

RITA QUEIROGA ALVES MARTINS

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO IMPACTO DE
CIANOBACTÉRIAS NA SAÚDE ANIMAL**

Orientador:

Professora Doutora Margarida Alves

Orientadores externos:

Professor Doutor Carlos Pinto

Dr^a. Carina Menezes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

RITA QUEIROGA ALVES MARTINS

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO IMPACTO DE
CIANOBACTÉRIAS NA SAÚDE ANIMAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias com o Despacho Reitoral nº 35/2021 de 18 de Março 2021 com a seguinte composição de Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Sofia Van Harten

Orientadora: Prof^a. Doutora Margarida Alves

Arguente: Doutora Elsa Dias, Investigadora (INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

**“The sudden appearance of CyanoHABs can be viewed
as a visible and dramatic warning of the dangers that
arise from decades of abuse of our inland waters,
the canary in the coal mine analogy”**

Wayne Carmichael

**“You’re playing with Pandora’s box.
Sometimes it’s better not to open it.
Sometimes it’s better not to know.”**

Tatiana de Rosnay

À melhor Mãe.
Ao melhor Pai.
Às minhas manas.
Obrigada.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Diretora, Professora Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado e ao corpo docente no geral.

Ao Professor Doutor Carlos Pinto por ser um professor sonhador, que acreditou em mim e depositou a confiança necessária para este desafio. Por ter sido incansável na ajuda que me deu com a escolha do tema e realização desta dissertação. Um tema tão bom, que eu lhe chamei “fora da caixa”.

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Alves, pelo apoio, ajuda, colaboração e realização desta dissertação.

À minha orientadora externa, Dr^a. Carina Menezes, responsável do Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Doutor Ricardo Jorge, por toda ajuda, paciência, dedicação e revisão literária pormenorizada. Foi imprescindível!

Ao meu orientador de estágio e amigo, Dr. Dário Bettencourt, ao Dr. Gonçalo Rosa e à Dr^a. Ana Manuela, que me passaram os melhores valores. Por serem pessoas extraordinárias e me tratarem sempre como colega. Aos três: Muito obrigada.

Ao Dr. José Miguel Leal da Costa, obrigada pela exigência, profissionalismo e transmissão de conhecimentos.

À Dr^a. Carla Lima, pelo auxílio e colaboração na investigação e pela partilha de conhecimentos.

Ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela possibilidade de realização do estágio laboratorial, que permitiu adquirir os conhecimentos necessários à realização desta dissertação.

À Associação de Agricultores da ilha do Pico, em especial ao Sr. Presidente Rui Matos e à Carla, por me fazerem sentir em casa.

Aos Serviços de Desenvolvimento Agrário do Pico, em especial ao Senhor Armando que me perguntava todos os dias “menina simpática ainda está a gostar da ilha?” - Eu vou querer viver nela!

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, a quem devo tudo.

Um agradecimento muito especial à minha mãe, que é o pilar mais importante no que toca à estabilidade emocional, familiar e financeira, necessárias à realização deste curso.

Às minhas irmãs, Madalena e Maria do Carmo que me acompanham desde sempre e sempre acreditaram em mim.

À minha família, avós, tios e primos, por todas as vezes que me perguntavam “quando acabas o curso Ritinha?” – É agora malta!

Ao João por ser o meu melhor amigo, por me mostrar a solução de todos os problemas e por relativizar todas as situações, muito obrigada por tudo.

Às minhas primas gémeas Beatriz e Margarida e às minhas amigas de todo o sempre, por me acompanharem durante todo o meu percurso. Por mostrarem todos os dias que a amizade é um valor fundamental da vida.

Aos pais do João, por toda a ajuda, carinho e apoio que me deram durante este percurso académico.

Aos pais do Dário, aos pais do Gonçalo, à Ana Rocha, ao Sr. Alfredo, aos amigos que fiz na ilha mais bonita do mundo e a todos os agricultores da ilha do Pico, um obrigado por tudo. Sem a dedicação de todos, o meu estágio não tinha sido tão especial.

A todos os meus amigos e amigas que me acompanharam nesta longa caminhada, em especial à Mariana Casaca, a quem tenho muito a agradecer pela infinita disponibilidade e carinho, na qual eu me identifico e quero manter por perto sempre! Obrigada pela tua querida maneira de ser, que transforma tudo em simplicidade.

Às minhas colegas de estágio, Sara Amaral, Rita Borges Ferreira e Inês Leite que tive a oportunidade de conhecer, obrigada pela partilha de conhecimento, pelas tardes a rir e pelas palavras cruzadas que tanto animaram os meus dias.

Por fim, à Zara que de todas as vezes que eu chegava a casa, lá estava ela, à minha espera de cauda a abanar e aos pulos, cheia de saudades. Por ser uma inspiração e uma memória muito boa.

A todos, o meu sincero obrigado!

Resumo

As cianobactérias são organismos fotossintéticos aeróbios, sendo as principais responsáveis pelo início da produção de oxigénio e formação da atmosfera como a conhecemos atualmente. Em águas doces superficiais, quando se encontram condições favoráveis de temperatura, luz e nutrientes, ocorre um crescimento de microalgas acompanhado pelo aumento significativo da população de cianobactérias, fenómeno denominado por *bloom*. A percentagem de estripes de cianobactérias encontradas em *blooms* e com capacidade de produção de cianotoxinas corresponde a 75%. No entanto, nem todas as cianobactérias são consideradas nocivas. As cianobactérias e, mais especificamente, as toxinas por elas produzidas são consideradas um risco ambiental e de Saúde Pública, ameaçando de forma particular, os animais de produção, os animais de companhia e a vida selvagem.

Assim, foi propósito do presente trabalho: i) identificar e mapear na ilha do Pico, Açores, pontos de abeberamento que possam constituir um risco para a saúde animal relativamente à presença de cianobactérias e toxinas associadas e ii) estudar a comunidade fitoplanctónica das lagoas de um Parque Ambiental e identificar a eventual presença de cianotoxinas que possam ser associadas a casos de mortalidade em aves.

Na ilha do Pico e no Parque Ambiental em estudo foram realizadas análises fitoplanctónicas e procedimentos laboratoriais para deteção e determinação de cianobactérias. A análise fitoplanctónica às águas de abeberamento de animais e às lagoas da Ilha do Pico, revelaram a existência de cianobactérias em quase todas as amostras, na sua maioria, pertencentes ao género *Microcystis*. A análise fitoplanctónica ao Parque Ambiental, permitiu relacionar a morte das aves com a ingestão de água contaminada com microcistinas. A densidade de cianobactérias totais atingiu as 22.357 cél/mL. Todas as cianobactérias identificadas estão descritas como potencialmente tóxicas, com particular ênfase para as espécies *Anabaenopsis circularis* e *Microcystis aeruginosa*.

É expectável que os casos de intoxicações em animais domésticos e silváticos aumentem no futuro, sendo crucial a necessidade de monitorização sistemática das águas doces superficiais.

Palavras-Chave: Cianobactérias, Cianotoxinas, Microcistinas, *Blooms* fitoplanctónicos, Eutrofização, Intoxicação, Saúde Pública

Abstract

Cyanobacteria are aerobic photosynthetic organisms, and the main responsible for the oxygen production and formation of the atmosphere as we presently know it. When favourable conditions of temperature, light and nutrients are found in surface fresh water, a growth of microalgae occurs accompanied by a significant increase in the cyanobacterial population, a phenomenon called bloom. The percentage of cyanobacterial strains found in blooms with cyanotoxin production capacity corresponds to 75%. However, not all cyanobacteria are considered harmful. Cyanobacteria, and more specifically the toxins produced, are considered to be an environmental and public health risk, threatening in particular livestock, pets, and wildlife.

The purpose of the present work was: i) to identify and map, in Pico Island, Azores watering points that may pose a risk to animal health regarding the presence of cyanobacteria and associated toxins and ii) to study the phytoplanktonic community of the lagoons of an Environmental Park and to identify the possible presence of cyanotoxins that can be associated with cases of mortality in birds.

Phytoplankton analyses and laboratory procedures for the detection and determination of cyanobacteria were carried out at the places under study, Pico island and Parque Ambiental. Phytoplankton analysis of animal water and lagoons Pico Island revealed the existence of cyanobacteria in almost all samples belonging, mainly, to the genus *Microcystin*. The phytoplankton analysis of the environmental park on the northern coast of mainland Portugal made it possible to relate the death of birds to the ingestion of water contaminated with *Microcystins*. Total cyanobacterial density reached 22.357 cel/mL. All identified cyanobacteria are described as potentially toxic, with particular emphasis to *Anabaenopsis circularis* and *Microcystis aeruginosa*.

Cases of poisoning in domestic and wildlife are expected to increase in the future and the need for systematic monitoring of surface fresh water is crucial.

Keywords: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Microcystins, Phytoplankton Blooms, Eutrophication, Intoxication, Public Health

Lista de Abreviaturas, acrónimos e símbolos

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
®	Marca Registada
+/-	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µm	Micrómetro
AAIP	Associação de Agricultores da Ilha do Pico
C	Carbono
CO₂	Dióxido de Carbono
CyanoHABs	<i>Blooms</i> nocivos de cianobactérias, do inglês, “ <i>Cyanobacterial Harmful Algal Blooms</i> ”
CYN	Cilindrospermopsina (cianotoxina)
DAD	Deslocamento do abomaso à direita
DAE	Deslocamento do abomaso à esquerda
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês, “ <i>Deoxyribunucleic acid</i> ”
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, “ <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> ”
et al.	Entre outros, da locução latina “ <i>et alii</i> ”
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ex.	Exemplo
Fe	Ferro
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
GPS	Sistema de posicionamento global, do inglês, “ <i>Global Positioning System</i> ”
h	Horas
ha	Hectare

HCO₃⁻	ião bicarbonato
HVME	Hospital Veterinário Muralha de Évora
INAG	Instituto Nacional da Água
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
Km	Quilómetro
km²	Quilómetro quadrado
L	Litro
m	Metro
MC	Microcistina (cianotoxina)
MC-LR	Microcistina-LR
mm	Milímetro
N	Azoto
NaCl	Cloreto de Sódio
NOD	Nodularina (cianotoxina)
O₂	Oxigénio
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
PA	Parque Ambiental
PST	Neurotoxina, do inglês " <i>Paralytic Shellfish Toxin</i> " (cianotoxina)
QIB	Queratoconjuntivite Infeciosa Bovina
RAA	Região Autónoma dos Açores
S	Enxofre
SDAP	Serviços de Desenvolvimento Agrário do Pico
STX	Saxitoxina (cianotoxina)
ULHT	Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Índice

Índice de tabelas	15
Índice de figuras	16
I. Atividades realizadas no estágio curricular	17
II. Contribuição para o estudo do Impacto das cianobactérias na saúde animal	25
1. Introdução	25
1.1 Motivação	25
1.2 Fitoplâncton	26
1.3 Biologia e diversidade de cianobactérias	27
1.4 Eutrofização e os fatores que influenciam o desenvolvimento de <i>blooms</i>	32
1.5 Impacto das alterações climáticas no crescimento das cianobactérias	34
1.6 Impacto de <i>blooms</i> de <i>CyanoHABs</i> no ecossistema aquático	35
1.7 Cianobactérias produtoras de cianotoxinas	36
1.7.1 Classificação	37
1.7.2 Legislação Nacional Aplicável	43
1.8 Saúde Pública e Epidemiologia	44
1.8.1 Riscos para a Saúde Pública	44
1.8.2 Casos de intoxicação em Humanos	47
1.8.3 Casos de intoxicação em animais	46
1.9 Identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas.....	52
1.10 Objetivos	53
2. Material e Métodos	54
2.1 Análise fitoplanctónica da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da Ilha do Pico	54
2.1.1 Caracterização da região estudada: Enquadramento geográfico	54
2.1.2 Metodologia	55
2.2 Estudo de caso de intoxicações por cianobactérias em aves no Norte de Portugal.....	59
2.2.1 Caracterização da região estudada: Enquadramento geográfico	59
2.2.2 Descrição do surto	60
2.2.3 Metodologia	60
3. Resultados	66

3.1 Resultados da análise fitoplantónica da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico	66
3.2 Resultados do estudo de caso de intoxicações por cianobactérias em aves no Norte de Portugal	68
3.3 Guia prático de receção e preparação de amostras de água no laboratório em caso de suspeita de cianobactérias	72
4. Discussão	74
5. Conclusão	78
Referencias bibliográficas	79
Anexo A	i
Anexo B	ii
Anexo C	iii
Anexo D	iv
Anexo E	v
Anexo F	vi
Anexo G	vii

Índice de Tabelas

Tabela 1. Casuística dos casos clínicos observados na ilha do Pico em função do sistema orgânico afetado em bovinos.....	18
Tabela 2. Casuística na área de “cirurgia” em bovinos na ilha do Pico	20
Tabela 3. Casuística dos casos clínicos de bovinos observados em função do sistema orgânico afetado na região do Alentejo	21
Tabela 4. Casuística na área de cirurgia em bovinos na Península de Setúbal	23
Tabela 5. Casuística na área de controlo reprodutivo em bovinos na Península de Setúbal	23
Tabela 6. Características gerais dos principais grupos de cianotoxinas, cianobactérias produtoras e principais órgãos-alvo em mamíferos	42
Tabela 7. Resumo dos casos de intoxicação animal por cianobactérias e cianotoxinas descritos na literatura ocorridos entre os anos de 1800 e 2020.	47
Tabela 8. Resumo do caso de intoxicação por cianobactérias, ocorrido na ribeira de Oeiras, Portugal	49
Tabela 9. Resultados obtidos através da análise microscópica das amostras recolhidas na ilha do Pico durante o estágio curricular	66
Tabela 10. Resultados da análise do fitoplâncton na amostra de água do parque ambiental	69
Tabela 11. Concentração de microcistinas em µg/g peso fresco nas amostras de tecidos das aves do parque ambiental.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. Frequência relativa dos casos clínicos observados na ilha do Pico, em função do sistema orgânico afetado em bovinos	19
Figura 2. Distribuição geral da casuística acompanhada na ilha do Pico	20
Figura 3. Distribuição geral da casuística acompanhada no HVME, consoante a espécie alvo	22
Figura 4. Frequência absoluta e relativa dos casos clínicos de bovinos observados na Península de Setúbal, distribuídos pelas diferentes áreas de intervenção	23
Figura 5. Alguns exemplos de fitoplâncton encontrado em águas superficiais	26
Figura 6. Diferenças morfológicas observáveis ao microscópio ótico, entre os principais grupos de algas encontrados em água doce. Dinoflagelados, cianobactérias e Clorófitas	27
Figura 7. Origem da vida na Terra	28
Figura 8. Presença de células diferenciadas em <i>Dolichospermum circilane</i> (<i>Anabaena circinalis</i>) (esquerda) e <i>Dolichospermum flos-aquae</i> (<i>Anabaena flos-aquae</i>) (direita).....	29
Figura 9. <i>Microcystis aeruginosa</i> (esquerda); <i>Microcystis flos-aquae</i> (direita)	30
Figura 10. <i>Dolichospermum planctonicum</i> (<i>Anabaena planctonica</i>) (esquerda); <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (direita)	31
Figura 11. <i>Planktothrix agardhii</i> (esquerda); <i>Limnothrix redekei</i> (direita)	32
Figura 12. Relação entre as alterações climáticas e a estratificação térmica do ecossistema que influenciam o aparecimento de <i>blooms</i> de cianobactérias	34
Figura 13. Estruturas moleculares das cianotoxinas neurotóxicas mais conhecidas	39
Figura 14. Estruturas moleculares das cianotoxinas neurotóxicas mais conhecidas.....	43
Figura 15. Fotografias de vários elefantes mortos no Delta do Okavango em 2020	49

Figura 16. Compilação de fotografias dos bovinos intoxicados por cianobactérias na ribeira de Oeiras, em Almodôvar, Portugal	51
Figura 17. Ribeira de Oeiras no dia do surto	51
Figura 18. Enquadramento geográfico do arquipélago dos Açores e da ilha do Pico	54
Figura 19. Modelo digital do terreno da ilha do Pico, com indicação das principais lagoas da ilha	56
Figura 20. Lagoa Seca (esquerda); Lagoa do Capitão (direita)	57
Figura 21. Tanque de abeberamento de bovinos numa exploração agropecuária na ilha do Pico (esquerda); Amostra de água para determinação de fitoplâncton (direita)	57
Figura 22. Principais lagoas que compõe o parque ambiental	59
Figura 23. Recolha de amostras de água nas principais lagoas que compõem o parque ambiental ...	61
Figura 24. Recolha de amostras pontuais com uma garrafa de plástico de 1,5L nas margens das lagoas da região em estudo	62
Figura 25. Receção e preparação das amostras no laboratório do INSA. Amostras frescas e fixadas para observação microscópica (esquerda) e amostras frescas para quantificação de cianotoxinas por ELISA (direita)	63
Figura 26. Análise anatomopatológica das aves com suspeita de intoxicação por cianobactérias	64
Figura 27. Biomassa fitoplanctónica na cavidade oral e plumagem das aves do PA	65
Figura 28. Amostras de tecido hepático e renal para deteção de microcistinas	65
Figura 29. Identificação presumível de colónia de <i>Microcystis</i> sp. (viva). Microscópio ótico 400X (esquerda). Amostra B (direita)	68
Figura 30. Observação microscópica de colónias de <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Anabaenopsis circularis</i> (ampliação 400x) nas amostras das lagoas do PA	70
Figura 31. Observação microscópica de colónias de <i>Microcystis aeruginosa</i> (ampliação 400x) nas amostras de água das lagoas do PA	70

Figura 32. Observação microscópica de colónias de *Anabaenopsis circularis* (ampliação 400x) nas amostras de água das lagoas do PA..... 70

I. Atividades realizadas no estágio curricular

O presente relatório descreve as atividades realizadas durante o estágio curricular da aluna Rita Queiroga Alves Martins, no âmbito do mestrado integrado em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT). O estágio teve uma componente de investigação e outra de clínica de espécies pecuárias e uma duração total de seis meses. Os locais onde foram desenvolvidas atividades durante o estágio curricular foram: o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em Lisboa, a Associação de Agricultores da Ilha do Pico (AAIP), na Ilha do Pico, Açores, o Hospital Veterinário Muralha de Évora (HVME), em Évora e a clínica Sá Guerreiro Vet, na Península de Setúbal.

Neste relatório de estágio descrevem-se as atividades desenvolvidas em ambiente prático, com maior incidência para a casuística da área da clínica geral em bovinos. Os dados estatísticos das atividades desenvolvidas são apresentados por área geográfica e de forma numérica.

- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

No Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o estágio teve a duração de dez dias, de 10 a 20 de setembro de 2019, sob a orientação da Dr.^a Carina Menezes. Esta formação foi muito importante e necessária para a realização da presente dissertação. Durante o estágio, a autora adquiriu competências na monitorização de cianobactérias e toxinas associadas em água doce superficial (colheita e processamento de amostras, identificação e quantificação de cianobactérias).

- Associação de Agricultores da Ilha do Pico

Na Associação de Agricultores da Ilha do Pico (AAIP), sediada na ilha do Pico, na Região Autónoma dos Açores (RAA), o estágio teve a duração de doze semanas, com início a 23 de setembro e término a 20 de dezembro de 2019, sob a orientação do Dr. Dário Bettencourt. A realização deste estágio curricular teve como principal objetivo a avaliação da qualidade da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico, na perspetiva das cianobactérias e suas toxinas. Foram recolhidas 16 amostras de água de locais distintos da ilha e posteriormente observadas ao microscópio ótico nos Serviços de Desenvolvimento Agrário do Pico (SDAP).

Durante as doze semanas de estágio surgiu a oportunidade de acompanhar três Médicos Veterinários de campo que trabalham na AAIP nas demais tarefas médico-veterinárias. As rotações eram feitas semanalmente, onde a autora acompanhava cada Médico Veterinário nas diferentes áreas de trabalho: Clínica geral (tabela 1), sanidade, controlo reprodutivo, cirurgia (tabela 2) e necropsias.

O primeiro contacto com o cliente foi sempre da responsabilidade da autora, onde foi realizada a anamnese, recolha de história clínica, exame de estado geral e lista de diagnósticos diferenciais. Após discussão com o clínico acerca do diagnóstico, era de sua responsabilidade a administração de medicamentos, o cálculo de doses a administrar e o acompanhamento do caso durante todo o período de tratamento. Na tabela 1 e figura 1 encontram-se discriminados os casos clínicos em função do sistema orgânico afetado em bovinos, num total de 335 casos.

Tabela 1. Casuística dos casos clínicos observados (n=335) na Ilha do Pico, em função do sistema orgânico afetado em bovinos.

