Elsa Maria Ramos Vilas Boas

A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, DA INTENSIDADE LUMINOSA E DE COAGULANTES / FLOCULANTES NA LIBERTAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS POR *Microcystis aeruginosa* Kützing ex Lemmermann (CIANOBACTÉRIA : CHROOCOCALES).



Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Abril / 1999

Elsa Maria Ramos Vilas Boas

A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, DA INTENSIDADE LUMINOSA E DE COAGULANTES / FLOCULANTES NA LIBERTAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS POR *Microcystis aeruginosa* Kützing ex Lemmermann (CIANOBACTÉRIA : CHROOCOCALES)



Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Mestre em Hidrobiologia

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Abril / 1999

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Vitor Vasconcelos, do Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, meu orientador, por ter sugerido o tema e orientado todas as fases do meu trabalho. Agradeço ainda a disponibilização da estirpe de *Microcystis aeruginosa* IZANCYA2 .

Ao Dr. Álvaro Amorim, aluno de doutoramento no Laboratório de Ecotoxicologia da F.C.U.P., pela preciosa e paciente ajuda prestada nas análises com o HPLC.

À Dra. Marília Coelho e à Dra. Elisa Pereira do Laboratório de Ecotoxicologia e às minhas colegas do curso de Mestrado, Dra. Isabel Nogueira e Dra. Rosário Martins, por toda a colaboração prestada no decorrer do trabalho experimental. Não posso deixar de salientar a ajuda da Dra. Isabel Nogueira na resolução de problemas relacionados com a cultura de *Microcystis*.

Ao Eng. Luís Antunes, da Águas do Douro e Paiva S.A., pelos esclarecimentos prestados sobre o esquema de tratamento utilizado na ETA piloto de Lever.

Ao Sr. Rui Valedoleiros pelo fornecimento de dados sobre o método de tratamento da água na ETA do Marco de Canaveses e pela disponibilização de Locron S e Labufloc C 1210.

À Dra. Maria João Polidoro pela ajuda prestada no tratamento estatístico dos dados.

A todos os meus amigos e colegas que de alguma forma me ajudaram.

Finalmente aos meus pais e ao meu marido pelo apoio incondicional prestado em todos os momentos e sem o qual eu nunca teria conseguido realizar este trabalho.

RESUMO

Algumas estirpes de cianobactérias, também conhecidas como algas verde – azuis, são produtoras de metabolitos altamente tóxicos. Em massas de água eutróficas e hipertróficas a intensidade e a duração das florescências cianobacterianas tóxicas tem aumentado nos últimos anos, tendo sido várias vezes apontadas como responsáveis por intoxicações agudas em vertebrados, incluindo o Homem. Mas, o maior risco para a Saúde Pública reside nos efeitos crónicos associados à ingestão de cianotoxinas na água de consumo. Por isso, é necessário conhecer a persistência e a estabilidade das cianotoxinas nas origens de água para consumo e durante o seu tratamento nas Estações de Tratamento de Água.

As cianotoxinas mais frequentemente detectadas são microcistinas, a maior parte isoladas de florescências ou culturas laboratoriais de estirpes de *Microcystis*. Neste trabalho, procurou-se determinar a influência dos factores intensidade luminosa, temperatura e presença de coagulantes / floculantes (sulfato de alumínio, Locron S e Labufloc C 1210) na libertação e degradação de microcistinas, produzidas pela estirpe de *Microcystis aeruginosa* IZANCYA2. As intensidades luminosas testadas foram 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}, 5,75 μmol m^{-2} s^{-1}, 2,55 μmol $m^{-2}s^{-1}$, 1,03 μmol m^{-2} s^{-1} e 0 μmol m^{-2} s^{-1}, e as temperaturas 21 °C, 23 °C, 26 °C e 28 °C, durante um período de incubação de 28 dias. As concentrações de sulfato de alumínio ensaiadas foram 30 mg L^{-1}, 60 mg L^{-1} e 90 mg L^{-1}. As concentrações de Locron S utilizadas foram 50 mg L^{-1}, 75 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1}, tendo-se adicionado Labufloc C 1210, numa concentração de 50 mg L^{-1}, após 10 minutos de contacto. A detecção e quantificação das microcistinas foi efectuada por HPLC.

