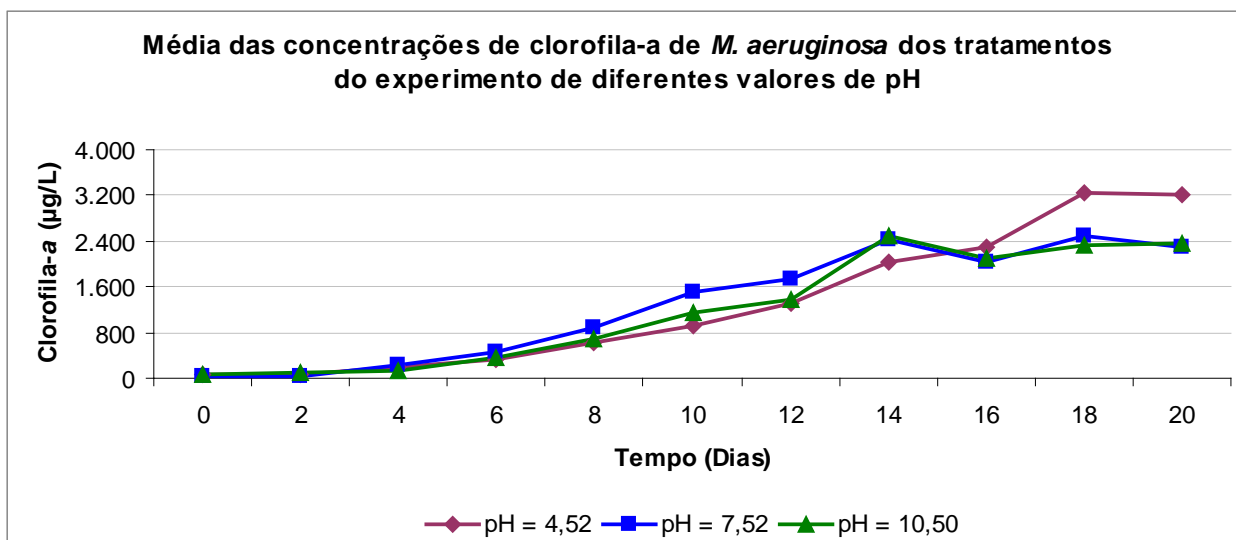


Figura 1 – Médias das concentrações de clorofila-a ($1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) submetidas a tratamentos com mudança de pH no meio de cultura ASM-1 (ácido, neutro e básico).

No cromatograma do 10º dia de crescimento de *M. aeruginosa* foram eluídos picos cromatográficos referentes às variantes de microcistina-RR, LR e YR entre 8,5 e 13 minutos (Figura 2), assim como foram observados pico de microcistina-RR para os três tratamentos (ácido, neutro e básico) e de microcistina-LR para os tratamentos: neutro (pH 7,52) e básico (pH 10,50). Além disso, amostras de *M. aeruginosa* cultivadas em pH básico (tratamento 10,50) apresentaram pico de maior área para a variante MCY-RR, enquanto que nas amostras pertinentes aos tratamentos ácido e neutro foram obtidos picos cromatográficos próximos à concentração padrão aplicada de MCY-RR ($1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Na região entre 14 e 15,2 minutos foram eluídos picos de altos valores de absorvância, os quais não puderam ser identificados por meio das variantes dos padrões testadas. Já na região de 16 a 18 minutos foram encontrados picos referentes à variante MCY-LA nas amostras dos três tratamentos, destacando-se os tratamentos neutro e básico, que apresentaram picos de maior área quando comparados ao tratamento com meio ASM-1 ácido (pH 4,52) (Figura 3).