Sistema orgânico	Casos Clínicos	Nº de casos
Lesões da cavidade oral	Actinobacilose	1
	Actinomicose	1
	Disfagia orofaríngea por corpo estranho (laranja)	1
	Entupimento da glândula salivar	1
	Necrobacilose oral / Difteria	4
Gastrointestinal	Diarreia neonatal e de vitelos	21
	Indigestão / Diminuição dos movimentos ruminais	8
	Parasitismo gastrointestinal	2
	Suspeita de Paratuberculose	8
	Suspeita de torção / Volvo intestinal	3
	Timpanismo ruminal / Acidose ruminal	8
	Timpanismo ruminal por plantas (fungos)	3
Respiratório	Complexo respiratório bovino	8
	Edema e enfisema pulmonar agudo	2
	Pneumonia	21
Distúrbios metabólicos	Esteatose hepática	2
	Hipocalcémia	13
Reprodutivo	Distocia *	31
	Aborto	4
	Nado morto	9
	Metrite / Endometrite	8
	Prolapso uterino	3
	Prolapso vaginal	2
	Retenção placentária	9
Glândula mamária/ Úbere	Edema do úbere	6
	Hiperqueratose do teto	3
	Mastite clínica	16
Oftalmologia	Carcinoma espino-celular ocular	5
	QIB	42

	Trauma ocular / Corpo estranho	3
Neurologia	Lesão do nervo obturador	6
	Suspeita de lesão da coluna vertebral	3
	Suspeita de listeriose (meningoencefalite)	2
	Suspeita de meningite	1
Pele e anexos	Abcessos	4
	Dermatite bacteriana	1
	Dermatofitose / Tricofitose	1
	Fotossensibilidade primária e hepatotoxicidade Intoxicação por <i>Lantana camara</i>	8
	Fotossensibilidade secundária suspeita de Intoxicação pelo fungo <i>Pithomyces chartarum</i>	3
	Míase	1
Locomotor/ Músculo-esquelético	Artrite	3
	Artrite interfalângica e abcesso podal	2
	Correção profilática das unhas	7
	Dermatite digital	2
	Dermatite interdigital	17
	Doença da linha branca	1
	Luxação articular	2
	Poliartrite séptica dos vitelos por onfalite	9
Outros	Falha na transferência de imunidade passiva	6
	Eutanásia (com recolha do tronco cerebral)	8

*Inclui flexão dos membros anteriores e posteriores, desproporção feto-materna, torção uterina, parto gemelar, fetotomia, episiotomia, inércia uterina e cesariana

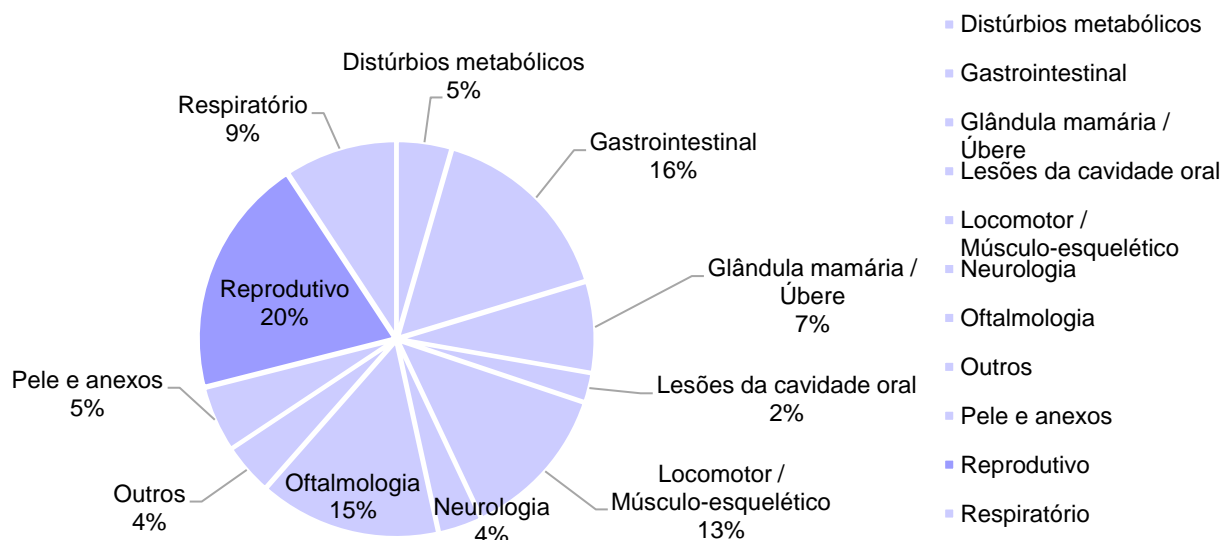


Figura 1. Frequência relativa dos casos clínicos observados na ilha do Pico, em função do sistema orgânico afetado em bovinos.

A alimentação dos bovinos na ilha do Pico é uma alimentação tradicional, constituída por pastagens naturais ou melhoradas sendo, muitas vezes, complementada com silagens de milho e fenos obtidos nas próprias pastagens e com alimento seco à base de concentrados

(Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural). A existência de pastagens naturais com condições edafo-climáticas propícias ao desenvolvimento de algumas plantas tóxicas, é um problema nas pastagens dos Açores, que se traduz em quadros de intoxicações graves. A ingestão de plantas tóxicas ocorre de forma accidental, misturadas no alimento ou em consequência da ausência de outra alternativa alimentar (Quintas, Cordeiro, & Aguiar, 2014). A escassez de alimento durante alguns meses do ano, faz com que os produtores tenham a necessidade de suplementar os seus animais com silagens de milho e concentrados, o excesso destes suplementos gera alterações à flora microbiana ruminal, conduzindo muitas vezes a indigestões e timpanismos. As irregularidades da alimentação dos bovinos na ilha do Pico, são frequentes e causam transtornos digestivos e metabólicos aos animais, afetando sobretudo o desempenho reprodutivo. Provavelmente por isso, e segundo a figura 1, as doenças desses três grupos representam quase metade dos casos (41%). Os problemas mais expressivos do sistema reprodutivo são as distocias.

Na tabela seguinte encontram-se discriminados o número de casos de animais submetidos a cirurgia na Ilha do Pico, num total de 31 animais.

Tabela 2. Casuística na área de cirurgia em bovinos na ilha do Pico.

Tipo de cirurgia	Nº de casos
Cesariana	8
Descorna	5
Orquiectomia de vitelos	17
Remoção de melanoma cutâneo	1
TOTAL	31

Na figura 2, é apresentada a distribuição geral da casuística acompanhada nos Açores, consoante a espécie alvo, num total de 2299 animais.

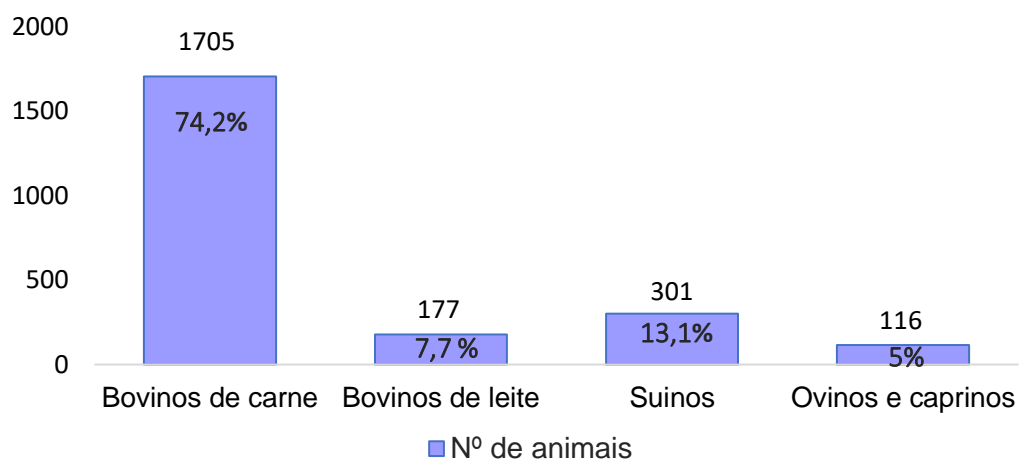


Figura 2. Distribuição geral da casuística acompanhada na ilha do Pico.

· Hospital Veterinário Muralha de Évora

O estágio teve a duração de três semanas, com início a 6 de janeiro e término a 31 de janeiro de 2020, sob a orientação do Dr. José Miguel Leal da Costa.

No Hospital Veterinário Muralha de Évora (HVME), no setor dos animais de produção, são prestados serviços de clínica geral, cirurgia, profilaxia médica, sanidade, nutrição, podologia e de apoio aos produtores. Existe, ainda, um núcleo de reprodução e fertilidade (Repromuralha) que presta serviços de consultoria, gestão e manejo reprodutivo às explorações. Durante o mês de janeiro, as atividades acompanhadas ao longo do estágio decorreram, maioritariamente, nas explorações agropecuárias pertencentes ao distrito de Évora e arredores. Os dias foram divididos em manhã, na qual os serviços médico-veterinários já estavam organizados e previamente marcados com o produtor (serviços de sanidade e profilaxia médica), e tarde, que estava destinada às urgências de clínica geral de animais de produção.

Os animais no Alentejo, raramente estão estabulados, circulando nas pastagens em regime de pastoreio livre e com poucas restrições comportamentais: Regime extensivo (J. P. Araújo, Vaz, Pinto de Andrade, Rodrigues, & Rodrigues, 2014). Os sistemas de produção animal em regime extensivo são a forma que mais se aproxima de uma produção que tenta valorizar o capital natural, desempenhando serviços importantes tanto para o Homem como para a natureza (Mottet *et al.*, 2017).

Na tabela 3 encontram-se discriminados os casos clínicos de bovinos observados no Alentejo, em função do sistema orgânico afetado, num total de 48 casos.

Tabela 3. Casuística dos casos clínicos de bovinos observados, na região do Alentejo, em função do sistema orgânico afetado.

Sistema orgânico	Casos clínicos	Nº de casos
Gastrointestinal	Diarreia neonatal e de vitelos	1
	Indigestão / Diminuição dos movimentos ruminais	1
	Suspeita de enterotoxémia (Clostridioses)	1
	Suspeita de Paratuberculose	8
Respiratório	Edema e enfisema pulmonar agudo	1
	Pneumonia	3
Reprodutivo	Distocia *	9
	Prolapso uterino	2
	Prolapso vaginal	1
	Retenção placentária	1
Glândula mamária / Úbere	Mastite clínica	3
Neurologia	Lesão do nervo obturador	4

	Suspeita de lesão da coluna vertebral	1
	Suspeita de listeriose (meningoencefalite)	1
Pele e anexos	Dermatofitose / Tricofitíase	2
	Sutura infetada	2
Locomotor/ Músculo-esquelético	Luxação articular	1
	Poliartrite séptica dos vitelos por onfalite	1
Outros	Balanopostite com quimose	1
	Falha na transferência de imunidade passiva	2
	Peritonite	1
	Eutanásia (sem recolha do tronco cerebral)	1

*Inclui flexão dos membros anteriores e posteriores, desproporção feto-materna, torção uterina, parto gemelar, fetotomia, episiotomia, inércia uterina e cesariana

Na figura 3 encontra-se representada a distribuição de casos clínicos em função da espécie alvo, num total de 1666 animais.

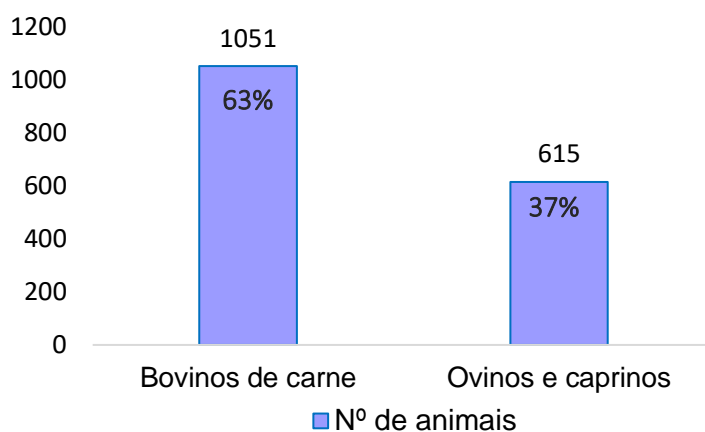


Figura 3. Distribuição geral da casuística acompanhada no HVME, consoante a espécie alvo.

· Clínica Sá Guerreiro Vet

Na clínica Sá Guerreiro Vet, o estágio teve a duração de dois meses, com início a 3 de fevereiro e término a 20 de março, sob a orientação do Dr. Dário Sá Guerreiro. A realização deste estágio curricular teve como principal objetivo adquirir conhecimentos na área da reprodução, principalmente em bovinos de aptidão leiteira. A clínica Sá Guerreiro Vet, situada na península de Setúbal, está sediada no Seixal e presta serviços no setor dos animais de produção, maioritariamente em bovinos de aptidão leiteira e vacas de carne aleitantes e engordas, possuindo serviço de urgência 24 horas.

Este período de estágio teve uma alta frequência de casos diários, uma aproximação verdadeira à realidade diária de um Médico Veterinário de campo. Nesta parte da formação foi realizado muito trabalho de sanidade, acompanhado pela parte reprodutiva, geralmente durante o período da manhã, previamente planeada com os produtores. Diagnósticos de

gestação por palpação retal e com recurso a ecografia preencheram sobretudo as manhãs, além do serviço intercalado de urgências: partos e cirurgias, entre as quais cesarianas e deslocamentos de abomaso. A profilaxia, bem como o tratamento de doenças respiratórias, digestivas e metabólicas também foram frequentes.

As explorações leiteiras na região da Península de Setúbal são, maioritariamente, grandes tendo um efetivo leiteiro que varia entre 100 a 600 vacas em lactação em regime unicamente intensivo, contrastando com as explorações de gado de carne, onde ainda existem os pequenos, médios e grandes produtores.

De seguida apresentam-se os dados relativos à casuística de cirurgia (tabela 4) e controlo reprodutivo (tabela 5), bem como a casuística geral distribuída pelas diferentes áreas de intervenção na Península de Setúbal (figura 4), num total de 1510 animais observados.

Tabela 4. Casuística na área de cirurgia em bovinos na Península de Setúbal.

Tipo de cirurgia	Nº de casos
Cesariana	3
Descorna	2
Deslocamento de abomaso à direita (DAD)	1
Deslocamento de abomaso à esquerda (DAE)	15
TOTAL	21

Tabela 5. Casuística na área de controlo reprodutivo em bovinos na Península de Setúbal.

Ocorrências		Nº de casos
Diagnóstico de gestação	Ecografia	314
	Palpação retal	43
Inseminação artificial		1
Protocolos de sincronização		314
TOTAL		672

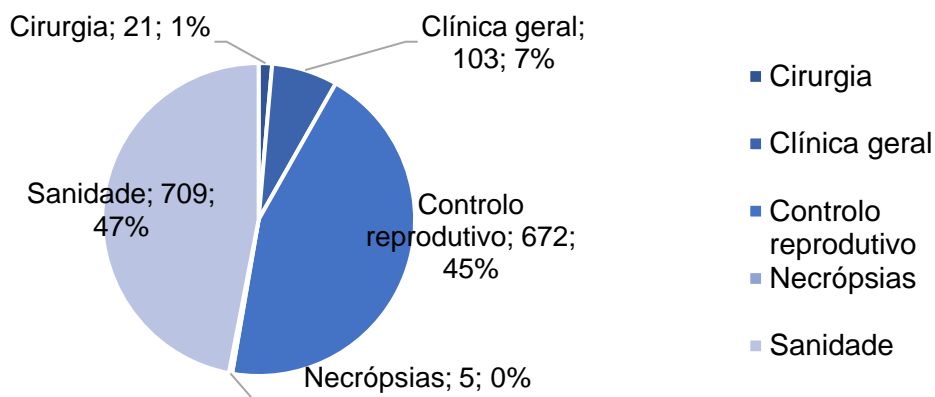


Figura 4. Frequência absoluta e relativa dos casos clínicos de bovinos observados na Península de Setúbal, distribuídos pelas diferentes áreas de intervenção.

II. Contribuição para o estudo do impacto de Cianobactérias na saúde animal

1. Introdução

1.1 Motivação

A água doce é um recurso natural único, escasso e essencial à vida no planeta Terra. É fundamental para a sobrevivência do Homem e dos outros seres vivos. Por ser um recurso desigualmente distribuído, condiciona a ocupação, sobrevivência e desenvolvimento das comunidades humanas. Com o aumento exponencial da população humana, a utilização e o consumo de água doce aumenta. Um dos grandes problemas que afeta as massas de água é a eutrofização (excesso de nutrientes como os nitratos e fosfatos), que pode potenciar o crescimento de microalgas (ou fitoplâncton). Particularmente, o grupo das cianobactérias é caracterizado pela capacidade de, em condições adequadas, crescer massivamente dominando a comunidade fitoplanctónica nas massas de água. Este fenómeno é designado de florescência ou *bloom* e pode ter efeitos nefastos na qualidade da água, nomeadamente com a produção de toxinas e outros compostos indesejáveis (Agência Nacional das Águas - ANA, 2001; Chorus & Bartram, 1999).

As intoxicações relacionadas com a ingestão de água em animais de produção, estão por vezes relacionadas com a toxinas produzidas pelas cianobactérias. Nesta perspetiva, a identificação de casos de mortalidade e de doença nos animais de produção, animais de companhia, aves e peixes, relacionadas com as cianobactérias, pode servir de sentinela para prever ou identificar riscos potenciais para a Saúde Humana. A monitorização do ambiente e da saúde animal numa rede colaborativa “One Health” pode fornecer avisos de importância vital para prevenção de riscos para a saúde pública, tendo em conta a toxicidade das cianobactérias (Hilborn & Beasley, 2015).

1.2 Fitoplâncton

Fitoplâncton tem origem no nome **Fito**, palavra oriunda do grego *phyto*, que significa planta e **Plâncton**, *plagktós*, que quer dizer à deriva, deslocar-se sem rumo, que não dispõe de movimentos próprios capazes de se opor aos movimentos da água (Reynolds, 1984).

O fitoplâncton é uma comunidade de organismos unicelulares microscópicos, de vida livre com capacidade fotossintética, que vivem em suspensão na zona eufótica da coluna de água em sistemas aquáticos. São também designados de microalgas (Lalli & Parsons, 1994, Esteves, 1998).

Durante o processo de fotossíntese, o oxigénio molecular (O₂) é libertado na água. Estima-se que cerca de dois terços do oxigénio atmosférico do planeta seja produzido pela comunidade fitoplanctónica, através da fotossíntese; o restante é produzido pelas árvores, arbustos, ervas e outras plantas. O fitoplâncton é a base da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, sendo responsável pela fixação do carbono e criação de biomassa (Bellinger & Sigeo, 2010).

O fitoplâncton inclui um conjunto de microalgas, sendo de destacar os seguintes grupos: Cianobactérias (algas verdes-azuis), Clorófitas (algas verdes), Crisófitas (algas douradas), Diatomáceas, Criptófitas, Dinoflagelados, Euglenófitas e Desmídeos (figuras 5 e 6), (INAG, I.P, 2009). As cianobactérias são consideradas as mais problemáticas, devido ao seu potencial tóxico e riscos para a saúde pública (Chorus & Bartram, 1999).

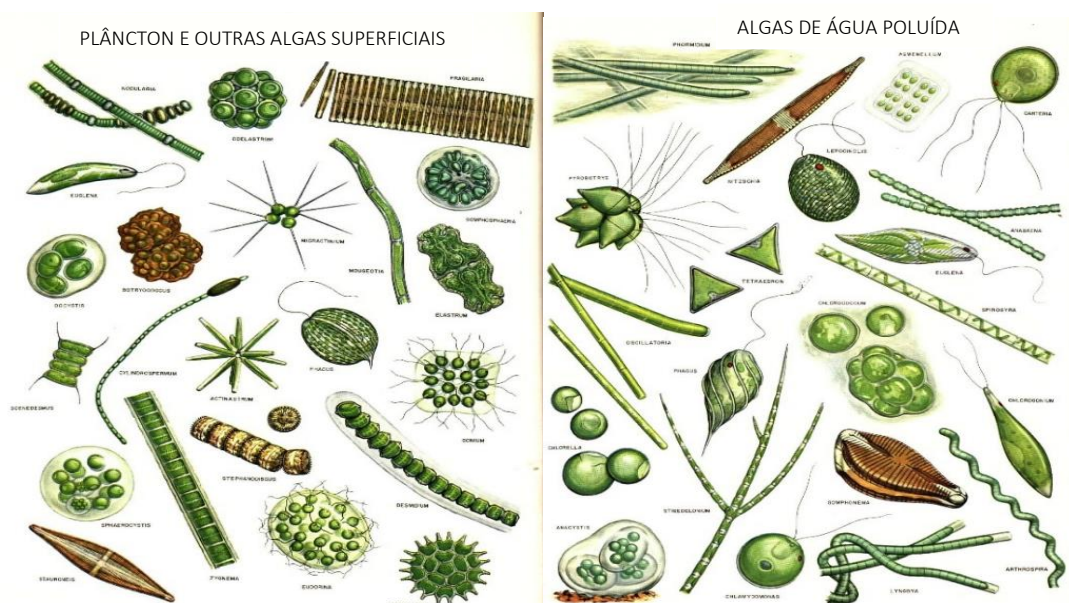


Figura 5. Alguns exemplos de fitoplâncton encontrado em águas superficiais (Arizona News, n.d).