Verificou-se uma correlação negativa entre a taxa de crescimento e a quantidade de microcistinas detectadas nos filtrados nas culturas colocadas sob diferentes temperaturas e nas culturas incubadas a 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}. Nestas culturas incubadas a 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} (intensidade luminosa máxima testada) a fase de degradação mais rápida (52,9% em 4 dias) ocorreu após 20 dias de incubação; nas restantes intensidades luminosas obteve-se uma degradação completa nos primeiros quatro dias do período de incubação. Relativamente à experiência com diferentes temperaturas, a libertação de microcistinas para o meio e a sua degradação foram mais precoces nas culturas incubadas a 21 °C e 23 °C. A adição de sulfato de alumínio ao meio provocou uma ligeira libertação de microcistinas por IZANCYA2 e, de forma análoga, o Locron S e o Labufloc C 1210 também não foram causadores de libertação ou degradação de microcistinas muito significativas. A utilização destes coagulantes/floculantes no tratamento da água para consumo humano não acarretará riscos para a Saúde Pública se as ETA possuirem adsorção com carvão activado incorporada no seu esquema de tratamento após a etapa da coagulação / floculação.

Os resultados obtidos salientam a necessidade duma monitorização das cianobactérias e suas toxinas não só na água bruta mas em todas as etapas de tratamento da água na ETA, de forma a reajustar continuamente o tratamento.

ABSTRACT

Some strains of cyanobacteria, also known as blue-green algae, produce highly toxic metabolites. In eutrophic freshwaters the intensity and the duration of the toxic cyanobacterial blooms have increased in the last years, and they have often been referred as responsible for acute intoxications in vertebrates, including Man. Neverthless, the greatest risk to the Public Health consists in the cronic effects associated to the ingestion of cyanotoxins in the drinking water. That is why it is necessary to know the persistence and the stability of the cyanotoxins in the origin of the drinking water and during its treatment.

The cyanotoxins more frequently detected are microcystins, the greatest part isolated of natural blooms or laboratory-grown cultures of strains of *Microcystis*. In this work we tried to determine the influence of light, temperature and the presence of coagulant/flocculant (aluminium sulphate, Locron S and Labufloc C 1210) in the release and degradation of microcystins, produced by the strain of *Microcystis aeruginosa* IZANCYA2. The light levels tested were 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}, 5,75 μmol m^{-2} s^{-1}, 2,55 μmol $m^{-2}s^{-1}$, 1,03 μmol m^{-2} s^{-1} and 0 μmol m^{-2} s^{-1} and the temperatures 21 °C, 23 °C, 26 °C and 28 °C, during a period of 28 days. The concentration of aluminium sulphate tested were 30 mg L^{-1}, 60 mg L^{-1} and 90 mg L^{-1}. The concentration of Locron S used were 50 mg L^{-1}, 75 mg L^{-1} and 100 mg L^{-1}, and we added Labufloc C 1210, in a concentration of 50 mg L^{-1}, after 10 minutes of contact. The detection and the quantification of microcystins was performed by HPLC.

A negative correlation was found between the growth rate and the amount of microcystins detected in the filtrates, in the cultures under different temperatures and in the cultures incubated at 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}. In these cultures incubated at 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} (maximun light level tested) the fastest period of degradation (52,9% in 4 days) occurred after 20 days of incubation; in the other light levels a complete degradation was obtained in the first four days of the incubation period. As far as the experiment with different temperatures is concerned, the release of microcystins to the environment and its degradation were more precocious in the cultures incubated at 21 °C and 23 °C. The addition of aluminium sulphate caused a light release of microcystins by IZANCYA2 and, in a similar way, Locron S and Labufloc C 1210 did not also cause the release or degradation of very significative quantity of microcystins. The use of these coagulant/flocculant in the treatment of water for human use will not bring risks to the Public Health if the water treatment plant possess adsorption with activated carbon incorporated in its scheme of treatment after coagulation/flocculation.

The results obtained in this work stress the need for a monitoring program on the cyanobacteria and their toxins not only in the raw water but in all the treatment phases of the water treatment plant, in order to continually readjust the treatment.

RÉSUMÉ

Quelques souches de cyanobactéries , connues aussi comme des algues bleues-vertes, ont la capacité de produire des métabolites hautement toxiques. Dans les plans d'eau eutrophisées l'intensité et la duration des fleurs d'eau cyanobactériennes toxiques ont augmenté ces années dernières, ayant été souvent indiquées comme les responsables par des intoxications aiguës dans les vertebrés, y compris l'Homme. Mais le risque le plus grand pour la Santé Publique se situe dans les effets chroniques associés à l'ingestion de cyanotoxines à travers l'eau. De ce fait, il faut connaître la persistance et la stabilité des cyanotoxines dans les sources d'eau destinée à l'alimentation et durant son traitment dans les Stations de Traitment d'Eau (STE).