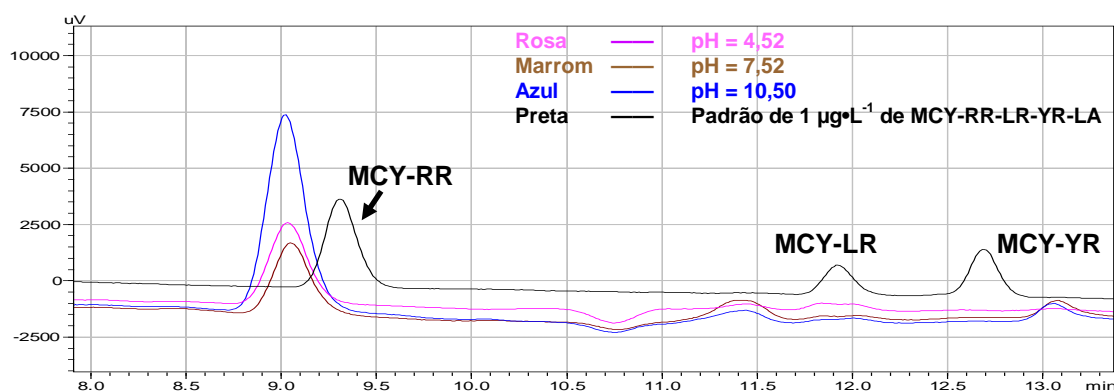


Figura 2 – Região entre 8,5 e 13 minutos do perfil cromatográfico do 10º dia de crescimento de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) submetida a diferentes tratamentos com mudança de pH no meio ASM-1 (ácido, neutro e básico).

Comparando as amostras dos três tratamentos (ácido, neutro e básico) do 20º dia de crescimento de *M. aeruginosa* com o padrão de $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ das variantes de microcistinas foram eluídos entre 8,5 e 13,5 minutos as microcistinas-RR, LR e YR, sendo que nenhum destes tratamentos apresentou a variante MCY-RR. Por outro lado, picos de MCY-YR foram observados nas amostras de todos os tratamentos, com destaque para os tratamentos neutro e básico, que apresentaram maiores áreas do pico quando comparado ao tratamento de pH ácido. Nos tratamentos ácido e neutro, ainda nesta região, foram encontrados a variante MCY-LR com área do pico semelhante ao padrão de $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 3). Na região de 14,2 a 15,2 minutos foram eluídos picos de

altos valores de absorvância, os quais não puderam ser identificados. Na região entre 16 a 18 minutos, os três tratamentos apresentaram eluição do pico referente à MCY-LA, com destaque para os tratamentos de pH 4,52 e pH 7,52, cujos valores de absorvância foram maiores que o tratamento de pH básico.

Comparando os resultados dos cromatogramas do 10º com o 20º dia de crescimento com o padrão de $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ das variantes de microcistinas, verificou-se o aparecimento dos picos de MCY-RR, MCY-LR e, em menor intensidade em termos de absorvância, do pico de MCY-LA. Já no 20º dia não se obteve eluição do pico de MCY-RR, porém se observa um aumento significativo do pico MCY-LA e presença das variantes MCY-LR e MCY-YR.

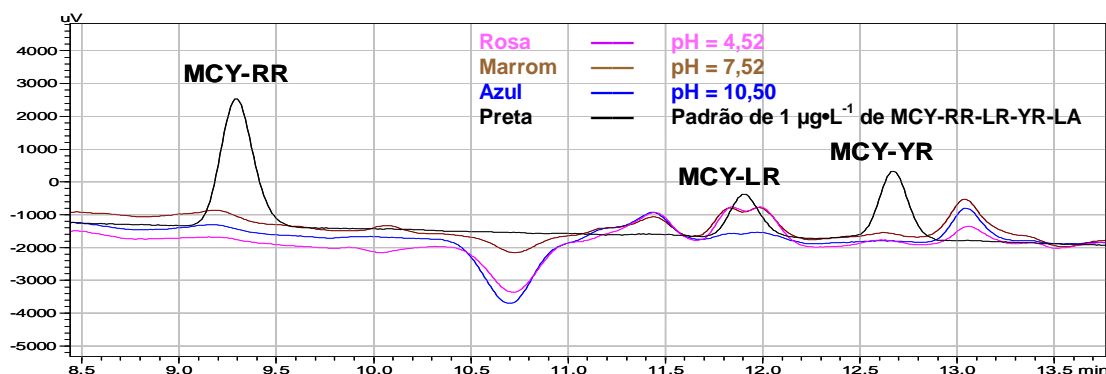


Figura 4 – Eluição de picos referentes à microcistina-RR, LR e YR na região entre 8,5 e 13 minutos do cromatograma do 20º dia de crescimento de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) submetida a diferentes tratamentos de pH (ácido, neutro e básico).