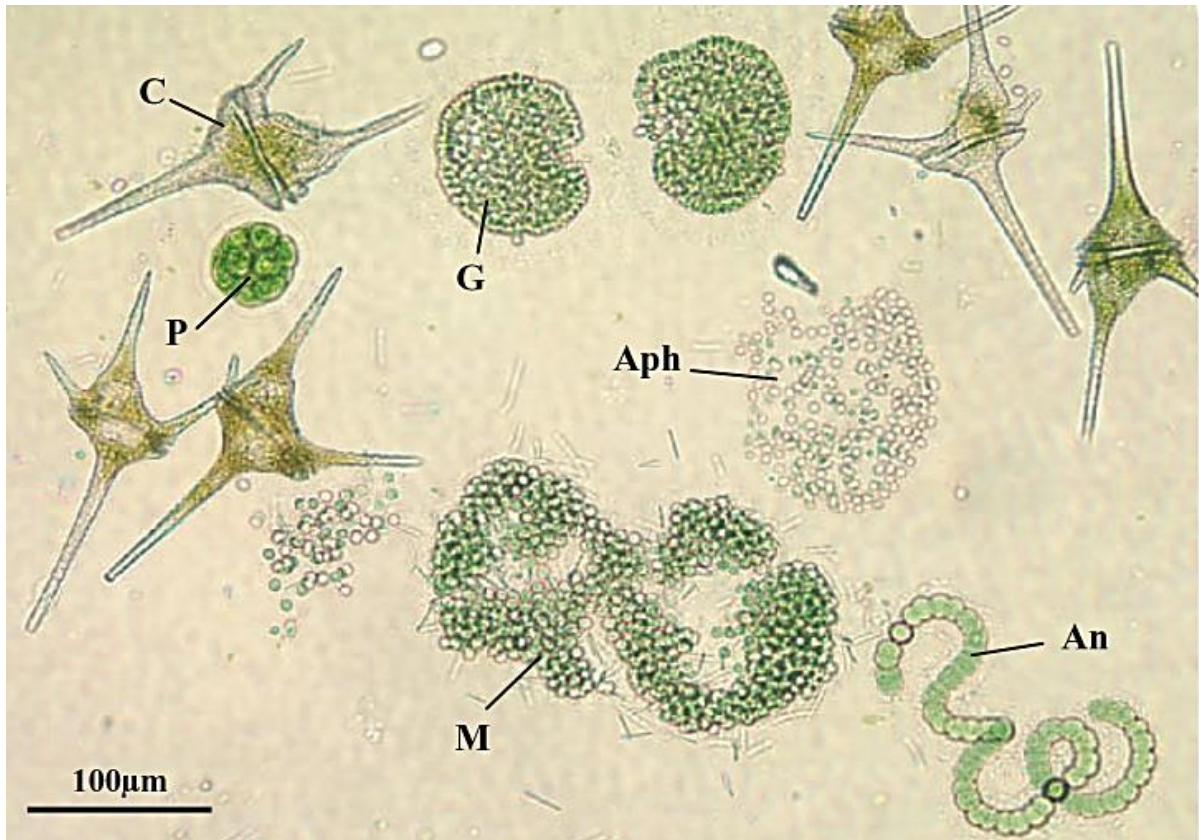


Figura 6. Diferenças morfológicas observáveis ao microscópio ótico, entre os principais grupos de algas encontrados em água doce. Dinoflagelados (C), cianobactérias (An, Aph, M) e Clorófitas (P, G) (Bellinger & Sigeo, 2010).

1.3 Biologia e diversidade de cianobactérias

O provérbio Dinamarquês “*A pet child has many names*” ilustra bem a quantidade de expressões usadas para descrever as cianobactérias, como *blue-green algae* (algas azuis esverdeadas), cianófitas, cianofíceas, cianoprocariontes, entre outras (Chorus & Bartram, 1999).

As cianobactérias são microrganismos primitivos, aeróbios e foto-autotróficos. Surgiram na Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, desde a era pré-cambriana (Kalaitzidou *et al.*, 2016), sendo estas as principais responsáveis pela formação da atmosfera atual (figura 7) (Holland, 2006); (Molica & Azevedo, 2009) e (Bellinger & Sigeo, 2010). Estes microrganismos possuem propriedades encontradas em algas e bactérias, assim como a capacidade de efetuar o processo de fotossíntese através da absorção da luz solar, para a obtenção de energia

utilizada no seu metabolismo. Foram determinantes no aparecimento e evolução dos primeiros organismos eucariotas (Chorus & Bartram, 1999).

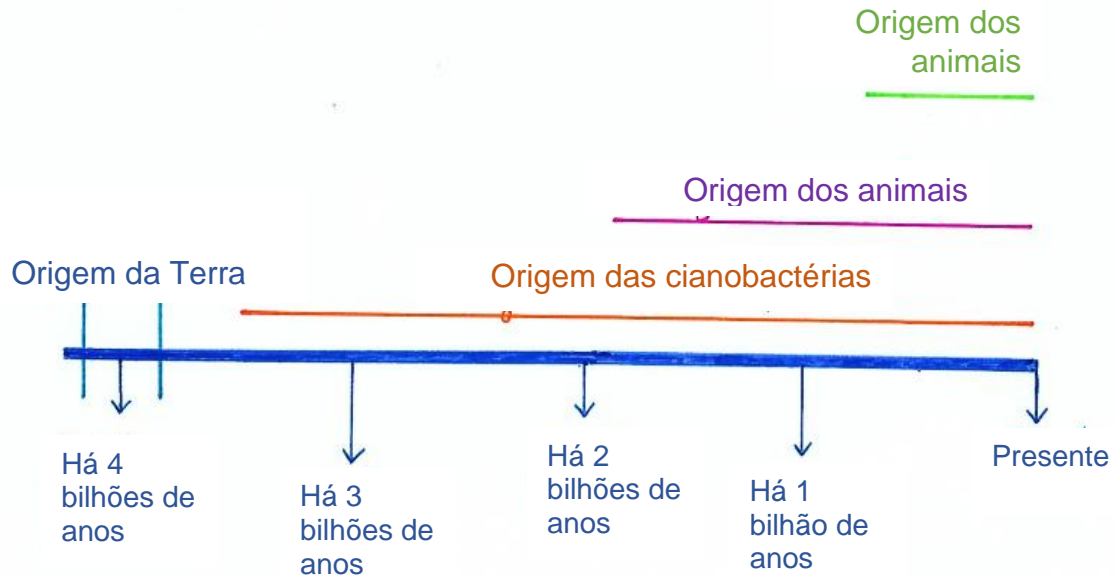


Figura 7. Origem da vida na Terra. (Adaptado de Understanding Macroevolution - Course Hero, n.d).

As cianobactérias, são o único grupo de algas classificadas como procariontes, caracterizando-se pela ausência de membranas e, geralmente, a única membrana existente é a membrana plasmática (Junqueira e Carneiro, 2000). Podem ser caracterizadas como organismos semelhantes a bactérias gram-negativas (Beasley, Cook, Dahlem, Hooser, & Lovell, 1989). São organismos unicelulares, solitários ou coloniais (Kalaitzidou, *et al*, 2016), de pequenas dimensões (<10 μm de diâmetro), sem núcleo individualizado, onde o DNA circular, está disperso no citoplasma. Não possuem complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias ou cloroplastos (Wetzel, 1993). As cianobactérias reproduzem-se de forma assexuada, por um processo denominado divisão binária ou bipartição, através do qual uma célula mãe se divide em duas células-filha geneticamente iguais e de igual tamanho (Chorus & Bartram, 1999).

As cianobactérias diferem das bactérias heterotróficas pelo facto de conterem clorofila-a, um pigmento fotossintético primário, comum às algas eucariotas e a plantas vasculares (Bellinger & Sigee, 2010), localizada em tilacoides, no citoplasma próximo da periferia da célula (Chorus & Bartram, 1999). Possuem, também, pigmentos acessórios como as ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina), que lhes conferem a capacidade de absorver a luz mais eficientemente, adaptando-se facilmente a uma grande diversidade de ambientes. As

ficobilinas são os pigmentos responsáveis pela variabilidade de cores das cianobactérias: ficocianina (azul), ficoeritrina (vermelho) (Lund, 1965). Todas as cianobactérias contêm clorofila-a e ficocianina (Chorus & Bartram, 1999).

Algumas espécies têm a capacidade de formar vacúolos gasosos, que são inclusões citoplasmáticas, e lhes conferem flutuabilidade permitindo, desta forma, controlar a sua posição vertical na coluna de água e competir pela disponibilidade de luz, concentração de CO₂ e nutrientes (Bellinger & Sigee, 2010; WHO, 2011).

As cianobactérias são consideradas excelentes colonizadoras ambientais, possuem células morfologicamente e funcionalmente diferenciadas com vantagens adaptativas no processo evolutivo em relação aos outros organismos fitoplanctônicos, de que são exemplos, os heterocistos e os acinetos (figura 8). Os heterocistos são células especializadas, formadas a partir de células vegetativas, que possuem um envelope celular espesso (Meeks, Campbell, Summers, & Wong, 2002; Thiel, 2006), sendo responsáveis pela fixação do azoto atmosférico, e ocorrem em espécies filamentosas da família Nostocaceae entre outras (Wetzel, 1993). O processo de diferenciação de célula vegetativa a heterocisto ocorre em resposta a uma baixa quantidade de compostos azotados (Tomitani *et al.*, 2006). Os acinetos são células vegetativas diferenciadas, com parede celular espessa, consideradas células de resistência, que se desenvolvem quando as condições ambientais são desfavoráveis (Wetzel, 1993). Sobrevivem a diferentes condições ambientais como o frio e a dissecação, são capazes de germinar e formar novas células e têm a capacidade de acumular reservas de proteínas, garantindo a sua sobrevivência e germinação em condições favoráveis (Tomitani *et al.*, 2006).

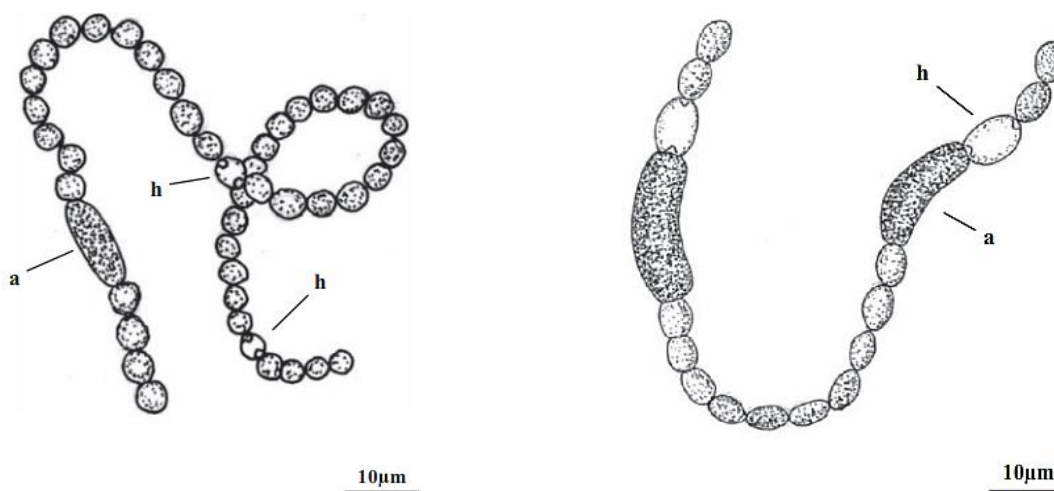


Figura 8. Presença de células diferenciadas em *Dolichospermum circilane* (*Anabaena circinalis*) (esquerda) e *Dolichospermum flos-aquae* (*Anabaena flos-aquae*) (direita). Acinetos (a) e heterocistos (h) (Bellinger & Sigee, 2010).

de adaptação a temperaturas extremas (altas ou baixas), sobrevivendo tanto em fontes hidrotermais como em lagos antárticos (Chorus & Bartram, 1999; WHO, 2011).

As cianobactérias de água doce são geralmente divididas em sub-grupos, relativamente à sua ecologia, morfologia (unicelulares ou coloniais), presença ou ausência de células diferenciadas, bainha de mucilagem e a natureza da ramificação em forma de filamentos (a ramificação pode ser verdadeira ou falsa, de acordo com o plano de divisão celular (Lopes *et al.*, 2012). De seguida abordam-se os três grupos mais representativos.

Ordem: CHROOCOCCALES

Chroococcales, é o grupo mais simples de cianobactérias, maioritariamente unicelulares, podendo ser observadas como células únicas ou agregadas em colónias (ex. *Microcystis*) (figura 9). São células cocóides (cilíndricas, ovoides ou esféricas) (Lopes *et al.*, 2012), sem formas filamentosas, envolvidas por uma fina camada de mucilagem (Bellinger & Sigeo, 2010). São um grupo de algas maioritariamente planctónicas embora também ocorram como bentónicas e não possuem células diferenciadas (Bellinger & Sigeo, 2010; Saúde, 2015). Apenas as espécies planctónicas possuem vacúolos de gás (Bellinger & Sigeo, 2010).

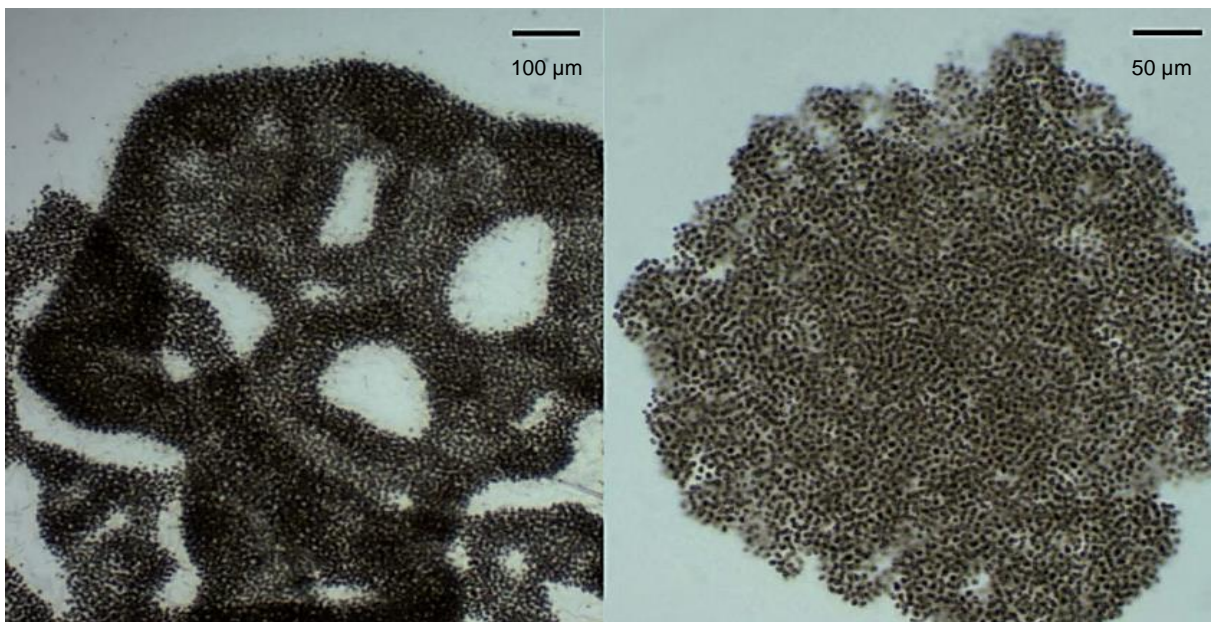


Figura 9. *Microcystis aeruginosa* (esquerda); *Microcystis flos-aquae* (direita) (Cirés & del Corral, 2011).

Ordem: NOSTOCALES

Nostocales, é um grupo diversificado de cianobactérias filamentosas, sem ramificação verdadeira, planctónicas ou bentónicas, com diferenciação celular facultativa em heterocistos e acinetos (figura 10) (Bellinger & Sigee, 2010). Algumas espécies apresentam, por vezes uma bainha mucilaginosa, envolvendo e protegendo o filamento (Lopes *et al.*, 2012). Encontram-se no plâncton de águas doces e salobras. Inclui os seguintes géneros: *Anabaenopsis sp.*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* (*Anabaena sp.*) e *Gloeotrichia*, *Nodularia* (Bellinger & Sigee, 2010).

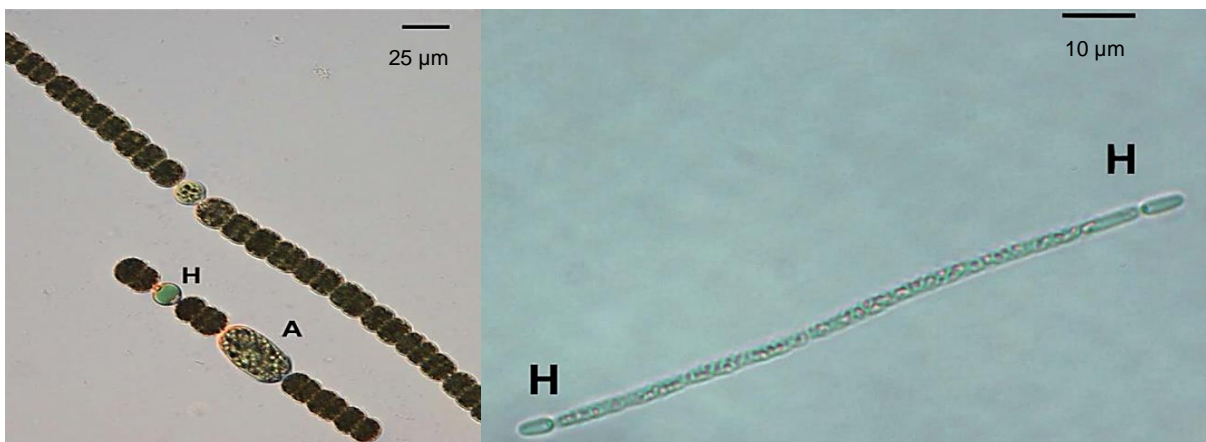


Figura 10. *Dolichospermum planctonicum* (*Anabaena planctonica*), H: heterocisto; A: acineto (esquerda); *Cylindrospermopsis raciborskii*, H: heterocisto (direita) (Cirés & del Corral, 2011).

Ordem: OSCILLATORIALES

Oscillatoriales, são um grupo de cianobactérias filamentosas (Saúde, 2015), que não possuem células diferenciadas, são relativamente simples, podem ser planctónicas ou bentónicas (figura 11) (Bellinger & Sigee, 2010). As células estão dispostas em sequências unisseriadas (tricoma) e podem apresentar ou não bainha mucilaginosa. A divisão celular é feita ao longo do eixo do tricoma num único plano, e a reprodução ocorre por fragmentação (quebra) do tricoma (Lopes *et al.*, 2012).

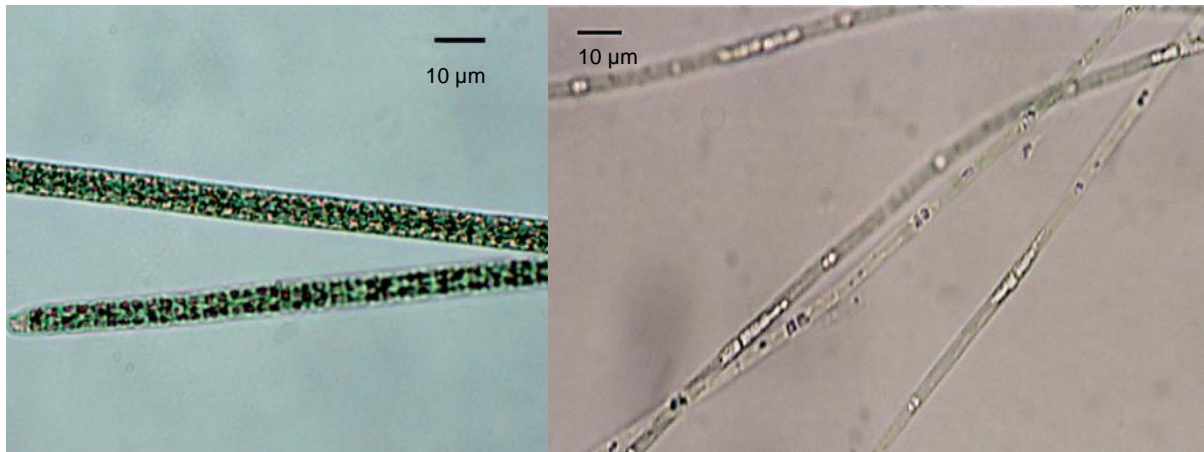


Figura 11. *Planktothrix agardhii* (esquerda); *Limnothrix redekei* (direita) (Cirés & del Corral, 2011).

1.4 Eutrofização e fatores que influenciam o desenvolvimento de *blooms*

A eutrofização pode ser definida como um aumento da quantidade de nutrientes e/ou matéria orgânica num ecossistema aquático, resultando numa maior produtividade primária e, geralmente, na diminuição da qualidade da água (WHO, 2011). É um fenómeno cada vez mais comum, maioritariamente induzido direta ou indiretamente por atividades humanas e que afeta inúmeros lagos, albufeiras, rios e mesmo zonas marinhas costeiras do mundo inteiro (Chorus & Bartram, 1999). O escoamento de fertilizantes dos campos agrícolas, os efluentes industriais, os esgotos das áreas urbanas e a desflorestação, são algumas das possíveis fontes. A eutrofização, conjuntamente com a elevada incidência solar e temperaturas altas, propiciam o crescimento massivo de cianobactérias e a formação de grandes massas verdes na superfície de lagos e albufeiras. Estas são denominadas de florescências ou *blooms*, sendo mais visíveis durante as estações mais quentes (WHO, 2011; Preece *et al.*, 2017).

A alteração dos padrões de precipitação, hidrologia e ventos, são responsáveis pelo fenómeno de estratificação térmica em lagos e lagoas. Este acontecimento, promove a formação de águas estagnadas, e conseqüentemente, a ocorrência de variações na concentração de nutrientes. A ocorrência de *blooms* nocivos de cianobactérias, do inglês, “*Cyanobacterial Harmful Algal Blooms*” (*CyanoHABs*) é influenciada por um conjunto de fatores físico-químicos, hidrológicos, meteorológicos, biológicos e antropogénicos. Estes

fatores contribuem para a eutrofização, potenciando o crescimento de cianobactérias e de *CyanoHABs* (Paerl & Huisman, 2009; Bartosiewicz *et al.*, 2019).