Les cyanotoxines qui se détectent plus frequemment sont des microcystines, la plupart étant isolées de fleurs d'eau ou de cultures laboratoriales de souches de *Microcystis*. Dans ce travail, on a tenté de déterminer l'influence des facteurs intensité lumineuse, température et présence de coagulant/ floculateur (sulfate d'aluminium, Locron S et Labufloc C 1210) dans la libération et dégradation de microcystines produites par la souche de *Microcystis aeruginosa* IZANCYA2. Les intensités lumineuses testées on été 21,12 µmol m^{-2} s^{-1}, 5,75 µmol m^{-2} s^{-1}, 2,55 µmol $m^{-2}s^{-1}$, 1,03 µmol m^{-2} s^{-1} et 0 µmol m^{-2} s^{-1}, et les températures 21 °C, 23 °C, 26 °C et 28 °C, pendant une période d'incubation de 28 jours. Les concentrations de sulfate d'aluminium essayées ont été 30 mg L^{-1}, 60 mg L^{-1} et 90 mg L^{-1}; les concentrations de Locron S utilisées ont été 50 mg L^{-1}, 75 mg L^{-1} et 100 mg L^{-1}, auxquelles on a additionné Labufloc C 1210, dans une concentration de 50 mg L^{-1} à la fin de 10 minutes de contact. La détection et quantification des microcystines a été effectuée par HPLC.

On a vérifié une corrélation négative entre le taux de croissance et la quantité de microcystines détectées dans les filtrés des cultures soumises à des différentes températures et dans des cultures incubées à 21,12 µmol m^{-2} s^{-1}. Dans ces cultures incubées à 21,12 µmol m^{-2} s^{-1} (intensité lumineuse maximum testée) la phase de dégradation la plus rapide (52,9% en 4 jours) est arrivée 20 jours aprés l'incubation. Dans les autres intensités lumineuses on a obtenu une dégradation complète dans les premiers 4 jours de la période d'incubation. En ce qui concerne l'expérience avec des températures différentes, la libération de microcystines au sein du milieu de culture et leur dégradation ont été plus précoces dans les cultures incubées à 21 °C et 23 °C. L'addition, au milieu de culture, de sulfate d'aluminium n'a provoqué qu'une légère libération de microcystines par IZANCYA2. De façon analogique, le Locron S et le Labufloc C 1210 n'ont pas été responsables par une libération ou dégradation de microcystines significatives. L'utilisation de ces coagulants/floculateures dans le traitement d'eau destinée à l'alimentation n'occasionnera pas des risques pour la Santé Publique si les STE incluent de l'adsorption avec du charbon activé, incorporée dans leur schéma de traitement, effectuée aprés l'étape de coagulation/floculation.

Les résultats obtenus font ressortir le besoin d'une monitorization des cyanobactéries et de leurs toxines non seulement dans l'eau brute mais aussi dans toute les étapes de traitement d'eau dans les STE de façon à réajuster continuellement le traitement.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 8

1.1 Cianotoxinas e outros compostos bioactivos - seus efeitos 9
1.1.1 Hepatotoxinas 11
1.1.2 Neurotoxinas 14
1.1.3 Dermotoxinas e endotoxinas lipopolissacáridas 15

1.2 Intoxicações em humanos 16
1.2.1 Intoxicações agudas 16
1.2.2 Intoxicações crónicas 17

1.3 Influência de factores ambientais na produção de cianotoxinas 18

1.4 Libertação e degradação das cianotoxinas 20

1.5 Remoção das cianotoxinas / tratamento da água 23

1.6 Âmbito e objectivos do trabalho 26

2. MATERIAL E MÉTODOS 27

2.1 Cultura da estirpe de *Microcystis aeruginosa* IZANCYA2 27

2.2 Intensidade luminosa 28

2.3 Temperatura 29

2.4 Adição de coagulantes e floculantes 29
2.4.1 Sulfato de alumínio 30
2.4.2 Locron S e Labufloc C 1210 30

2.5 Extracção das toxinas 31
2.5.1 Intensidade luminosa / temperatura 31
2.5.2 Adição de coagulantes e floculantes 32

2.6 Detecção e quantificação das toxinas por HPLC 33

2.7 Análise dos dados 34

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

3.1 Intensidade luminosa 36

3.2 Temperatura 49

3.3 Adição de coagulantes e floculantes 60
3.3.1 Sulfato de alumínio 60
3.3.2 Locron S e Labufloc C 1210 63

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 67

5. CONCLUSÕES 70

6. APÊNDICES 72

6.1 Apêndice 1 73

6.2 Apêndice 2 74

6.3 Apêndice 3 76

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias ou algas verde - azuis são procariontes fotossintéticos que se encontram principalmente em ambientes aquáticos mas também em ambientes terrestres, como simbiontes (Bergman *et al.*, 1996). Pelo facto de serem importantes produtores primários, possuidores de clorofila-*a* e capazes de realizar fotossíntese com produção de oxigénio semelhante à das algas eucarióticas e restantes plantas (apesar de, em algumas circunstâncias, serem capazes de realizar fotossíntese anoxigénica – van Liere & Walsby, 1982), foram primeiro objecto de estudo dos botânicos, sendo designadas por Cyanophyceae ou Cyanophyta. Mas, a partir dos trabalhos de Stanier e colaboradores (1971 *in* van Liere & Walsby, 1982) tornaram-se importantes organismos de pesquisa para os bacteriologistas e passaram a ser designadas por cianobactérias.