Os valores de microcistina-LR nas amostras referentes aos tratamentos testados, obtidos através da metodologia de Martins (2010), excederam a concentração limite de $1,0 \mu\text{g}$ de MCY-LR $\cdot\text{L}^{-1}$, preconizado pela legislação brasileira e Organização Mundial da Saúde em águas destinadas ao consumo humano. Além disso, foi verificado um aumento dos valores desta toxina do 10º para o 20º dia, destacando-se o tratamento ácido. Em relação à produção de microcistina-LR por biomassa de *M. aeruginosa*, ou seja, concentração de clorofila-*a*, verificou-se um aumento desta toxina do 10º para o 20º dia de crescimento nas amostras do tratamento ácido, enquanto que nos demais tratamentos os valores decresceram do 10º para o 20º dia (Tabela 2). Em contrapartida, maiores valores de biomassa de *M. aeruginosa* e de microcistina-LR foram observadas no 20º de crescimento quando comparados ao 10º dia. Assim, pode-se atestar que o aumento de biomassa nem sempre implicará, necessariamente, em maior produção de microcistina por clorofila-*a*, fato que pode ser observado nos tratamentos neutro e básico. Isto demonstra que a eficiência em termos de produção de cianotoxina pode estar atrelada ao fato que uma única célula pode ser responsável por produção de grande quantidade de toxina.

Tabela 2 - Valores de microcistina-LR obtidos nas amostras do cultivo de *M. aeruginosa* submetida a diferentes tratamentos de pH e quantidade de microcistina-LR produzida em termos de concentração de clorofila-*a*.

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA-A ($\mu\text{G}\cdot\text{L}^{-1}$)		CONCENTRAÇÃO DE MCY-LR ($\mu\text{G}\cdot\text{L}^{-1}$)		μG DE MCY-LR POR μG DE CLOROFILA-A	
	T = 10º dia	T = 20º dia	T = 10º dia	T = 20º dia	T = 10º dia	T = 20º dia
pH = 4,52	930,68	3.201,09	8,5	45,0	0,0091	0,0141
pH = 7,52	1.517,28	2.299,73	32,0	42,0	0,0211	0,0183
pH = 10,50	1.147,84	2.358,35	27,0	43,0	0,0235	0,0182

CONCLUSÕES

Assim, pode-se constatar que o aumento de biomassa nem sempre implicará, necessariamente, em maior produção de microcistina por clorofila-*a*, fato que pode ser observado nos tratamentos neutro e básico. Isto demonstra que a eficiência em termos de produção de cianotoxina pode estar atrelada ao fato que uma única célula pode ser responsável por produção de grande quantidade de toxina. Cianobactérias crescem preferencialmente em águas neutro-alcálinas, porém sua grande capacidade adaptativa pode permiti-lhe sobreviver e produzir cianotoxinas sob condições de acidez, fato comprovado neste estudo. Há muito a ser relatado no que tange a produção de microcistina pela espécie cosmopolita *M. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE JUNIOR, E.C. de; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. Use of solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [D-Leu1]MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, v. 52, n. 1, 2007.
2. APHA – American Public Health Association. AWWA – American Water Works Association. WEF – Water Environment Federation. Biological Examination (10000): 10200 Plankton. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 2005.
3. BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (MS). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.
4. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.
5. CARMICHAEL, W.W. Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In: OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. (Eds.). **Nature toxins: characterization, pharmacology and therapeutics**. London: Pergamon Press., p. 3-16, 1988.
6. ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1998
7. FALCONER, I.R. et al. Toxicity of the blue-green algae (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual. Inter.*, v. 9, p. 131-139, 1994. *Apud*: KURODA, E. K. et al. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Eng. Sanit. Ambient.** v.12, n.1, p. 24-31, 2006.
8. FERREIRA, R.M. **Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética, na morfologia e no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii***. 2007. 53p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2007.
9. HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, p. 369-405, 1999
10. LORENZEN, C.J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, v. 12, p. 343-346, 1967.
11. MARTINS, C.F. **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória**. 2010. 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2010.
12. NICHOLSOM, B.C.; BURCH, M.D. **Evaluation of analytical methods for detection e quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines**. **Cooperative Research**. Australia: Commonwealth of Australia, 2001.
13. SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon., p. 369-405, 1999.

14. TORGAN, L. C., 1989, Floração de algas: composição, causas e conseqüências. Florianópolis, Ínsula (19): 15-34.
15. TOWNSEND, S.A.; LUONG-VAN, J.T.; BOLAND, K.T. Retention time as a primary determination of colours and light attenuation in two tropical **Australian reservoirs**. **Freshwater Biology**, Oxford, v.36, n. 1, p. 57-69, Aug., 1996
16. YOO, R.S. et al. **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide**. Denver: WWA Foundation and the American Water Works Association, 1995.
17. YUNES, J.S. et al. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, Dordrecht, v. 5, p. 223-229. 1996.