Os principais fatores que influenciam o crescimento de cianobactérias são:

- Altas concentrações de nutrientes, particularmente o fósforo (P) e o azoto (N);
- Temperatura da água (que pode variar entre 15°C a 30°C);
- Intensidade da luz;
- Águas neutro alcalinas com o pH de 6 a 9;
- Existência de micronutrientes;
- Estratificação térmica do ecossistema aquático (Kalaitzidou, *et al.*, 2016; Meriluoto, Spoof, & Codd, 2017).

As cianobactérias, são organismos primitivos que têm vindo a evoluir e adaptar-se, com sucesso, a diferentes ambientes e condições ambientais, conseguindo frequentemente dominar a comunidade fitoplanctónica.

A capacidade para competir com outras algas de água doce em ambientes eutrofizados deve-se a uma série de características, incluindo:

- Crescimento ótimo a altas temperaturas - temperaturas de verão;
- Tolerância a baixa intensidade de luz - fator importante tendo em conta a alta densidade de algas num *bloom*;
- Tolerância a baixos valores de fósforo e azoto - permite a continuação de crescimento mesmo quando o azoto se torna escasso;
- Capacidade de flutuação - mecanismo ecologicamente importante que permite às cianobactérias controlar a sua posição na coluna de água;
- Resistência à herbivoria por parte do zooplâncton – produção de cianotoxinas;
- Tolerância para valores de pH altos e concentrações de CO₂ baixas – Vantagem sobre outras algas que não sobrevivem nestas condições;
- Associação simbiótica com bactérias aeróbias – a simbiose entre cianobactérias e bactérias aeróbias permite a fixação do azoto no heterocisto, ao manter as condições de anaerobiose necessárias para a sua fixação, são também uma importante fonte de nutrientes inorgânicos (Chorus & Bartram, 1999; Bellinger & Sigee, 2010) .

1.5 Impacto das alterações climáticas no crescimento das cianobactérias

Como consequência das alterações climáticas registadas nas últimas décadas, os ecossistemas marinhos e de água doce estão a aquecer, a acidificar e a desoxigenar (Griffith & Gobler, 2020). Estudos recentes têm demonstrado que o processo de aquecimento global poderá intensificar a formação de *CyanoHABs* em função do aumento da temperatura média da água nos ecossistemas aquáticos, aumentando a sua taxa de crescimento, persistência e distribuição geográfica (Paerl & Huisman, 2009 ;Svirčev *et al.*, 2019; Zanchett & Oliveira-Filho, 2013). Segundo (Bartosiewicz *et al.*, 2019), o aquecimento global provoca não só um aumento do nível das águas, devido ao degelo, como também um aumento da temperatura média da água e prolonga o período de estratificação térmica (Paerl & Huisman, 2009). Na figura 12, encontram-se esquematizados os efeitos das alterações climáticas e da estratificação térmica do ecossistema no fenómeno de produção massiva de cianobactérias.

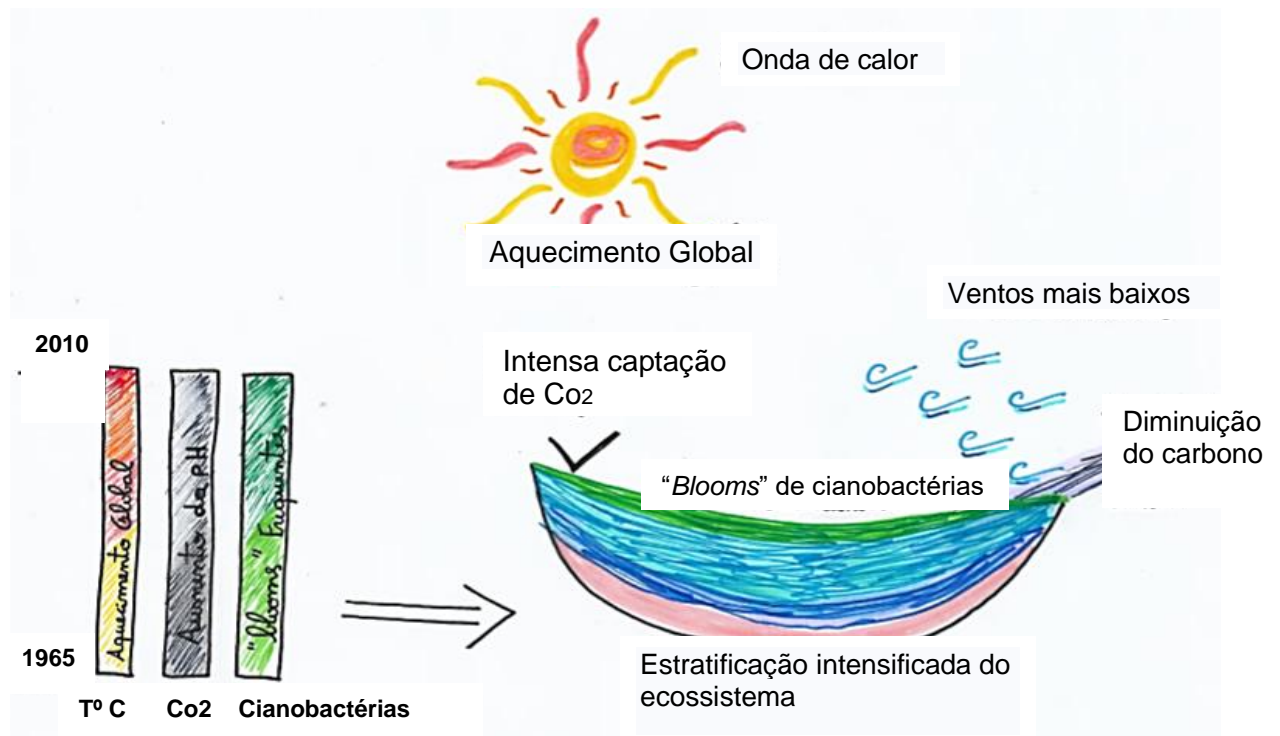


Figura 12. Relação entre as alterações climáticas e a estratificação térmica do ecossistema que influenciam o aparecimento de *blooms* de cianobactérias. (Adaptado de Paerl & Huisman, 2009; Bartosiewicz *et al.*, 2019).

A estratificação do ecossistema provoca a estabilidade na coluna de água e intensifica o crescimento massivo de *CyanoHABs* e a formação de grandes massas verdes na superfície, como consequência dessa florescência, devido à captação intensiva de CO₂ por parte das cianobactérias durante a fotossíntese, ocorre uma diminuição da disponibilidade de CO₂ nas águas, e o pH torna-se cada vez mais básico (Paerl & Huisman, 2009 ; Bartosiewicz *et al.*, 2019). Várias espécies de cianobactérias são capazes de crescer em ambientes alcalinos, usando o ião bicarbonato (HCO₃⁻) como fonte de carbono (Paerl & Huisman, 2009).

1.6 Impacto de *blooms* de *CyanoHABs* no ecossistema aquático

A proliferação excessiva de cianobactérias está associada a consequências nocivas para o meio aquático. O desenvolvimento de *blooms* impede a passagem da luz solar através da camada superficial da coluna de água, devido à presença de enormes massas verdes superficiais, que impedem os raios solares de progredirem até zonas mais profundas, causando perturbações nas interações tróficas com perda da biodiversidade local. As algas foto-autotróficas ficam incapacitadas de realizar o processo de fotossíntese, acabando por morrer, ocorre desoxigenação das águas, diminuindo a quantidade de oxigénio disponível e consequentemente a fonte de alimento para outros organismos. Há uma quebra no equilíbrio do ecossistema e uma diminuição de espécies fitoplanctónicas (Wassmann & Olli, 2005 ; Fristachi *et al.*, 2008).

Apesar das capacidades fotossintéticas do fitoplâncton, o O₂ libertado permanece à superfície e a taxa de oxigénio dissolvido diminui, não sendo restabelecida nos níveis inferiores da coluna de água (Wassmann & Olli, 2005). O aumento de detritos provocado pela morte dos microrganismos foto-autotróficos, potencia um crescimento de bactérias decompositoras, que consomem oxigénio, levando à morte de peixes por anóxia (Chorus & Bartram, 1999). Os peixes têm um papel importante na manutenção dos ecossistemas aquáticos, devido à posição que ocupam nas cadeias alimentares. Por outro lado, são uma fonte de alimentação humana (Drobac *et al.*, 2016).

Também o aumento de pH da água, provocado pela intensa atividade fotossintética das cianobactérias e o aumento do amoníaco na água resultante da decomposição das mesmas, causa lesões irreversíveis nos peixes ao nível das brânquias (Chorus & Bartram, 1999). As lesões no epitélio branquial, promovem a absorção passiva de cianotoxinas (Drobac *et al.*, 2016).

Alguns géneros de cianobactérias, tais como *Dolichospermum*, (*Anabaena* sp.) e *Planktothrix*, produzem compostos que conferem odor e sabor desagradável à água, popularmente conhecidos por “cheiro ou gosto a terra”. Os dois compostos mais comuns são a geosmina e o 2-metilisoborneol (WHO, 2011; Hilborn & Beasley, 2015) e são indicadores importantes da qualidade das águas, embora estes compostos não apresentem riscos conhecidos para a saúde humana e animal, são indicativos da existência de cianobactérias e, eventualmente, da presença de cianotoxinas (Hilborn & Beasley, 2015). Estes fatores limitam a utilização destas águas para recreação ou abastecimento (Molica & Azevedo, 2009).

1.7 Cianobactérias produtoras de cianotoxinas

“Toxina” no contexto científico, significa qualquer substância venenosa, tóxica, de origem biológica, produzida dentro de células ou organismos vivos e que pode causar intoxicações a outros organismos. As toxinas de cianobactérias, são frequentemente chamadas de biotoxinas ou toxinas naturais (Science Learning Hub, 2012; Merriam Webster, 2020).

As florescências ou *blooms* são fenómenos complexos, nos quais, pode ocorrer o desenvolvimento de espécies produtoras de metabolitos secundários tóxicos (cianotoxinas) (Churro & Valério, 2015 ; Preece *et al.*, 2017) sendo estes, considerados um dos grupos mais letais de biotoxinas atualmente conhecidas, apresentando elevados riscos de doença e mortalidade associada (Svirčev *et al.*, 2019). Em *blooms* estima-se que a percentagem de estirpes de cianobactérias com capacidade de produção de cianotoxinas, correspondem a 75%. No entanto, nem todas as cianobactérias são produtoras de toxinas (WHO, 2011). As espécies produtoras de cianotoxinas nem sempre as produzem, podendo ser tóxicas durante apenas um período do ano, do mês ou da semana (Molica & Azevedo, 2009). Algumas cianotoxinas podem ser produzidas por diferentes géneros de cianobactérias e cada género

de cianobactérias pode produzir mais do que uma cianotoxina (WHO, 2011 ; Liyanage *et al.*, 2016).

As cianotoxinas podem estar ligadas à membrana plasmática ou livres, no interior das células. São normalmente libertadas de forma passiva durante a fase de lise ou morte celular (endotoxinas). Este é um fator importante a ter em conta nas estações de tratamento de águas que recorram a algicidas, como o sulfato de cobre, que pode levar a uma lise completa das cianobactérias e conseqüentemente, a uma libertação significativa de cianotoxinas para a água (Liyanage *et al.*, 2016).

A verdadeira função biológica das cianotoxinas ainda não está bem esclarecida e apesar da falta de evidência sobre a razão pela qual as cianobactérias produzem toxinas, a hipótese mais provável é que estes compostos sejam produzidos em resposta a condições ambientais adversas, com função protetora contra predação de espécies zooplanctónicas (predadores primários do fitoplâncton) (Liyanage *et al.*, 2016).

Contudo, o papel ecológico das cianotoxinas, bem como os fatores ambientais que potenciam a sua produção, continuam a ser objeto de estudo e de várias hipóteses (Henao, Rzymiski, & Waters, 2019). Os nutrientes associados à eutrofização antropogénica, como o azoto (N) e fosforo (P) em águas doces, são identificados como fatores-chave na produção de toxinas, mas de acordo com Henao *et al.*, (2019), em ambientes hiper-eutrofizados controlados laboratorialmente, as cianobactérias não produzem cianotoxinas. Segundo os mesmos autores, nutrientes que geralmente têm menos influência no estado trófico dos ecossistemas de água doce, tais como enxofre (S) e ferro (Fe), também têm sido associados à ocorrência de toxinas, bem como as alterações nos rácios N/P.

Na tabela 6 estão esquematizadas as principais características dos principais grupos de cianotoxinas, cianobactérias produtoras e principais órgãos-alvo em mamíferos.

1.7.1 Classificação

As cianotoxinas podem ser divididas com base em dois critérios principais:

- 1) Através do seu mecanismo de ação, em três classes principais: Hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas;

- 2) De acordo com a sua estrutura química, podem ser classificadas como: Péptidos cíclicos, alcalóides ou lipopolissacáridos (Chorus & Bartram, 1999 ; Zanchett & Oliveira-Filho, 2013 e Kalaitzidou *et al.*, 2016).

As neurotoxinas e as hepatotoxinas são os grupos de cianotoxinas com maior interesse devido à sua toxicidade e impacto ambiental. De entre as espécies produtoras destacam-se *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Molica & Azevedo, 2009 ; Roset *et al.*, 2001).

· NEUROTOXINAS

As neurotoxinas são produzidas principalmente por espécies e estirpes dos géneros: *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Cylindrospermopsis* (tabela 6) (Roset *et al.*, 2001). Embora possuam diferentes mecanismos de ação nos vertebrados, todas as neurotoxinas provocam paralisia respiratória, que muitas vezes culmina na morte do organismo, minutos após a exposição (Molica & Azevedo, 2009 ; Roset *et al.*, 2001).

A primeira neurotoxina a ser definida química e funcionalmente foi a anatoxina-a (Roset *et al.*, 2001). A anatoxina-a é um alcaloide neurotóxico, bloqueador neuromuscular pós-sináptico dos recetores nicotínicos e colinérgicos (figura 13). Este mecanismo ocorre pela ligação irreversível da toxina aos recetores da acetilcolina, uma vez que não é degradada pela acetilcolinesterase. Os canais de sódio pós-sinápticos permanecem abertos, gerando potenciais de ação consecutivos que levam à exaustão energética do neurónio. É produzida por diversos géneros, de entre os quais *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Planktothrix* e *Aphanizomenon* (Westrick, Szlag, Southwell, & Sinclair, 2010).

A anatoxina-a(S) é um organofosforado, de igual mecanismo de ação que o da anatoxina-a, que inibe a ação da acetilcolinesterase, impedindo que a acetilcolina se degrade. É de todas as neurotoxinas, a que possui menor número de registo de casos por intoxicação (Molica & Azevedo, 2009).

As saxitoxinas (STX), também sintetizadas por dinoflagelados, pertencem ao grupo das toxinas paralisantes de mariscos (PST, do inglês, “*Paralytic Shellfish Toxins*”). São alcaloides neurotóxicos, isolados pela primeira vez em dinoflagelados marinhos, organismos

causadores das conhecidas marés vermelhas (figura 13) (Molica & Azevedo, 2009). São produzidas por cianobactérias dos géneros *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*, entre outros (Chorus & Bartram, 1999). As PST's inibem a propagação do impulso nervoso, através do bloqueio dos canais de sódio afetando a permeabilidade do sódio e impossibilitando a propagação dos impulsos nervosos através dos neurónios até aos músculos esqueléticos (Molica & Azevedo, 2009).

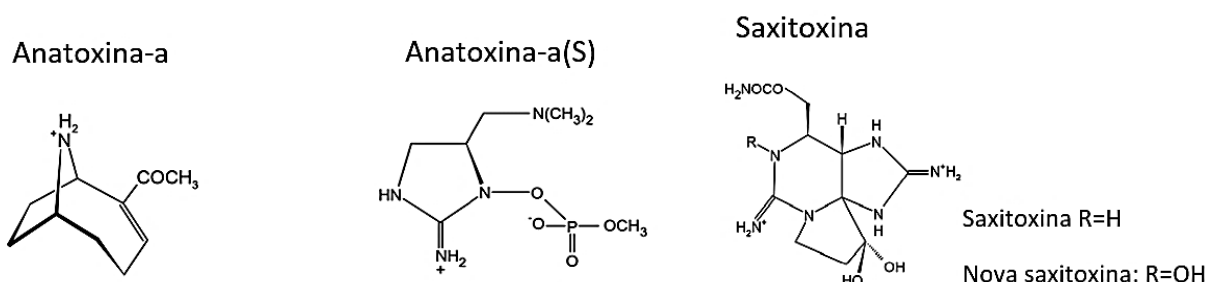


Figura 13. Estruturas moleculares das cianotoxinas neurotóxicas mais conhecidas (Svirčev *et al.*, 2019).

HEPATOTOXINAS

Estão globalmente disseminadas, sendo o grupo mais estudado de cianotoxinas. As lesões hepatotóxicas em mamíferos, causadas por estas toxinas, estão descritas na literatura como as mais frequentes e, segundo (Liyanage *et al.*, 2016), são as lesões melhor estudadas e das quais existem mais artigos publicados em todos os continentes.

Contrariamente às neurotoxinas, as hepatotoxinas têm um mecanismo de ação lento, são inibidores seletivos da síntese proteica (Meriluoto *et al.*, 2017), provocam lesões irreversíveis no tecido interno hepático, decorrente da desagregação dos filamentos intermédios dos hepatócitos (McLellan & Manderville, 2017) e hepatomegalia até várias vezes o seu tamanho normal (C Menezes *et al.*, 2019). A morte do organismo ocorre por hemorragia intra-hepática e choque hipovolémico, num intervalo de horas a poucos dias (McLellan & Manderville, 2017) e (Wiegand & Pflugmacher, 2005).

As microcistinas (MCs) são um grupo de hepatotoxinas ubíquas, presentes em *blooms* de cianobactérias em grandes quantidades, são as cianotoxinas mais comuns, descritas em

Portugal (C Menezes *et al.*, 2019) e são produzidas por muitas espécies de diferentes géneros de cianobactérias, sendo o género *Microcystis* o mais frequente. A microcistina-LR (MC-LR) é a variante hepatotóxica mais comum e é considerada a mais tóxica (Meriluoto *et al.*, 2017). Tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, tendo por isso como órgãos-alvo, para além do fígado, o cérebro (Fischer *et al.*, 2005). Conhecem-se cerca de 200 variantes de MCs com diferentes graus de toxicidade e pesos moleculares (Liyanage *et al.*, 2016).

As MCs não são capazes de atravessar diretamente as membranas lipídicas das células animais, vegetais ou bacterianas, entram nas células através de transporte ativo, por meio de proteínas transmembranares, os OATPs, do inglês, “*organic anion transporters polypeptides*”, expressos principalmente nos hepatócitos e na barreira hematoencefálica, desencadeando uma desorganização do citoesqueleto das células (Chorus & Bartram, 1999 ; Fischer *et al.*, 2005).

Segundo (Menezes *et al.*, 2019), as principais vias de exposição às microcistinas são a ingestão de água ou alimentos contaminados, o contacto dérmico direto ou a inalação de água contaminada. Embora, nos mamíferos, os efeitos primários observados da MC-LR estejam, relacionados, maioritariamente com hepatotoxicidade, a resposta tóxica nos outros órgãos e tecidos, estende-se para além do fígado. Estudos recentes sugerem que os efeitos tóxicos da MC-LR afetam também os rins, cérebro, coração, órgãos reprodutivos, intestino e baço (McLellan & Manderville, 2017).

As Nodularinas (NODs) são pentapéptidos cíclicos, com estrutura muito semelhante às MCs, entram nas células animais através de OATPs. A primeira espécie produtora de NODs a ser identificada estruturalmente foi a *Nodularia spumigena*, uma cianobactéria que vive em água salobra, no Mar Báltico (Wiegand & Pflugmacher, 2005). Tanto as NODs como as MCs são potentes toxinas inibidoras das fosfatases proteicas (Meriluoto *et al.*, 2017).

A cilindrospermopsina (CYN) é uma hepatotoxina alcalóide tricíclica (Liyanage *et al.*, 2016), produzida por diferentes espécies de cianobactérias de água doce, tais como *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Chrysoosporum ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata* e *Chrysoosporum bergii* (tabela 6). A primeira espécie produtora de CYNs a ser estruturalmente identificada foi *C. raciborskii*, após um surto de hepato-enterite aguda num reservatório de abastecimento de água potável em Palm Island, na Austrália (Meriluoto *et al.*, 2017). A CYN provoca inibição irreversível da síntese proteica (Wiegand & Pflugmacher, 2005) e da síntese de glutatona, através da ativação de mecanismos dependentes do citocromo-P450 (Meriluoto *et al.*, 2017), sendo classificada como uma toxina hepatotóxica, neurotóxica e carcinogénica (Liyanage *et al.*, 2016). Diferentes estirpes de *C. raciborskii* são capazes de

produzir várias toxinas, incluindo CYNs, PST's e alguns compostos desconhecidos (Wiegand & Pflugmacher, 2005). Ocorre bioacumulação de CYN, mesmo em exposição a quantidades vestigiais da toxina. Embora existam espécies não tóxicas, estas toxinas são consideradas uma das mais importantes toxinas de água doce, ameaçando de forma global a qualidade da água e o ecossistema aquático (Wiegand & Pflugmacher, 2005 ; Liyanage *et al.*, 2016).

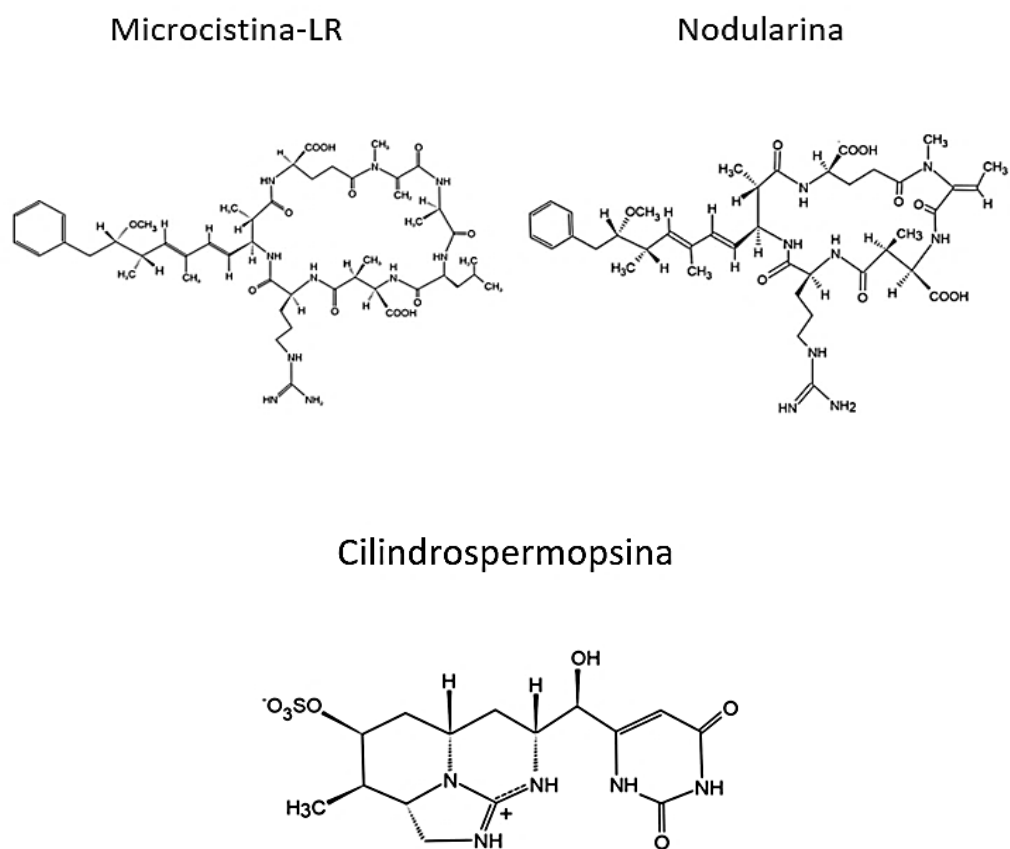


Figura 14. Exemplos de estruturas moleculares de cianotoxinas hepatotóxicas mais conhecidas (Svirčev *et al.*, 2019).

Tabela 6. Características gerais dos principais grupos de cianotoxinas, cianobactérias produtoras e principais órgãos-alvo em mamíferos. (Adaptado de McLellan & Manderville, 2017 e Liyanage *et al.*, 2016).

Grupo da toxina	Estrutura molecular	Principal órgão-alvo em mamíferos	Cianobactérias produtoras
HEPATOTOXINAS			
Microcistina (ex. MC-LR)	Heptapéptido cíclico	Fígado e rim	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Microcystis aeruginosa</i> · <i>Anabaena sp.</i> · <i>Planktotrix sp.</i> · <i>Oscillatoria sp.</i> · <i>Nostoc sp.</i> · <i>Hapalosiphon sp.</i> · <i>Anabaenopsis sp.</i>
Nodularina	Pentapéptido cíclico	Fígado	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Nodularia spumigena</i>
Cilindrospermopsina	Alcaloide	Fígado e rim	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> · <i>Chrysochlorum bergii</i> · <i>Chrysochlorum ovalisporum</i>
NEUROTOXINAS			
Anatoxina-a	Alcaloide	Nervo sináptico	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Anabaena sp.</i> · <i>Planktothrix sp.</i> · <i>Aphanizomenon sp.</i> · <i>Oscillatoria sp.</i> · <i>Nostoc sp.</i>
Anatoxina-a(S)	Organofosforado	Nervo sináptico	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Anabaena sp.</i>
Toxinas PST <ul style="list-style-type: none"> · Saxitoxina · Neo-saxitoxina 	Alcalóide	Nervo axónio	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Anabaena circinalis</i> · <i>Aphanizomenon sp.</i> · <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> · <i>Lyngbya wollei</i>
CITOTOXINAS			
Cilindrospermopsina	Alcaloide	Fígado, rim, baço, intestino e coração	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Cylindrospermopsis sp.</i> · <i>Umezakia sp.</i>

1.7.2 Legislação Nacional Aplicável

A relação entre os recursos hídricos e a saúde é complexa (Molica & Azevedo, 2009). Com o aumento exponencial da população humana, a influência das atividades antropogénicas (agrícolas, urbanas e industriais), no aumento da dimensão, persistência sazonal e distribuição geográfica dos *CyanoHABs* tem vindo a intensificar-se a uma escala global. Nos países desenvolvidos, nomeadamente como é o caso do Continente Europeu, onde o crescimento da população é muito baixo ou nulo, o consumo doméstico de água *per capita* continua elevado (Meriluoto *et al.*, 2017).

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florescências de cianobactérias em massas de água para o abastecimento público e práticas recreativas, centra-se na possibilidade de estas produzirem cianotoxinas, libertando-as para o meio. Estas toxinas têm efeitos nocivos para a saúde pública e representam um grande desafio na sua gestão (Chorus & Bartram, 1999) e (Prado, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu valores guia provisórios de microcistina-LR para águas de abastecimento público e para fins recreativos (Chorus & Bartram, 1999). No caso da água de consumo, este valor foi transposto para a legislação Portuguesa em 2007, através do Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto e, posteriormente alterado para o Decreto-Lei nº 152/2017, de 7 de dezembro, sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano, que estipula como valor paramétrico da microcistina-LR, 1 µg/L. Define, ainda, na nota 12 da Parte III, que este parâmetro deve ser determinado à saída da estação de tratamento de água, quando há suspeitas de eutrofização da massa de água superficial. Caso seja confirmado um número de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas superior a 2000 células/ml, deve ser aumentada a frequência de amostragem, nos termos da avaliação do risco referida no artigo 14.º - A (AMBIENTE Decreto-Lei n.º 152, 2017). Devido à escassez de dados relativamente a outras toxinas, apenas foi definido pela OMS o valor guia para a microcistina-LR (Chorus & Bartram, 1999).

1.8 Saúde pública e epidemiologia

1.8.1 Riscos para a saúde pública

As cianobactérias presentes na maioria das águas superficiais são uma componente essencial na produção primária e cadeia alimentar, quando em equilíbrio. Por vezes a sua proliferação torna-se exagerada, constituindo uma preocupação devido à sua capacidade de produzir toxinas (Meriluoto *et al.*, 2017).

A exposição a estas toxinas pode ocorrer por ingestão de água contaminada, inalação ou contacto direto. A sintomatologia associada à exposição dos *CyanoHABs* em águas para abastecimento público ou recreativas inclui, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, ffbmusculares, parestesia nas pontas dos dedos dos pés, visão turva, cefaleia, tonturas, febre, hipoxia, cianose, paralisia respiratória ou cardíaca, resultando, muitas vezes, em morte (Gladan *et al.*, 2020; Meriluoto *et al.*, 2017 e Svirčev *et al.*, 2019). Estes efeitos ocorrem em minutos a dias após a exposição, dependendo dos tipos e concentração de cianotoxinas, da(s) via(s) de exposição, do peso corporal e idade das pessoas afetadas. A exposição crónica às cianotoxinas pode ser responsável pelo desenvolvimento de neoplasias (Svirčev *et al.*, 2019). Segundo resultados de estudos epidemiológicos e experimentais, a exposição aos *CyanoHABs*, associados a outros fatores de risco, pode potenciar o risco de incidência de alguns cancros (por exemplo tumor primário hepático, cerebral, cardíaco, mediastínico, pleural, renal, testicular, peritoneal, leucemia e melanoma maligno da pele) (Svirčev *et al.*, 2019).

A microcistina-LR para além de ser uma das cianotoxinas mais comuns, está classificada como grupo 2B, possivelmente carcinogénica para o Homem (IARC, 2009). Embora os dados disponíveis não sejam suficientes para afirmar que existe uma relação causal direta entre a exposição humana a esta cianotoxina e o desenvolvimento de tumores malignos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a exposição crónica a microcistinas, mesmo em concentrações baixas, pode levar ao aparecimento de tumores (nomeadamente carcinomas) em mamíferos, especialmente no fígado, rins e cólon (Chorus & Bartram, 1999).

A produção de cianotoxinas associadas a massas de água para consumo constitui um risco também para os animais de produção, os animais de companhia, a vida selvagem e, principalmente, a saúde pública. A intensificação da agricultura e pecuária bem como o uso indiscriminado de fertilizantes contribuem para o aumento da eutrofização das águas e conseqüente crescimento de cianobactérias (Kalaitzidou *et al.*, 2016).

1.8.2 Casos de intoxicação em Humanos

Caso de intoxicação na unidade de hemodiálise em Portugal, 1993

Em 1993, na unidade de hemodiálise do Hospital Espírito Santo, em Évora, morreram 20 pacientes submetidos a hemodiálise. A água fornecida a esta unidade continha elevadas concentrações de alumínio (Carina Menezes, Churro, & Dias, 2017). As referências ambientais sobre a ocorrência de cianobactérias em rios e lagoas na região do Alentejo são anteriores a 1993 e já nessa altura advertiam sobre o seu potencial tóxico e a necessidade de serem tomadas medidas (F. Araújo, 2006). Nas lagoas que abasteciam a cidade (a mesma água que abastecia a unidade de hemodiálise) foram identificadas espécies de cianobactérias do género *Microcystis*, *Anabaena* e *Aphanizomenon* (Araújo, 2006).

Não foram realizadas análises que comprovassem a presença de cianotoxinas, o que não permitiu correlacionar as cianotoxinas como a principal causa de morte destes doentes, contudo um estudo epidemiológico entre 1994 a 1995, mostrou uma correlação entre a ocorrência de cianobactérias e o aumento das enzimas hepáticas ALT e GGT na população submetida a hemodiálise (Menezes *et al.*, 2017). Este foi o primeiro caso epidemiológico registado em Portugal (Menezes *et al.*, 2017).

Caso de intoxicação numa unidade de hemodiálise no Brasil, 1996 - “Síndrome de Caruaru”

Em Fevereiro de 1996, uma unidade de hemodiálise em Caruaru, Estado de Pernambuco, Brasil, utilizou água para diálise proveniente de um reservatório de água contaminado com cianobactérias. As análises confirmaram a presença de microcistinas e cilindrospermopsinas nos filtros de carvão ativado da clínica, no soro sanguíneo e no tecido hepático dos pacientes (Azevedo *et al.*, 2002 ; Castro & Moser, 2012 e Falconer & Humpage, 2005). Cinquenta e dois dos 124 pacientes renais crónicos, submetidos à hemodiálise morreram de insuficiência hepática aguda, induzida pela hepatotoxina Microcistina-LR (Falconer & Humpage, 2005 ; Pugliese & Favero, 1998).

1.8.3 Casos de intoxicação em animais

Têm sido documentados, por todo o Mundo, casos de intoxicações em animais associados com a ocorrência de *blooms* de cianobactérias há mais de um século e, desde então o número de ocorrências registados em animais aumenta exponencialmente. Os animais são responsáveis por quase 80% das intoxicações existentes na literatura, sendo os cães e os animais de produção os mais afetados (Wood, 2016). Os animais com acesso a barragens de explorações agrícolas e lagoas podem estar em risco de exposição a cianotoxinas, durante a formação de um *bloom*, especialmente quando este, provocado pelo vento, se acumula no local de acesso à água dos animais (Hilborn & Beasley, 2015). O primeiro caso publicado na literatura de intoxicação por cianotoxinas em animais, foi datado de 1878, no Lago Alexandrina, na Austrália (tabela 7). Este país está particularmente sujeito à formação de *CyanoHABs* (Briand *et al.*, 2003 e Hilborn & Beasley, 2015).

Na tabela 7, estão descritos casos de intoxicação aguda atribuíveis à exposição por cianotoxinas, ocorridos entre os anos de 1800 e 2020, por localização, espécie afetada, número de mortes, cianobactéria(s) e toxina(s) associada(s). Infelizmente, devido a limitações de dados, é difícil precisar o número real de animais intoxicados, uma vez que, os autores descrevem os casos de forma indefinida (muito a pouco), não sendo possível determinar com exatidão, quantos animais podem ter sido intoxicados. No entanto, é de realçar o elevado número de casos descritos assim como a relação entre a presença de cianobactérias e/ou cianotoxinas à mortalidade de animais.

Tabela 7. Resumo dos casos de intoxicação em animais por cianobactérias e cianotoxinas descritos na literatura ocorridos entre os anos de 1800 e 2020. (Adaptado de BBC News, 2020; Menezes *et al.*, 2019; Hilborn & Beasley, 2015 e Sivonen, 2009).

Localização	Ano	Espécie afetada	Nº de mortes	Cianobactéria local de identificação	Toxina	Referências
Austrália, lago Alexandrina	1878	Animais de produção	>100 Animais	<i>Nodularia spumigena</i> identificada na água	Nodularina	(Sivonen, 2009; Hilborn & Beasley, 2015)
Finlândia, lago Vesijarvi	1928	Bovinos	40 Animais	<i>Anabaena spp.</i>	Neurotoxina	(Sivonen, 2009)
Estados Unidos, Rio Elk, Kanawha, e Ohio	Entre 1930 a 1931	Peixes	Indeterminado	<i>Anabaena flos-aquae</i> identificada na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Estados Unidos, Iowa, Storm Lake	1948	Peixes e cães	Indeterminado	<i>Anabaena flos-aquae</i> identificada na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Canadá, Manitoba, Lago Dauphin	1951	Cavalo e cães	Indeterminado	<i>Anabaena flos-aquae</i> identificada na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Canadá, lago Echo e lago Qu'Appelle	1959	Peixes, gansos e cães	Muitos animais, indeterminado	<i>Anabaena circinalis</i> , identificada em fezes de animais	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Estados Unidos, Montana, Hegman Reservoir	1977	Bovinos e cães	Muitos animais, indeterminado	<i>Anabaena spp.</i> e <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , Identificadas na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Noruega, Roagland	1978	Novilhas	4 Animais	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcistinas	(Sivonen, 2009)
Estados Unidos, lagos da Pensilvânia	1979	Cães	Indeterminado	<i>Anabaena spp.</i> , Identificada na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Estados Unidos, lago em Montana	1984	Bovinos	Indeterminado	<i>Bloom</i> inespecífico, identificado na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Canadá, lago Steele em Alberta	1985	Morcegos patos e pombos	>1000 Animais	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Anatoxina-a	(Sivonen, 2009)
Canadá, Alberta	1986	Bovinos	16 Animais	<i>Anabaena flos-aquae</i> e <i>Oscillatoria</i>	Anatoxina-a	(Sivonen, 2009)
Portugal, rio Guadiana	1987	Peixes	Indeterminado	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>bloom</i> identificado na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Inglaterra, Leicestershir	1989	Ovinos e cães	34 Animais	<i>Microcystis aeruginosa</i> ,	Microcistina-LR	(Sivonen, 2009) (Hilborn

e lago Rutland				identificada na água		& Beasley, 2015)
Austrália, rio Darling	1990	Bovinos e Ovinos	>2000 Animais	<i>Anabaena circinalis</i>	Saxitoxina	(Sivonen, 2009)
África do Sul, lago Zeekoevlei	1994	Animais de produção e cães	Indeterminado	Nodularia spumigena e Microcystis aeruginosa identificadas na água	Nodularina e Microcistina-LR	(Hilborn & Beasley, 2015)
Bangladesh, lagoa em Mymensingh	2002	Caprinos e peixes	Indeterminado	<i>Anabaena flos-aquae</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i> identificada na água	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Holanda, Rio Meuse	2003	Aves e peixes	Indeterminado	<i>Bloom</i> inespecífico	Desconhecida	(Hilborn & Beasley, 2015)
Estados Unidos, lago Buccaneer Bay	2004	Cães, animais de produção e silváticos	Indeterminado	<i>Anabaena spp.</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Microcistina-LR e Microcistina	(Hilborn & Beasley, 2015)
Nova Zelândia, Norte da ilha	2005	Cães	5 Animais	<i>Bloom</i> bentónico inespecífico, identificado na água	Anatoxina-a	(Sivonen, 2009)
Argélia, lago Oubeira	2005	Tartarugas	Indeterminado	<i>Microcystis spp.</i>	Microcistina identificada no fígado	(Sivonen, 2009)
Estados Unidos, lagos em Ohio	2010	Cães, peixes e Aves	Indeterminado	<i>Anabaena spp.</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon spp.</i> , <i>Planktolyngbya limnetica</i>	Microcistina, Anatoxina-a, Cylindrospermopsina, Saxitoxina	(Hilborn & Beasley, 2015)
Portugal, Ribeira de Oeiras, Almodôvar (Sul)	2017	Bovinos de carne	25 Animais	<i>Microcystis spp.</i> , identificada na água	Microcistina-LR identificada no rim.	(Menezes et al., 2019)
Botsuana, Delta do Okavango, África	2020	Elefantes	>300 Animais	Cianobactérias identificadas na água Espécie ainda não descrita.	Neurotoxinas	(BBC News, 2020).

Na Figura 15, estão compiladas diversas fotografias de um surto de mortalidade de elefantes no Delta do Okavango em 2020, devido à ocorrência de cianobactérias e que dizimou mais de 300 animais.



Figura 15. Fotografias de vários elefantes mortos no delta do Okavango em 2020 (BBC News, 2020).

Em Portugal, o primeiro surto publicado na literatura de intoxicação animal por microcistina-LR, foi em agosto de 2017, em Almodôvar, quando um efetivo de cinquenta e três bovinos da raça *Aberdeen-Angus X Charolais*, rebentou uma cerca elétrica e teve acesso à água estagnada da Ribeira de Oeiras. Vinte e cinco, dos 53 animais morreram. Nas amostras de água, recolhidas no local, foram identificadas várias espécies de cianobactérias, pertencentes predominantemente ao género *Microcystis*, o diagnóstico foi confirmado pela deteção de Microcistina-LR no rim de um animal (Menezes *et al.*, 2019). O surto encontra-se resumido na tabela 8 e figuras 16 e 17.

Tabela 8. Resumo do caso de intoxicação por cianobactérias, ocorrido na ribeira de Oeiras, Portugal. (Adaptado de Menezes *et al.*, 2019).

DESCRIÇÃO DO CASO	
Sinais clínicos	Ataxia, distensão abdominal, hipersialia, movimentos mastigatórios, sinais de pedalagem (com escavação do solo), opistótono (hiperextensão da cabeça e pescoço – estado de distensão e espasticidade), enoftalmia (afundamento do globo ocular, sinal de desidratação), diarreia sanguinolenta e melena, espuma na cavidade oral e nasal, hemorragia na cavidade oral, mucosa ocular violácea.
Ambiente	Água estagnada da ribeira de Oeiras, <i>bloom</i> fitoplanctónico superficial. A ribeira de Oeiras é um afluente do rio Guadiana, situada no Sul de Portugal, numa região caracterizada por altas temperaturas, elevada incidência de luz solar e longos períodos de seca. Água eutrofizada (fósforo e azoto).
Exame clínico e anatomopatológico	Suspeita de hepatotoxicidade: Necrose hepática multifocal e necrose renal tubular difusa.
Diagnóstico diferencial	<ul style="list-style-type: none"> · Intoxicação exógena por organofosforados e carbamatos (pesticidas inibidores da acetilcolinesterase) · Intoxicação crónica por cobre ou Nitritos/Nitratos · Intoxicação por Cloreto de Sódio (NaCl) · Clostridioses (<i>Clostridium perfringens</i> tipo D, <i>Clostridium botulinum</i> e <i>Clostridium tetani</i>) · Intoxicação por plantas neurotóxicas
Amostras para análise	Água, rim e fígado
Cianobactéria	Género <i>Microcystis</i> spp.
Cianotoxina	Microcistina - LR
Deteção de cianotoxinas	<ul style="list-style-type: none"> · 0,16 µg/L de microcistina na água analisada (ELISA) · 0,13 µg de microcistina-LR/g no rim
Diagnóstico definitivo	Intoxicação por cianobactérias produtoras de cianotoxinas



Figura 16. Compilação de fotografias dos bovinos intoxicados por cianobactérias na ribeira de Oeiras, em Almodôvar, Portugal (Menezes *et al.*, 2019).



Figura 17. Ribeira de Oeiras no dia do surto (Menezes *et al.*, 2019).

1.9 Identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas

Segundo (Churro *et al.*, 2013) mais de metade da população portuguesa consome água potável proveniente de reservatórios superficiais e, de acordo com o Instituto Nacional da Água (INAG), 42% das albufeiras portuguesas estão eutrofizadas. Compreender os impactos provocados pelos *CyanoHABs* e o risco de exposição às suas toxinas, é fundamental para uma gestão eficaz dos recursos hídricos (Wood, 2016) e a elaboração de programas de monitorização constitui uma ferramenta crucial (Meriluoto *et al.*, 2017).

A monitorização de albufeiras portuguesas para deteção precoce de desenvolvimentos de cianobactérias, inclui a observação visual das massas de água, protocolos específicos de amostragem e análises laboratoriais (Meriluoto *et al.*, 2017).

A análise laboratorial de cianobactérias é efetuada através da análise microscópica de amostras de água usando o método de Utermöhl (Karlson *et al.*, 2010). As cianobactérias são identificadas com base em características morfológicas de cada espécie, recorrendo a chaves de identificação taxonómica e literatura especializada. Posteriormente, pode ser útil quantificar as cianotoxinas existentes, recorrendo a métodos de deteção e quantificação específicos como ELISA, ou ensaios de ligação ao recetor-RBA. Através destes procedimentos, é reconhecida a ligação de anticorpos ou recetores específicos que permitem de uma forma rápida e sensível quantificar as cianotoxinas presentes na amostra (Churro & Valério, 2015).

1.10 Objetivos

A presente dissertação pretende, contribuir para o conhecimento do problema associado às cianobactérias em Medicina Veterinária e fornecer avisos de importância vital e riscos associados às suas toxinas em animais. Para tal, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação da qualidade da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico, relativamente à presença de cianobactérias e toxinas associadas, identificando possíveis pontos de risco para a saúde animal.
- Estudo da comunidade fitoplanctónica das lagoas de um Parque Ambiental e verificação da presença de cianotoxinas associadas aos casos de mortalidade em aves.
- Construção de um guia prático em caso de suspeita de cianobactérias, com procedimentos orientadores de laboratório, que possam ser divulgados pelos profissionais de saúde animal em caso de risco potencial de *blooms* de cianobactérias.

2. Material e Métodos

2.1 Análise fitoplantónica da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico

2.1.1 Caracterização da região estudada: Enquadramento geográfico

As massas de água cuja análise fitoplantónica foi realizada neste trabalho localizam-se na Ilha do Pico, Açores, Portugal.

O arquipélago dos Açores é composto por nove ilhas vulcânicas, divididas em três grupos: Grupo Ocidental, que inclui as ilhas das Flores e Corvo, Grupo Central, composto pelas ilhas Terceira, Graciosa, São Jorge, Pico e Faial, e Grupo Oriental, que inclui as ilhas de Santa Maria e São Miguel. Estão localizadas no Oceano Atlântico Norte (figura 18) (Luz *et al.*, 2020). Apesar da sua proximidade geográfica, as ilhas apresentam uma identidade muito própria, com características distintas, tais como o seu ambiente geológico e a sua idade. São particularmente ricas em ecossistemas aquáticos, que vão desde água doce, salobra, marinha e proveniente de fontes hidrotermais (Luz *et al.*, 2020).



Figura 18. Enquadramento geográfico do arquipélago dos Açores e da ilha do Pico. (Adaptado de PGRH-Açores, 2016).

A ilha do Pico é a ilha mais recente e a segunda maior ilha do arquipélago. Com 444,9 km² de área, 46,2 Km de comprimento e 15,8 km de largura, possui um vulcão na sua metade ocidental. Este apresenta 2351m de altitude, sendo a montanha mais alta de Portugal. A ilha do Pico está organizada em três concelhos: Madalena do Pico, que é a vila mais populosa, Lages do Pico, e São Roque do Pico. Segundo dados de 2011, a população residente na ilha era de 14148 habitantes, repartidos desigualmente pelos três concelhos (PGRH-Açores, 2016).

O clima da ilha do Pico é classificado como temperado marítimo, embora exista uma diferenciação climática em altitude. A pluviosidade é regular durante todo o ano, com precipitação média de 1.000 mm/ano, a temperatura média anual é superior a 17°C e a humidade relativa do ar atinge praticamente os 80% (Direção Regional da Cultura, 2015).

Segundo o Plano de Gestão da Região Hidrográfica do Açores (PGRH-Açores) (2016), a ilha do Pico apresenta um efetivo pecuário (bovinos, suínos, ovinos e caprinos) de cerca de 29.500 animais. Devido às alterações climáticas e ao aumento das pressões antropogénicas provocadas maioritariamente pelas explorações agropecuárias locais, vários corpos de água açorianos começaram a revelar sinais de eutrofização (Luz *et al.*, 2020). Segundo Gonçalves *et al.*, (2006) a ilha do Pico possui uma grande quantidade de corpos de água de dimensões variáveis, desde pequenos charcos a lagoas ao longo de toda a ilha, com distribuição heterogénea que desempenham um papel fundamental na dinâmica hidrológica da ilha (CYMBRON *et al.*, 2008).

2.1.2 Metodologia

· Métodos de colheita

Com o objetivo de avaliar a qualidade ecológica da água de abeberamento dos bovinos da ilha do Pico, foram recolhidas seis amostras de água para análise de fitoplâncton das principais lagoas da ilha (lagoas Seca, Capitão, Caiado, Peixinho, Rosada e Paul) e onze amostras em explorações agropecuárias distribuídas ao longo de toda a ilha (figuras 19 e 20). As recolhas foram feitas durante o estágio curricular, entre setembro e dezembro de 2019. Os locais foram escolhidos de acordo com o seu potencial risco eutrófico, tempo de retenção da água e pela probabilidade de risco para a saúde dos animais. Os pontos de abeberamento dos animais das explorações pecuárias, são águas estagnadas em tanques retangulares, com

alta exposição solar, que são renovados pela água da chuva ou abastecidos muitas vezes pelas águas das lagoas.

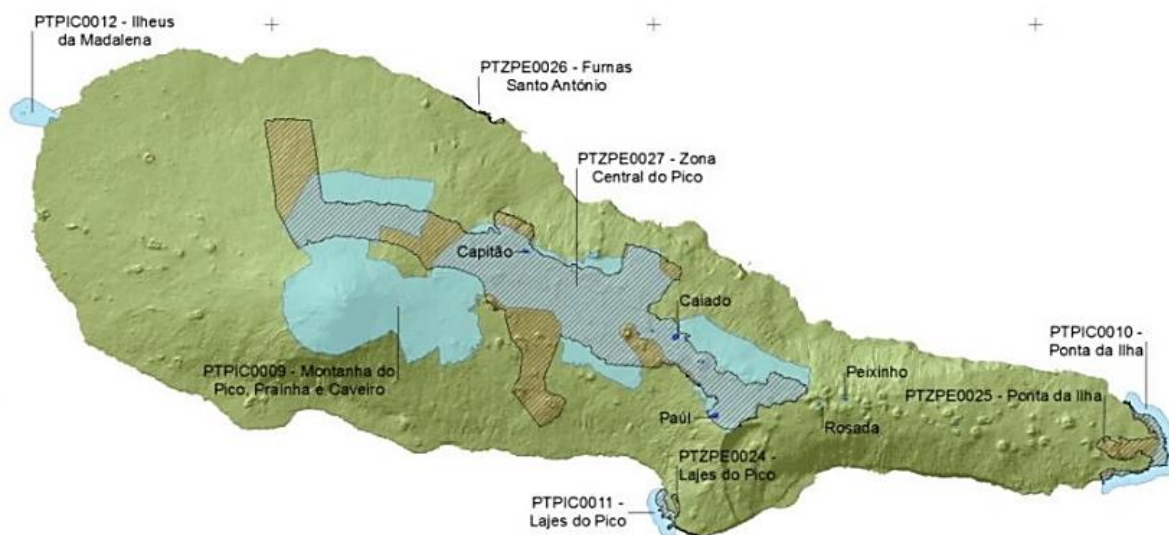


Figura 19. Modelo digital do terreno da ilha do Pico, com indicação das principais lagoas da Ilha. (Adaptado de PGRH-Açores, 2016).

Descrição das amostras

Para a análise qualitativa do fitoplâncton, foram colhidas amostras pontuais nas margens das lagoas ou nos tanques de abeberamento, em garrafas de plástico de 1,5L (figura 21), uma vez que não foi possível realizar a colheita com a garrafa do tipo Van Dorn. Em cada local, foram colhidas amostras pontuais, através da mistura de várias amostras superficiais. A temperatura superficial da água foi determinada no local utilizando o termómetro clínico. A data e hora da recolha, o aspeto da água e o estado do tempo, foram também registados. A transparência da água foi analisada segundo parâmetros qualitativos (transparente, opaco e muito opaco) observáveis no local de colheita, de acordo com os procedimentos definidos pelo Instituto Nacional da Água (INAG, 2009). As amostras foram transportadas até ao laboratório do Serviço de Desenvolvimento Agrário do Pico (SDAP), em caixas térmicas de esferovite, com termoacumuladores para manutenção da temperatura ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo da luz. A recolha de amostras de fitoplâncton seguiu as normas de segurança previstas, luvas descartáveis, calçado e vestuário adequado.



Figura 20. Lagoa Seca (esquerda), lagoa do Capitão (direita). Fotografias originais da autora.



Figura 21. Tanque de abeberamento de bovinos numa exploração agropecuária na ilha do Pico (esquerda). Amostra de água para determinação de fitoplâncton (direita). Fotografias originais da autora.

Preservação, identificação e armazenamento das amostras

As amostras destinadas à identificação fitoplantónica foram armazenadas no frigorífico e processadas num período não superior a 48h. As amostras utilizadas para o estudo qualitativo do fitoplâncton, foram posteriormente armazenadas em frascos transparentes e fixadas (conservadas) com a adição de solução de Lugol ácido, até adquirir em uma coloração amarelada. O volume de solução de lugol não foi sempre o mesmo para todas as amostras porque este varia de acordo com a quantidade de matéria orgânica existente (INAG, 2009).

Identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por microscopia

A análise microscópica de uma amostra de um *bloom* fitoplanctónico é muito útil, independentemente de não se realizar a contagem de cianobactérias. A informação obtida relativamente às espécies de cianobactérias detetadas, pode fornecer um alerta imediato da presença de cianotoxinas (Chorus & Bartram, 1999).

A análise qualitativa do fitoplâncton foi realizada no laboratório do SDAP pela autora, a partir do material fixado e, sempre que possível, vivo. O exame da amostra fresca (não fixada) é importante devido às alterações morfológicas, a que alguns organismos estão sujeitos após a fixação, nomeadamente a imobilização da sua estrutura celular e alteração de coloração dos seus pigmentos.

A identificação taxonómica das cianobactérias, foi efetuada através da observação, ao microscópio ótico composto, da amostra preparada entre lâmina e lamela, tendo por base características morfológicas como a forma, tipo, dimensão e posicionamento das colónias, presença ou ausência de células especializadas e presença ou ausência de baínha de mucilagem, de acordo com Komarek e Anagnostidis (1998) e Komarek e Anagnostidis (2005). As cianobactérias foram identificadas ao nível do género.

2.2 Estudo de caso de intoxicações por cianobactérias em aves no Norte de Portugal

2.2.1 Caracterização da região estudada: Enquadramento geográfico

Este estudo descreve a ocorrência de um surto de intoxicação por cianobactérias em aves, ocorrido num Parque Ambiental (PA), na região litoral Norte de Portugal. O PA resulta da renovação de uma antiga Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), que tinha como objetivo, o tratamento de águas domésticas e industriais do norte do concelho de Ovar. O parque é constituído por seis lagoas sobre um pinhal, inserido numa área de 24 ha de floresta protegida (figura 22). Por questões de confidencialidade, o nome do parque e a localização exata são omitidos.



Figura 22. Principais lagoas que compõem o parque ambiental. Fotografias originais da autora, tiradas no dia 15 de julho de 2020, na região litoral Norte de Portugal Continental.

2.2.2 Descrição do surto

As primeiras ocorrências de mortalidade em aves aquáticas, predominantemente patos silvestres, registaram-se em agosto de 2018. Desde então, e até ao presente, foram descritas mais de 100 mortes. As últimas ocorrências registaram-se a 16 de junho de 2020, na sequência da observação de um *bloom*. Na sequência deste evento foram colhidas amostras de água e realizadas necropsias às aves, como se descreve a seguir.

2.2.3 Metodologia

O diagnóstico de intoxicação por cianobactérias baseou-se em:

- 1) Análise microbiológica da água das várias lagoas que compõem o PA;
- 2) Exame clínico e anatomopatológico das aves;
- 3) Identificação da presença de cianotoxinas na água;
- 4) Confirmação da presença de microcistinas no fígado das aves.

· Métodos de colheita

Com o objetivo de avaliar a qualidade da água de um parque ambiental na região litoral Norte de Portugal Continental, foram recolhidas amostras de fitoplâncton das principais lagoas que a compõem, no dia 15 de julho de 2020 (figura 23).



Figura 23. Recolha de amostras de água nas principais lagoas que compõem o parque ambiental. Fotografias originais da autora.

· Procedimentos laboratoriais

Para a análise qualitativa do fitoplâncton, foram colhidas amostras pontuais nas margens das lagoas do parque ambiental, em garrafas de plástico de 1,5L (figura 24), uma vez que não foi possível realizar a colheita com a garrafa do tipo Van Dorn. A temperatura superficial da água foi determinada no local utilizando o termómetro clínico. A data e hora da recolha, o aspeto da água e o estado do tempo, foram também registados. A transparência da água foi analisada segundo parâmetros qualitativos (transparente, opaco e muito opaco) observáveis no local de colheita, segundo os procedimentos definidos pelo (INAG, 2009). As amostras foram transportadas até ao laboratório de Saúde Ambiental do INSA, em caixas térmicas de esferovite, com termoacumuladores para manutenção da temperatura ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo da luz.



Figura 24. Recolha de amostras pontuais com uma garrafa de plástico de 1,5L nas margens das lagoas da região em estudo. Fotografias originais da autora.

Preservação, identificação e armazenamento das amostras

As amostras destinadas à identificação fitoplanctónica foram armazenadas no frigorífico, no seu frasco original, e processadas num período inferior a 48h. As sub-amostras utilizadas para a quantificação do fitoplâncton, foram conservadas com a adição de um fixador - solução de Lugol ácido - até adquirir em uma coloração amarelada, na proporção de 10 gotas para cada 100ml (figura 25). As sub-amostras utilizadas para a quantificação de cianotoxinas através de um ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês, “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”), foram preparadas em triplicado e identificadas, sendo armazenadas no congelador, à temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, segundo os procedimentos definidos pelo (INAG, 2009) (figura 25).

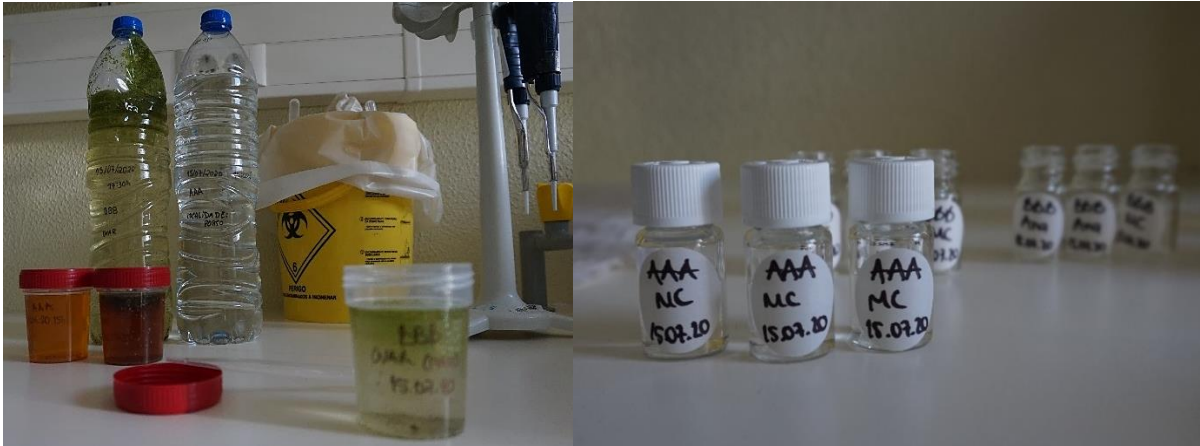


Figura 25. Receção e preparação das amostras no laboratório do INSA. Amostras frescas e fixadas para observação microscópica (esquerda) e amostras frescas para quantificação de cianotoxinas por ELISA (direita). Fotografias originais da autora.

Identificação e quantificação do fitoplâncton

A maioria das cianobactérias, devido às suas características morfológicas, são facilmente distinguidas de outros organismos fitoplanctónicos ao microscópio (Chorus & Bartram, 1999). A análise de fitoplâncton consiste na identificação e quantificação dos organismos presentes num volume conhecido de amostra, usando câmaras de sedimentação (INAG, 2009).

As amostras foram analisadas pelo Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Departamento de Saúde Ambiental - Unidade de Água e Solo do INSA. A identificação taxonómica das cianobactérias, foi efetuada recorrendo a um microscópio ótico invertido (Olympus CK-40), tendo por base as características morfológicas como a forma, tipo, dimensão e posicionamento das colónias, presença ou ausência de células especializadas e presença ou ausência de bainha de mucilagem, de acordo com Komarek e Anagnostidis (1998) e Komarek e Anagnostidis (2005). As cianobactérias presentes nas amostras foram identificadas ao nível da espécie.

Deteção e quantificação de microcistinas totais por ELISA

Este procedimento foi realizado no INSA, pela autora, no laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Departamento de Saúde Ambiental. A amostra de água para deteção e quantificação de microcistinas foi analisada através da técnica de ELISA competitiva indireta. A amostra foi previamente descongelada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e sonicada, de forma a provocar lise celular. A quantificação da toxina foi realizada com recurso ao kit Microcystins-ADDA ELISA (Abraxis®). A metodologia seguiu as recomendações do fabricante.

O método imunoenzimático utilizado, permite a deteção e quantificação de microcistinas, através de anticorpos monoclonais específicos que se ligam às microcistinas presentes na amostra, sendo o resultado visualizado após uma reação colorimétrica na qual se origina um cromóforo de cor azul. A intensidade da coloração é inversamente proporcional à concentração de microcistinas presentes na amostra. A leitura espectrofotométrica das amostras foi realizada num leitor de placas de ELISA. Os resultados são introduzidos no relatório final expressos em $\mu\text{g} / \text{L}$ com duas casas decimais e o limite de quantificação é de $0,15 \mu\text{g} / \text{L}$.

Exame clínico e anatomopatológico das aves

O exame clínico e anatomopatológico das aves foi realizado no dia 15 de julho de 2020 no Departamento de Patologia e Histopatologia do INIAV (polo do Vairão). Foram realizadas oito necropsias, mas apenas quatro estavam em condições de ser analisadas, encontrando-se as restantes em decomposição cadavérica, o que impossibilitou a extração de material hepático e renal para posterior análise de cianotoxinas nos tecidos (figura 26). O exame anatomopatológico das aves revelou um quadro congestivo-hemorrágico na cavidade abdominal (fígado e rins muito congestivos e hemorrágicos), hemorragia pulmonar, hepatomegalia, edema da bolsa de Fabricius (figura 27). Os relatórios das necropsias encontram-se nos anexos A, B e C.



Figura 26. Análise anatomopatológica das aves com suspeita de intoxicação por cianobactérias. Fotografias originais da autora.



Figura 27. Biomassa fitoplanctónica na cavidade oral e plumagem das aves do PA. Fotografias originais da autora

Análise de cianotoxinas nos tecidos hepático e renal das aves

Para deteção e quantificação de microcistinas, foram analisados, por imunoensaios, amostras de tecido hepático e renal de quatro aves, que foram enviadas para o laboratório de Investigação Biológica NOSTOC®.

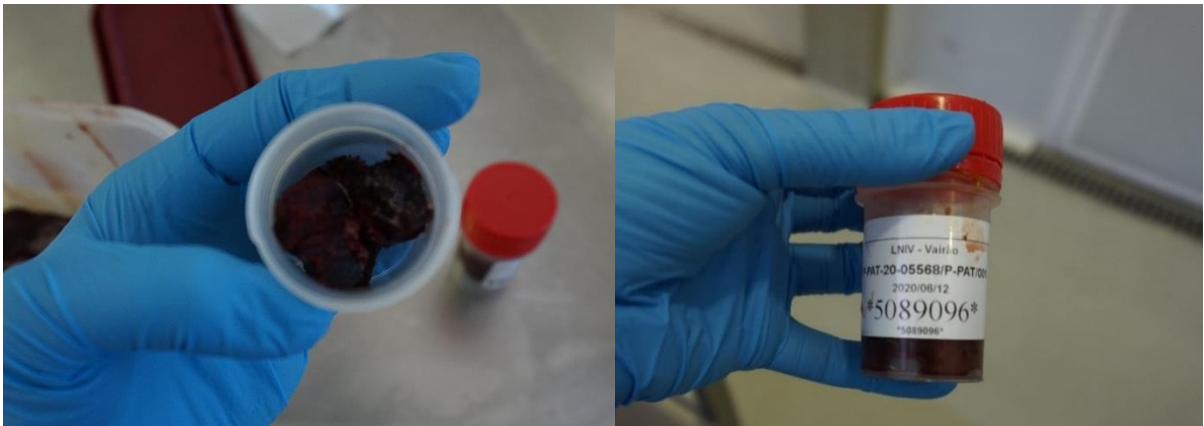


Figura 28. Amostras de tecido hepático e renal para deteção de microcistinas. Fotografias originais da autora

3. Resultados

3.1 Resultados da análise fitoplantónica da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos através da análise microscópica das amostras recolhidas nas 6 lagoas principais e 11 locais de abeberamento de bovinos em estudo. Os resultados são agrupados e apresentados em forma de tabela (tabela 9). Por questões de confidencialidade, apenas as lagoas (amostras 1 a 6) apresentam coordenadas geográficas, as restantes amostras (A a K) estão localizadas por zonas/freguesias.

A grande maioria das amostras foi recolhida durante os meses de outubro e novembro. Segundo dados do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), no que respeita à pluviosidade, os valores registados de precipitação acumulada no mês de outubro, foram de 154,7mm e de 41,3mm no mês de novembro. A temperatura média mensal do ar registada no mês de outubro foi de 19,6°C, tendo sido registado a temperatura diária mais alta no dia 1, com 27,8°C, e 17,8°C no mês de novembro, com um máximo diário de 22,4°C registado também no dia 1. É de assinalar a passagem do furacão Lorenzo durante o mês de outubro, que afetou todo o arquipélago, com fortes rajadas de vento.

Tabela 9. Resultados da análise microscópica das amostras recolhidas na ilha do Pico durante o estágio curricular.

Amostra	Locais de amostragem Ilha do Pico	Coordenadas GPS	Data e hora da colheita	T° C Ar	T° C Água	Aspetto da água	Estado do tempo	Resultados
1	Lagoa Seca	38°27'21.4"N 28°14'45.2"W	Data: 06/10/19 Hora: 14:00h	24°	23°	Cor esverdeada opaca	Sol	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp
2	Lagoa do Caiado	38°29'15.0"N 28°19'06.7"W	Data: 06/10/19 Hora: 14:50h	24°	24°	Cor verde-azul, bloom superficial	Sol	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp
3	Lagoa do Capitão	38°27'24.4"N 28°15'00.8"W	Data: 13/10/19 Hora: 15:10h	21°	20°	Cor verde opaco, presença de pastoreio de animais	Nuvens dispersas	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp

4	Lagoa do Peixinho	38°26'05.1"N 28°10'24.3"W	Data: 10/11/19 Hora: 11:10h	22°	20°	Cor verde, com caudal reduzido	Nuvens dispersas	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp
5	Lagoa da Rosada	38°25'57.8"N 28°11'09.3"W	Data: 10/11/19 Hora: 12:00h	22°	21°	Cor verde, com caudal reduzido	Nuvens	Inconclusivo
6	Lagoa do Paul	38°25'40.3"N 28°13'54.6"W	Data: 10/11/19 Hora: 12:30h	22°	21°	Cor verde, com caudal reduzido	Nuvens	Inconclusivo
A	Prainha	-	Data: 23/09/19 Hora: 10:05h	25°	23°	Cor verde, opaco	Sol	Presença de Clorófitas
B	Monte	-	Data: 24/09/19 Hora: 16:40h	25°	24°	Cor verde azul com <i>bloom</i> superficial	Sol	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp
C	São Mateus	-	Data: 02/10/19 Hora: 11:43h	23°	21°	Cor verde, presença de fitoplâncton superficial	Nuvens dispersas	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp
D	Ribeirinha	-	Data: 16/10/19 Hora: 10:00h	23°	21°	Água transparente	Nuvens	Presença de Clorófitas
E	Paul da Ribeirinha - Água pública	-	Data: 16/10/19 Hora: 10:20h	23°	21°	Água transparente	Nuvens	Ausência de fitoplâncton
F	Santo Amaro	-	Data: 16/10/19 Hora: 10:40h	23°	22°	Água transparente	Nuvens	Inconclusivo
G	Criação Velha	-	Data: 18/10/19 Hora: 09:20h	23°	22°	Cor verde	Sol	Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp
H	Criação Velha	-	Data: 18/10/19 Hora: 10:10h	23°	23°	Cor verde	Sol	Presença de Clorófitas
I	Arrife	-	Data: 23/10/19 Hora: 15:00h	22°	20°	Cor verde	Nuvens dispersas	Inconclusivo
J	Lages do Pico - Almagreira	-	Data: 23/10/19 Hora: 16:10h	22°	21°	Cor verde azul	Sol	Inconclusivo
K	Madalena	-	Data: 05/11/19 Hora: 14:25h	19°	18°	Cor verde	Nuvens	Presença de Clorófitas e Suspeita de cianobactéria do género <i>Microcystis</i> sp

As amostras 1, 2, 3, 4, B, C, G, K parecem conter cianobactérias do género *Microcystis* (figura 29).



Figura 29. Identificação presumível de colónia de *Microcystis* sp. (viva). Microscópio ótico 400x (esquerda), Amostra B fresca (direita). Fotografias originais da autora

3.2 Resultados do estudo de caso de intoxicações por cianobactérias em aves no Norte de Portugal

As amostras superficiais às águas das lagoas, foram colhidas no dia 15 de julho de 2020 às 17:30h. A temperatura do ar registada foi de aproximadamente 24,5°C (sol e ausência de nuvens), e a temperatura da água variou entre os 23,5 e os 24°C. As lagoas apresentavam uma coloração azul-esverdeada, com presença de *blooms* fitoplanctónicos em todas as lagoas do parque. É de referir a existência de uma grande acumulação de biomassa de ervilha-de-água e cianobactérias nas margens das lagoas (ver figuras 23 e 24).

Resultados da análise do fitoplâncton nas amostras de água

A observação microscópica das amostras de água revelou a presença de uma comunidade fitoplanctónica diversa, com predomínio da presença de clorófitas. No entanto, verificou-se a presença de elevadas densidades de cianobactérias pertencentes às espécies *Pseudanabaena limnetica*, *Planktolyngbya limnetica*, *Anabaenopsis circularis* (figura 30 e 32), *Limnothrix redekei*, *Merismopedia tenuissima* (ordem decrescente de densidade celular) (tabela 10). Todas as espécies encontradas estão descritas como produtoras de microcistinas.

Tabela 10. Resultados da análise do fitoplâncton na amostra de água do parque ambiental.

Código WISER REBECCA	Organismos fitoplanctónicos	Densidade (células/mL)
CYANOBACTERIAS		
R1553	<i>Anabaenopsis circularis</i>	3353
R1582	<i>Limnothrix redekei</i>	2459
R1479	<i>Merismopedia tenuissima</i>	1789
R1610	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	6707
R1621	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	8048
EUGLENÓFITAS		
R1776	<i>Trachelomonas volvocina</i>	671
DIATOMÁCEAS		
R0385	<i>Nitzschia perminuta</i>	1341
CLORÓFITAS		
R0993	<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>	2012
R0488	<i>Ankyra ancora</i>	447
R0697	<i>Oocystis lacustris</i>	894
-	<i>Acutodesmus obliquus</i>	894
R0480	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	2012
R0523	<i>Coelastrum astroideum</i>	6707
R0799	<i>Desmodesmus opoliensis</i>	1789
R0665	<i>Monoraphidium contortum</i>	1789
R0670	<i>Monoraphidium griffithii</i>	447
R0675	<i>Monoraphidium minutum</i>	894
R0683	<i>Monoraphidium tortile</i>	4918
R2442	<i>Scenedesmus arcuatus</i>	894
R0782	<i>Scenedesmus ellipticus</i>	894
R0806	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	15426
R0848	<i>Tetraëdron minimum</i>	447
R0858	<i>Tetraëdron triangulare</i>	2236
R0552	<i>Willea apiculata</i>	3577
CRIOFITAS		
R1368	<i>Komma caudata</i>	1118
R2557	<i>Plagioselmis lacustris</i>	894
R2162	<i>Plagioselmis nannoplanctica</i>	447
HAPTÓFITAS		
R1818	<i>Chrysochromulina parva</i>	2906
TOTAIS		76013

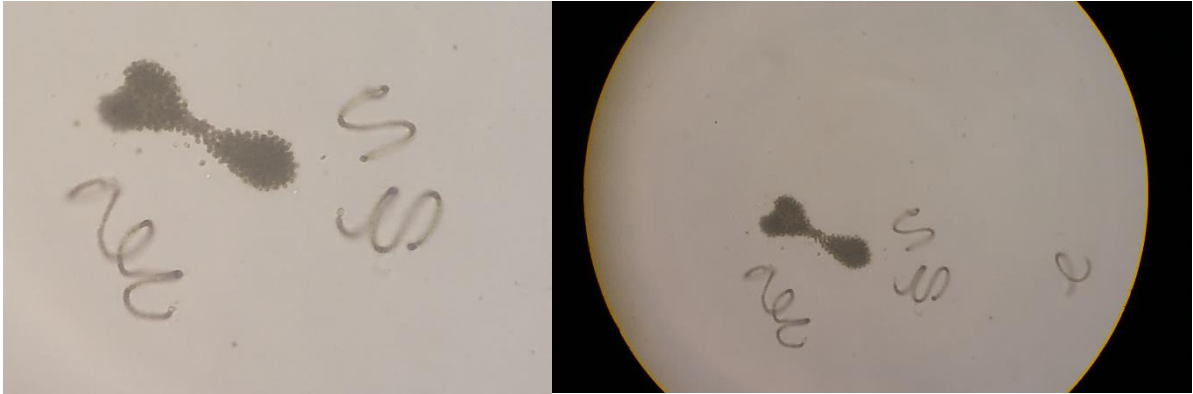


Figura 30. Observação microscópica de colónias de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaenopsis circularis* (ampliação 400X) nas amostras de água das lagoas do PA. Fotografias originais da autora.

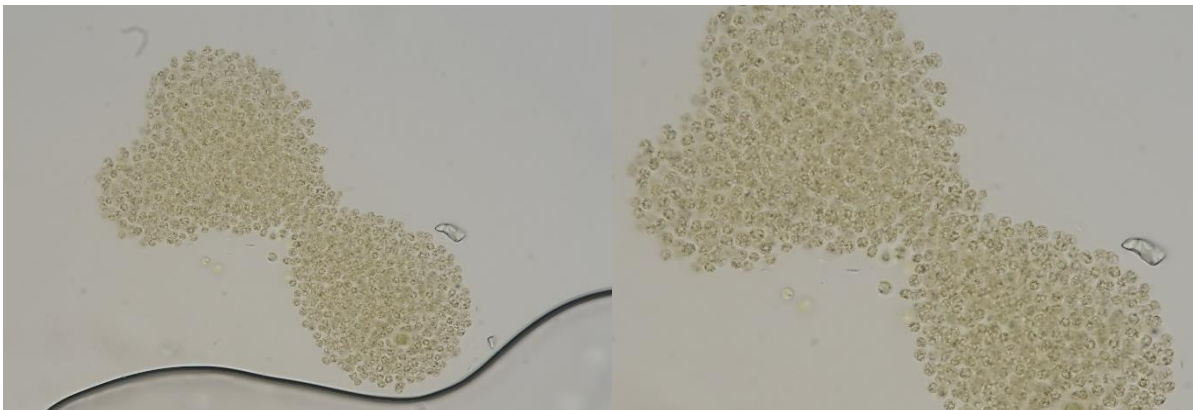


Figura 31. Observação microscópica de colónias de *Microcystis aeruginosa* (ampliação 400X) nas amostras de água das lagoas do PA. Fotografias originais da autora.



Figura 32. Observação microscópica de colónias de *Anabaenopsis circularis* (ampliação 400X) nas amostras de água das lagoas do PA. Fotografia original da autora.

Resultados da deteção e quantificação de microcistinas totais por ELISA

A análise da amostra de água colhida no PA revelou a presença de microcistinas totais na concentração de 0,92 µg/L.

Relatórios da análise de cianotoxinas aos tecidos hepático e renal das aves

O relatório de ensaio de quantificação de microcistinas pelo método de ELISA, emitido pelo laboratório de investigação biológica NOSTOC® encontra-se nos anexos D, E, F e G.

Na tabela 11 encontram-se os resultados obtidos das amostras de tecidos das aves do parque ambiental.

Tabela 11. Concentração de microcistinas em µg/g peso fresco nas amostras de tecidos das aves do parque ambiental.

AMOSTRAS	Concentração de microcistinas (µg/g peso fresco)
P-PAT-20-06694 <u>Fígado</u>	0,63
P-PAT-20-05568/001 <u>Fígado</u>	>5,0
P-PAT-20-05568/002 <u>Fígado</u>	2,43
P-PAT-20-0556 <u>Fígado</u>	0,75

3.3 Guia prático de receção e preparação das amostras de água no laboratório em caso de suspeita de cianobactérias

O presente guia foi elaborado para auxiliar os profissionais de saúde animal em casos de suspeita de intoxicação por cianobactérias. Pretende-se estabelecer orientações práticas, no sentido de uniformizar os procedimentos laboratoriais de análise da qualidade da água de abeberamento dos animais de pecuária. Os procedimentos de colheita de amostras para análise de cianobactérias e cianotoxinas podem ser consultados em (INAG, 2009).

Neste guia são referidas orientações, decisões e procedimentos laboratoriais de forma a facilitar a preparação de amostras para confirmação da presença de cianobactérias e/ou cianotoxinas.

Caso o profissional de saúde animal não tenha experiência na identificação de cianobactérias (ou não tenha o equipamento disponível), sugere-se que atue como se a amostra contenha cianobactérias.

A elaboração do presente guia prático teve por base o conhecimento técnico-científico obtido durante o estágio no INSA e os protocolos experimentais usados durante o estágio.

Este guia foi seguido na presente dissertação, nos casos práticos dos Açores e PA.

Agradecimentos:

Este trabalho foi realizado em estreita colaboração com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, com a colaboração, auxílio, carinho e dedicação da Dr^a Carina Menezes e em parceria com a minha amiga e colega Mariana Casaca.

Guia prático de receção e preparação das amostras de água no laboratório em caso de suspeita da presença de cianobactérias

Procedimentos orientadores de laboratório

LISTA DE MATERIAL UTILIZADO E REAGENTES:

Material utilizado:

1. Material de vidro

- Lâminas de poços
- Lâminas
- Lamelas

2. Equipamento

- Microscópio ótico
- Microscópio ótico invertido
- Câmara frigorífica
- Arca congeladora
- Micropipetas

3. Descartáveis e outros:

- Frascos de vidro ou de plástico inerte ao lugol (min. 250 mL), para colheita de amostras
- Tubos de plástico para amostras ELISA (min. 50 mL)
- Lâminas
- Lamelas
- Pipetas de Pasteur
- Luvas
- Papel absorvente
- Etiquetas

Reagentes:

- Solução de lugol (ácida ou básica)
- Água bidestilada

Guia prático de receção e preparação das amostras de água no laboratório em caso de suspeita de cianobactérias
 Procedimentos orientadores de laboratório

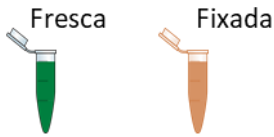


Amostra refrigerada, identificada com:

- Data
- Local
- Hora da colheita

1º PASSO: Preparação de sub-amostras

Homogeneizar a amostra por inversão rolando suavemente o frasco cerca de 8 vezes na vertical de forma a não criar bolhas de ar.



Pipetar 1-2 ml da amostra para dois microtubos. Adicionar 1 gota de lugol (fixador) à amostra fixada.

Amostra fresca: Retirar com uma micropipeta parte do sobrenadante e colocar numa lâmina de poços e/ou lâmina e lamela.

Amostra fixada: Retirar com uma micropipeta o material depositado no fundo do microtubo e colocar numa lâmina de poços e/ou lâmina e lamela.

2º PASSO: Observação microscópica

Pergunta: Parece haver cianobactérias na amostra?

SIM

NÃO

3º PASSO: Preparação e conservação de amostras frescas para quantificação de cianotoxinas por ELISA

ATENÇÃO: Este passo só se realiza em caso de observação de cianobactérias e/ou suspeita de intoxicação por cianotoxinas

Homogeneizar a amostra por inversão
 Retirar 5ml da amostra original para três tubos (5ml para cada tubo) para cada tipo de cianotoxinas. **ATENÇÃO:** Não colocar lugol



Guardar as subamostras no congelador, à temperatura de $-20 \pm 2^\circ \text{C}$

Após congelação enviar a amostra para um laboratório de referência para quantificação de microcistinas totais por ELISA

4º PASSO: Conservação

Adicionar gotas de lugol (1 gota por cada 10 ml de amostra) e agitar suavemente para homogeneizar.

NOTA: Para amostras com elevada densidade fitoplanctónica poderá ser necessário adicionar mais lugol

As amostras preservadas com lugol deverão ser mantidas à temperatura de $1-5^\circ \text{C}$ e ao abrigo da luz.

Enviar a amostra para um laboratório de referência para identificação e quantificação de organismos fitoplanctónicos

4. Discussão

· Análise fitoplantónica da água de abeberamento dos bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico

Durante o presente estudo colheram-se 17 amostras de água, correspondendo a 17 locais diferentes, entre lagoas naturais e pontos de abeberamento de bovinos. Estas amostras foram recolhidas entre setembro e dezembro de 2019, com especial incidência nos meses de outubro e novembro.

A recolha de amostras de água é uma operação sensível, à qual deve ser dado o maior cuidado, uma vez que uma colheita pouco representativa pode condicionar os resultados analíticos e criar falsas interpretações. Na impossibilidade de adquirir todos os materiais de recolha de amostras, a colheita não foi realizada com uma garrafa de Van Dorn, a transparência da água não foi medida com o Disco de Secchi e não foram realizadas colheitas em profundidade, o que pode ter condicionado os resultados.

As lagoas, Peixinho, Rosada e Paul encontravam-se bastante vazias, face à sua cota. O nível de transparência (avaliado segundo parâmetros qualitativos observáveis no local) em quase todas as lagoas foi reduzido. Um estudo feito por CYMBRON e colaboradores (2008) refere que as lagoas do Caiado, Rosada e Paul, do ponto de vista físico-químico, são caracterizadas por baixas concentrações de nutrientes (oligotrofia).

As amostras 1, 2, 3, 4, B, C, G, K parecem conter cianobactérias do género *Microcystis* spp, sendo considerados possíveis pontos de risco. Nas amostras 2,3, B e G, a identificação fitoplanctónica foi bastante difícil, pois as amostras continham grandes quantidades de sedimento, tendo sido realizadas várias diluições para que se pudesse obter boas identificações.

Um microscópio de alta qualidade com contraste de fase é essencial para uma correta identificação do fitoplâncton, sendo uma ferramenta indispensável à sua análise qualitativa, porque muitas espécies fitoplanctónicas são parcialmente transparentes quando vistas sob campo claro. Os resultados foram obtidos através da observação microscópica em campo claro, que dificulta a observação de certas características morfológicas, especialmente no caso de um observador com pouca prática.

Por questões logísticas, apenas se conseguiu realizar a análise qualitativa do fitoplâncton, o que não permitiu a determinação e quantificação de cianotoxinas.

Segundo estudos realizados em 2009, as lagoas do Capitão, Caiado, Rosada e Peixinho já apresentavam sinais de eutrofização, com ocorrência de florescências de cianobactérias e detecção de microcistinas nas massas de água. As maiores concentrações de microcistinas totais foram registadas nas lagoas do Capitão e Peixinho, em todas as estações do ano (DROTRH/DSRH, 2010).

É importante referir que estas massas de água são utilizadas maioritariamente para uso agropecuário e algumas para consumo humano.

Neste estudo, verificou-se a presença de cianobactérias em algumas lagoas da Ilha e pontos de abeberamento. Estas águas estão a demonstrar sinais de contaminação, apresentando problemas na sua qualidade, na medida em foram identificadas cianobactérias. É, assim, necessária uma monitorização periódica aos corpos de água, com especial atenção nos meses mais quentes do ano, em que há um aumento da intensidade luminosa.

· Estudo de caso de intoxicações por cianobactérias em aves no Norte de Portugal

A análise do surto de mortes de aves no PA em estudo permitiu avaliar a possível relação entre a morte de animais e a intoxicação com cianotoxinas. As amostras foram colhidas em julho de 2020 tendo o surto ocorrido em junho do mesmo ano.

De facto, o PA tinha lagoas com características visuais da presença de microalgas. A análise para identificação e quantificação do fitoplâncton permitiu verificar a existência de uma comunidade variada, com predominância de clorófitas (tabela 10). Este grupo de fitoplâncton é um constituinte natural dos ecossistemas aquáticos e não apresenta risco para a Saúde Pública. A densidade de cianobactérias totais atingiu as 22.357 cél/mL, o que ultrapassa o valor guia para águas de uso recreativo (20.000 cél/mL) (Chorus & Bartram, 1999). Apesar destes lagos não serem utilizados com este fim, podemos ter uma ideia de que a densidade observada foi relativamente alta. De facto, todas as cianobactérias identificadas estão descritas como potencialmente tóxicas, com particular ênfase na espécie *Anabaenopsis circularis* e *Microcystis aeruginosa* (Chorus & Bartram, 1999).

Devido às condições da amostra, nomeadamente o facto de conter ervilha-de-água, uma planta aquática de pequenas dimensões, a preparação e observação da amostra para observação foi dificultada. Assim, a espécie *Microcystis aeruginosa* apenas foi identificada na

observação prévia da amostra e registo fotográfico. A toxicidade das espécies presentes foi confirmada através da deteção de microcistinas, numa concentração de 0,92ug/L, ligeiramente abaixo do valor-guia para as águas de consumo Humano (1ug/L) (AMBIENTE Decreto-Lei n.º 152/2017).

O exame anatomopatológico das aves revelou um quadro congestivo-hemorrágico na cavidade abdominal, sugestivo de intoxicação por cianotoxinas, sustentado com a observação de biomassa de cianobactérias na cavidade oral e plumagem das aves.

O diagnóstico de intoxicação por microcistinas nas aves do PA, foi confirmado pela deteção de microcistinas no fígado das aves, cujo valor médio foi de 2,20 µg/g peso fresco (n=4).

Através do presente trabalho foi possível, relacionar a morte das aves do PA com a ingestão de água contaminada com microcistinas. O estudo deste surto contribui para o conhecimento de casos de mortalidade animal causados por intoxicação com cianobactérias e cianotoxinas.

É muito importante estabelecer e implementar planos de monitorização de massas de água, bem como determinar os fatores ambientais responsáveis pela proliferação de cada espécie, fundamentais para a avaliação da qualidade da água, sobretudo quando esta é usada para atividades recreativas.

5. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento do problema associado às cianobactérias e fornecer avisos de importância vital e riscos associados às suas toxinas.

As amostras de água analisadas nas lagoas naturais e nos pontos de abeberamento de bovinos das explorações pecuárias da ilha do Pico, apresentam na sua comunidade fitoplanctónica, cianobactérias do género *Microcystis spp.*. Embora não tenham sido quantificadas as suas toxinas, estas águas podem constituir risco para a saúde animal, relativamente à presença de cianobactérias e possíveis toxinas associadas.

A análise fitoplanctónica ao parque ambiental do litoral norte de Portugal continental, permitiu relacionar a morte das aves com a ingestão de água contaminada com microcistinas. O estudo deste surto contribui para o conhecimento de casos de mortalidade animal causados por intoxicação com cianobactérias e cianotoxinas em Portugal.

Numa tentativa de ajudar ao diagnóstico por intoxicação por cianobactérias, foi desenvolvido um guia prático com procedimentos orientadores de laboratório para ser divulgado pelos profissionais de saúde animal em caso de risco potencial de *blooms* de cianobactérias.

Tendo em conta as condições de eutrofização e o aquecimento global, é expectável que os casos de intoxicações em animais domésticos e silváticos aumentem no futuro, sendo crucial a necessidade de monitorização sistemática das águas doces superficiais.

Este trabalho poderá servir de base para trabalhos futuros, mais aprofundados, a fim de criar uma abordagem inclusiva, integradora e holística à problemática das cianobactérias e cianotoxinas, numa rede colaborativa “One Health”, criando interligações com todos os profissionais de saúde Humana e animal e com as entidades envolvidas na gestão e monitorização de cianobactérias nas águas portuguesas.

Referências bibliográficas

- AMBIENTE Decreto-Lei n.º 152/2017 6555 110976054. , Pub. L. No. Diário da República, 1.ª série — N.º 235 (2017).
- Araújo, F. (2006). Cianobacterias: Ocorrências y gestión del riesgo en Portugal de 1993 a 2005. *Jornada Sobre Las Cianobacterias Tóxicas. Problemas Asociados. Seguimiento y Control. Madrid, 2.*
- Araújo, J. P., Vaz, P. S., Pinto de Andrade, L., Rodrigues, V. J., & Rodrigues, A. M. (2014). Extensive beef cattle production in Portugal. *International Workshop “New Updates in Animal Nutrition, Natural Feeding Sources and Environmental Sustainability,”* (May).
- Azevedo, S. M. F. ., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2002). *Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. Toxicology, 181-182, 441–446.* doi:10.1016/s0300-483x(02)00491-2
- Bartosiewicz, M., Przytulska, A., Deshpande, B. N., Antoniadis, D., Cortes, A., MacIntyre, S., ... Laurion, I. (2019). *Effects of climate change and episodic heat events on cyanobacteria in a eutrophic polymictic lake. Science of The Total Environment.* doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.220
- Beasley, V. R., Cook, W. O., Dahlem, A. M., Hooser, S. B., Lovell, R. A., & Valentine, W. M. (1989). *Algae Intoxication in Livestock and Waterfowl. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 5(2), 345–361.* doi:10.1016/s0749-0720(15)30980-4
- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae: Identification and use as Bioindicators.*
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., & Humbert, J.-F. (2003). *Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. Veterinary Research, 34(4), 361–377.* doi:10.1051/vetres:2003019
- Castro, N. O. De, & Moser, G. A. D. O. (2012). *Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. Oecologia Australis, 16(2), 235–264.*
- Chorus I, Bartram J (eds). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London; New York: E&FN Spon, behalf of UNESCO, WHO, UNEP, 1999
- Churro, C., Dias, E., Paulino, S., Alverca, E., & Pereira, P. (2013). *Importância da monitorização de cianobactérias em albufeiras portuguesas. Boletim Epidemiológico Observações.* <http://hdl.handle.net/10400.18/1541>
- Churro, C., & Valério, E. (2015). *Abordagem multidisciplinar na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas. Boletim Epidemiológico Observações.*

- Cirés, S., & del Corral, A. Q. (2011). *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*.
- CYMBRON, R., PACHECO, D., CRUZ, J. V., GONÇALVES, V., CABRAL, M., RAPOSEIRO, P. LIMA, M. J. (2008). Monitorização Da Qualidade Das Águas Interiores Das Ilhas Do Pico, Faial, Flores E Corvo Da Região Autónoma Dos Açores. In *Técnicas y métodos para la gestión sostenible del agua en la Macaronesia. Artículos Técnicos y Divulgativos*. Instituto Tecnológico de Canarias, S.A.
- Drobac, D., Tokodi, N., Lujčić, J., Marinović, Z., Subakov-Simić, G., Dulić, T., ... Svirčev, Z. (2016). *Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. Harmful Algae*, 55, 66–76. doi:10.1016/j.hal.2016.02.007
- Falconer, I. R., & Humpage, A. R. (2005). Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1), 43–50. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010043>
- Fischer, W. J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P. J., Dietrich, D. R., & Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3 SPEC. ISS.), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012>
- Fristachi, A., Sinclair, J. L., Hall, S., Berkman, J. A. H., Boyer, G., Burkholder, J., ... Walker, S. (2008). Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619(January), 45–103. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_3
- Gonçalves, V., Raposeiro, P. M., Couto, A. I., Costa, R. M., Rocha, F., Wattiez, X., ... Azevedo, J. M. N. (2006). Contribuição para a caracterização das águas interiores de superfície da ilha do Pico. *Relatórios e Comunicações Do Departamento de Biologia*, 34, 93–105.
- Griffith, A. W., & Gobler, C. J. (2019). *Harmful algal blooms: A climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. Harmful Algae*. doi:10.1016/j.hal.2019.03.008
- Henao, E., Rzymiski, P., & Waters, M. N. (2019). A Review on the Study of Cyanotoxins in Paleolimnological Research: Current Knowledge and Future Needs.
- Hilborn, E., & Beasley, V. (2015). *One Health and Cyanobacteria in Freshwater Systems: Animal Illnesses and Deaths Are Sentinel Events for Human Health Risks. Toxins*, 7(4), 1374–1395. doi:10.3390/toxins7041374
- Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), 903–915. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1838>
- INAG, I. P. (2009). *Manual para a avaliação da qualidade biológica da água. Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional*.
- Kalaitzidou, M., Petridou, E., Economou, V., Theodoridis, A., Angelidis, P., & Filioussis, G. (2016a). *Air & Water Borne Diseases Toxic Cyanobacteria . A Biological Hazard for Animal and Public Health: A Review*. 5(1), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2167-7719.1000130>

- Kalaitzidou, M., Petridou, E., Economou, V., Theodoridis, A., Angelidis, P., & Filioussis, G. (2016b). Toxic Cyanobacteria. A Biological Hazard for Animal and Public Health: A Review. *Air & Water Borne Diseases*.
- Karlson, B., Cusack, C., & Bresnan. (2010). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. In *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 2010*.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1998. Cyanoprokaryota. pt.1 Chroococcales. In *Süsswasserflora von Mitteleuropa* (Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer, D., eds.).
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota. pt.2 Oscillatoriales. In *Süsswasserflora von Mitteleuropa* (Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. & Schagerl, M., eds.). Elsevier, München, v. 19/1, 759 p.
- Liyanage, H. M., Arachchi, D. N. M., Abeysekara, T., & Guneratne, L. (2016). Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews Toxicology of freshwater cyanobacteria. *Journal of Environmental Science and Health*, <https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1193923>
- Lopes, V. R., Ramos, V., Martins, A., Souza, M., Welker, M., Antunes, A., Vasconcelos, V., 2012. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperature estuaries.
- Lund, J. W. G. (1965). the Ecology of the Freshwater Phytoplankton. *Biological Reviews*, 40(2), 231–290.
- Luz, R., Cordeiro, R., Vilaverde, J., Raposeiro, P. M., Fonseca, A., & Gonçalves, V. (2020). Cyanobacteria from freshwater lakes in the Azores archipelago, Portugal: Data from long term phytoplankton monitoring. *Biodiversity Data Journal*, 8. <https://doi.org/10.3897/BDJ.8.E51928>
- McLellan, N. L., & Manderville, R. A. (2017). *Toxic mechanisms of microcystins in mammals*. *Toxicology Research*, 6(4), 391–405. doi:10.1039/c7tx00043j
- Meeks, J., Campbell, E., Summers, M., & Wong, F. (2002). *Cellular differentiation in the cyanobacterium Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology*, 178(6), 395–403. doi:10.1007/s00203-002-0476-5
- Menezes, C, Nova, R., Vale, M., Azevedo, J., Vasconcelos, V., & Pinto, C. (2019). First description of an outbreak of cattle intoxication by cyanobacteria (blue-green algae) in the South of Portugal. *The Bovine Practitioner*
- Menezes, C., Churro, C., & Dias, E. (2017). *Risk Levels of Toxic Cyanobacteria in Portuguese Recreational Freshwaters*. *Toxins*, 9(10), 327.
- Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. (2017). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*.
- Molica, R., & Azevedo, S. (2009). Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecologia Brasiliensis*, 13(2), 229–246. <https://doi.org/10.4257/oeco.2009.1302.02>
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., & Gerber, P. (2017). *Livestock: On*

- our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, 14, 1–8. doi:10.1016/j.gfs.2017.01.001
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). *Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms*. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27–37. doi:10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x
- PGRH-Açores. (2016). *Caracterização e diagnóstico - Pico*.
- Prado, E. L. (2010). *Água destinada ao consumo humano Riscos para a saúde Humana resultantes da exposição a microcistinas*.
- Preece, E. P., Hardy, F. J., Moore, B. C., & Bryan, M. (2017). A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*, 61, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>
- Pugliese, G., & Favero, M. S. (1998). Liver Failure and Death After Exposure to Microcystins at Hemodialysis Center. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 19(6), 465–465. <https://doi.org/10.1017/s0195941700087890>
- Quintas, Hélder; Cordeiro, Ângela; Aguiar, Carlos (2014). *Plantas tóxicas para ruminantes*. Lisboa: Publicações Ciência e Vida. ISBN 978-972-590-093-2
- Reynolds, C.S. (1984) *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roset, J., Aguayo, S., & Muñoz, M. J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*, 18(2), 65–71. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/919/91918202/>
- Sivonen, K. (2009). Cyanobacteria Toxins. In *Encyclopedia of Microbiology* (Vol. 4, pp. 290–307).
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., ... Codd, G. A. (2019). *Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings*. *Archives of Toxicology*. doi:10.1007/s00204-019-02524-4
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M., & Ohno, T. (2006). *The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5442–5447. doi:10.1073/pnas.0600999103
- Wassmann, P., & Olli, K. (2005). Drainage basin nutrient inputs and eutrophication: an integrated approach. In *University of Tromsø, Norway, Tromsø*. <https://hdl.handle.net/10037/2389>
- Westrick, J. A., Szlag, D. C., Southwell, B. J., & Sinclair, J. (2010). A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(5), 1705–1714. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3709-5>
- WHO. (2015). *Management of Cyanobacteria in drinking water supplies: Information for regulators and water suppliers*.

- Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3 SPEC. ISS.), 201–218. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.002>
- Wood, R. (2016). Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. *Environment International*, 91, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026>
- Zanchett, G., & Oliveira-Filho, E. C. (2013). Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins*, 5(10), 1896–1917. <https://doi.org/10.3390/toxins5101896>

Referências eletrônicas

Arizona News (n.d). Acedido no dia 6 de junho de 2020 em <https://cals.arizona.edu/azaqua/algaeclass/algaedraw/PSALG.JPG>

BBC News (2020). Botswana: Mystery elephant deaths caused by cyanobacteria. Acedido no dia 12 de outubro de 2020 em <https://www.bbc.com/news/world-africa-54234396>

Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (n.d). Carne dos Açores IGP. Acedido em 22 de maio de 2020 em <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/carne/carne-de-bovino/102-carne-dos-aco-res-igp>

Direção Regional da Cultura (2015). Ilha do Pico. Acedido em 28 de outubro de 2020 em <http://www.culturacores.azores.gov.pt/ea/pesquisa/Default.aspx?id=9367>

DROTRH/DSRH (2010). Estudo comprova a ocorrência de florescências de cianobactérias em três das lagoas da ilha do Pico e a deteção de microcistinas nas lagoas do Capitão, Caiado, Rosada e Peixinho. Acedido em 16 de outubro de 2020 em <http://www.azores.gov.pt/Gra/srndrotrh/conteudos/noticias/2010/Abril/notícia+20100409b.htm>

FAGAR (2011). Importância da água. Acedido em 20 de agosto de 2020 em http://www.fagar.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=76

Fondriest Environmental (2014). “Algae, Phytoplankton and Chlorophyll.” Fundamentals of Environmental Measurements. Acedido em 22 outubro de 2020 em <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/waterquality/algaephytoplankton-chlorophyll/>

Merriam-Webster (2020). Toxina. Em *dicionário Merriam-Webster.com*. Acedido em 15 de novembro de 2020 em <https://www.merriam-webster.com/dictionary/toxin>


Science Learning Hub (2012). Venenos e toxinas. Acedido em 15 de novembro de 2020 em de <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/364-poisons-and-toxins>

Understanding Macroevolution - Course Hero (n.d). Acedido no dia 13 de Agosto de 2020 em <https://www.coursehero.com/sg/introduction-to-biology/understanding-macroevolution/>

Anexo A



NECRÓPSIAS - REGISTO DE LESÕES MACROSCÓPICAS


Nº da Análise	Descrição de Lesões
LNV - Vairão P-PAT-20-05568/P-PAT/001 2020/06/12 *5089096* <small>Mod. PSA/PAT-002/1</small> *5089096*	Elucrescências na cavidade oral e plumagem Atrofia muscular Hemorragia pulmonar, exsone em sangue ao corte rins hemorrágicos muito friáveis Espuma e sangue nos sacos aéreos Bazo congestionado Parasitas no Intestino delgado, com a parede espessada
Pato real colhita	INIAV/GIC P-PAT-20-05568 2020/06/12  *1887371*
LNV - Vairão P-PAT-20-05568/P-PAT/002 2020/06/15 *5089493* <small>Mod. PSA/PAT-002/1</small> *5089493*	Elucrescências na cavidade oral e esôfago e traqueia Hematoma no tórax lado direito (3.1cm) Esplenomegalia Pulmões congestionados e hemorrágicos Elucrescências no pro-ventrículo e plumagem Distensão das asas intestinais, conteúdo verde Microestípite LR - morto
galinha de água ♂ colhita	

15/07/2020

Anexo B

iniov

NECRÓPSIAS - REGISTO DE LESÕES MACROSCÓPICAS



Nº da Análise	Descrição de Lesões
<p data-bbox="347 645 534 728">INIAV/GIC P-PAT-20-05566 2020/06/12</p>  <p data-bbox="403 772 475 788">*1887363*</p> <p data-bbox="371 831 534 981">Pato Real ♀ culta</p>	<ul style="list-style-type: none">- Amolecimento da córnea- infiltração hemorrágica no peito, no m. pectoral lado direito- rim direito e esquerdo hemorrágicos e congestionados- Edema da bolsa de falúcio <p data-bbox="643 1529 970 1597">Miacetina LR - morte</p>

15/07/2020

Anexo C



NECRÓPSIAS - REGISTO DE LESÕES MACROSCÓPICAS

Nº da Análise	Descrição de Lesões
<p>INIAV/GIC P-PAT-20-05565 2020/06/12</p>  <p>*1887362*</p>	<p>Decomposição cadavérica Redução e enegrecimento dos órgãos parenquimatosos Eltroscópicos na pelagem e cavidade oral</p>
<p>INIAV/GIC P-PAT-20-05569 2020/06/12</p>  <p>*1887372*</p>	<p>Decomposição cadavérica com ruptura do tubo digestivo Eltroscópicos na pelagem</p>
	<p>Vitacastrol 2R - mastoc</p>

15/07/2020

Anexo D



Relatório de ensaio de Quantificação de Microcistinas pelo método de ELISA			
Entidade que solicitou o ensaio:		Inst. Nac. Inv. Agrária e Veterinária, Rua dos Lagidos 4485-655 Vairão	
Entrega de amostras:	02.09.20	Relatório nº	20.790
			Data do relatório: 23.09.20

METODOLOGIA

Para a deteção de microcistina a amostra foi sujeita a um processo de extração. O extrato resultante foi filtrado através de um filtro de 0,20µm. A quantificação foi feita em placa. À amostra é adicionado um conjugado microcistina-enzima e um anticorpo que compete com as microcistinas da amostra pelos locais de ligação, e posteriormente uma solução cromogénica que na presença do conjugado microcistina-enzima origina composto de cor azul. A reação é finalizada com a adição de uma solução stop. O limite de deteção é de 0,15 (µg/l).

RESULTADOS

Tabela I: Concentração de microcistinas em µg/g peso fresco .

Amostra	Concentração de microcistinas (µg/g de peso fresco)
P-PAT-20-06694	0,63
Figado	

O Resp. Técnico

NOSTOC
Laboratório de Investigação Biológica, Lda
(Doutora Elisa Martins)



Só é autorizada a reprodução deste relatório de ensaios na sua forma integral.
Os resultados referem-se apenas aos itens ensaiados.

NTC119.0

1/1

Laboratório de Investigação Biológica, Lda
Praceta Artur Marques, 37, 4470-079 Maia . Telf: 223 389 153 . nostoc.geral@gmail.com . www.nostoclab.com

Anexo E



NOSTOC

Relatório de ensaio de Quantificação de Microcistinas pelo método de ELISA			
Entidade que solicitou o ensaio:	Inst. Nac. Inv. Agrária e Veterinária, Rua dos Lagidos 4485-655 Vairão		
Entrega de amostras:	02.09.20	Relatório nº	20.788
			Data do relatório: 29.09.20

METODOLOGIA

Para a deteção de microcistina a amostra foi sujeita a um processo de extração. O extrato resultante foi filtrado através de um filtro de 0,20µm. A quantificação foi feita em placa. À amostra é adicionado um conjugado microcistina-enzima e um anticorpo que compete com as microcistinas da amostra pelos locais de ligação, e posteriormente uma solução cromogénica que na presença do conjugado microcistina-enzima origina composto de cor azul. A reação é finalizada com a adição de uma solução stop. O limite de deteção é de 0,15 (µg/l).

RESULTADOS

Tabela I: Concentração de microcistinas em µg/g peso fresco .

Amostra	Concentração de microcistinas (µg/g de peso fresco)
P-PAT-20-05568/001	> 5,0
Figado	

O Resp. Técnico
NOSTOC
(Doutora Elisa Martins)
Laboratório de Investigação Biológica, Lda



Só é autorizada a reprodução deste relatório de ensaios na sua forma integral.
Os resultados referem-se apenas aos itens ensaiados.

NTCI19.0

Laboratório de Investigação Biológica, Lda
Praceta Artur Marques, 37, 4470-079 Maia . Telf.: 223 389 153 . nostoc.geral@gmail.com . www.nostoclub.com

1/1

Anexo F



Relatório de ensaio de Quantificação de Microcistinas pelo método de ELISA			
Entidade que solicitou o ensaio:	Inst. Nac. Inv. Agrária e Veterinária, Rua dos Lagidos 4485-655 Vairão		
Entrega de amostras:	02.09.20	Relatório nº	20.789
			Data do relatório: 23.09.20


METODOLOGIA

Para a deteção de microcistina a amostra foi sujeita a um processo de extração. O extrato resultante foi filtrado através de um filtro de 0,20µm. A quantificação foi feita em placa. À amostra é adicionado um conjugado microcistina-enzima e um anticorpo que compete com as microcistinas da amostra pelos locais de ligação, e posteriormente uma solução cromogénica que na presença do conjugado microcistina-enzima origina composto de cor azul. A reação é finalizada com a adição de uma solução stop. O limite de deteção é de 0,15 (µg/l).

RESULTADOS

Tabela I: Concentração de microcistinas em µg/g peso fresco .

Amostra	Concentração de microcistinas (µg/g de peso fresco)
P-PAT-20-05568/002	2,43
Figado	

O Resp. Técnico

NOSTOC
Laboratório de Investigação Biológica, Lda
(Doutora Elisa Martins)

Só é autorizada a reprodução deste relatório de ensaios na sua forma integral.
Os resultados referem-se apenas aos itens ensaiados.

NTCI19.0

1/1

Laboratório de Investigação Biológica, Lda
Praceta Artur Marques, 37, 4470-079 Maia . Telf: 223 389 153 . nostoc.geral@gmail.com . www.nostoclub.com

Anexo G



Relatório de ensaio de Quantificação de Microcistinas pelo método de ELISA			
Entidade que solicitou o ensaio:	Inst. Nac. Inv. Agrária e Veterinária, Rua dos Lagidos 4485-655 Vairão		
Entrega de amostras:	02.09.20	Relatório nº	20.787
			Data do relatório: 23.09.20

METODOLOGIA

Para a deteção de microcistina a amostra foi sujeita a um processo de extração. O extrato resultante foi filtrado através de um filtro de 0,20µm. A quantificação foi feita em placa. À amostra é adicionado um conjugado microcistina-enzima e um anticorpo que compete com as microcistinas da amostra pelos locais de ligação, e posteriormente uma solução cromogénica que na presença do conjugado microcistina-enzima origina composto de cor azul. A reação é finalizada com a adição de uma solução stop. O limite de deteção é de 0,15 (µg/l).

RESULTADOS

Tabela I: Concentração de microcistinas em µg/g peso fresco

Amostra	Concentração de microcistinas (µg/g de peso fresco)
P-PAT-20-05566	0,76
Figado	

O Resp. Técnico

(Doutora Elsa Martins)
Laboratório de Investigação Biológica, LBI

NTCH19.0

Só é autorizada a reprodução deste relatório de ensaio na sua forma íntegra.
Os resultados referem-se apenas aos itens ensaiados.

1/1