O fotoautotrofismo é o modo de nutrição predominante mas existem cianobactérias com capacidade para viver heterotroficamente em ambientes de baixa luminosidade ou mesmo na obscuridade (van Liere & Walsby, 1982). As cianobactérias possuem uma fisiologia versátil e uma grande tolerância ecológica, que contribui para o seu sucesso competitivo em muitos ambientes. A grande tolerância ecológica é considerada uma consequência da sua longa história evolutiva (Schopf, 1994). Evidências fósseis sugerem que as cianobactérias se encontravam entre os primeiros seres vivos que habitavam a Terra, tendo dominado o biota na Era Precâmbrica, há 3500 milhões de anos (Schopf, 1994). Actualmente as florescências ou "blooms" de cianobactérias em meios eutrofizados (nomeadamente com elevados níveis de fósforo) são um problema em muitos países devido principalmente à produção de toxinas. Em aproximadamente 60 % dos casos de florescências encontram-se cianobactérias tóxicas (Falconer, 1998), também ocorrendo depleção de oxigénio, nomeadamente aquando da decomposição das células cianobacterianas no final da florescência e inibição de outros produtores primários. Estes efeitos agudos, que incluem muitas vezes morte de peixes, aves e outros vertebrados, podem, no entanto, ter uma importância ecológica inferior aos efeitos subletais (Lindholm *et al.*, 1992).

Existem registos de cianobactérias tóxicas em pelo menos 44 países, para além do Mar Báltico, Mar das Caraíbas, Oceano Atlântico, Oceano Pacífico e Oceano Índico (Codd,

1998). Em Portugal tem-se verificado, nos últimos anos com grande frequência, desenvolvimento de florescências de cianobactérias tóxicas em lagos naturais, estuários de alguns rios, albufeiras e açudes (Vasconcelos, 1994). Alguns destes locais são origens de água para abastecimento público. As principais espécies de cianobactérias tóxicas que surgem em águas superficiais portuguesas são *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos - aquae* e *Aphanizomenon flos - aquae* (Vasconcelos, 1992).

A utilização de recursos hídricos contaminados com cianobactérias tóxicas como fonte de abastecimento de água para consumo humano, para abeberamento de animais, para actividades recreativas e para cultura de moluscos e peixes, capazes de bioacumular cianotoxinas, acarreta graves riscos para a Saúde Pública, derivados não só da ingestão e/ou contacto com estas cianobactérias tóxicas, mas também da ingestão das toxinas após a sua dissolução na água ou acumulação em alimentos. Os tratamentos usualmente utilizados nas Estações de Tratamento de Água (ETA) não são eficazes na remoção destas toxinas, pelo que existe o risco delas estarem presentes na água destinada a consumo humano. Segundo a legislação portuguesa actualmente em vigor (Decreto-Lei nº 176/98 de 1 de Agosto) a selecção do tipo de tratamento a aplicar depende de características físicas, químicas e microbiológicas, nas quais não se inclui a presença de cianobactérias e/ou cianotoxinas na água que chega à ETA.

As toxinas produzidas pelas cianobactérias podem classificar-se em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermotoxinas e endotoxinas lipopolissacáridas. São capazes de provocar intoxicações agudas, mas também existem toxinas que favorecem o desenvolvimento de tumores.

1.1 Cianotoxinas e outros compostos bioactivos - seus efeitos

As cianobactérias incluem muitos géneros com espécies capazes de produzirem biotoxinas, nomeadamente *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis* e *Nostoc* (Codd & Beattie, 1991), e também seres produtores de compostos citotóxicos. Estas citotoxinas têm-se revelado ferramentas

importantes na pesquisa citológica e farmacológica, como antibióticos, antifúngicos e antivíricos, alelopáticos, promotores de anti-tumores (Namikoshi & Rinehart, 1996) ou antimitóticos.

As biotoxinas podem ser divididas em quatro grupos principais : hepatotoxinas, neurotoxinas (tabela 1.1), dermatoxinas e endotoxinas lipopolissacáridas. A toxicidade de florescências já foi atribuída a cerca de 40 espécies diferentes de cianobactérias (Skulberg *et al.*, 1993).

Tabela 1.1 – Hepato- e neurotoxinas cianobacterianas (adaptado de Henriksen, 1996)

Toxina	Tipo	Descrição química	DL_{50} ($\mu g\ Kg^{-1}$)[a]	Modo de acção	Referências bibliográficas
Microcistinas	hepatotoxinas	heptapéptidos	50->1200	inibem fosfatases proteicas 1, 2A e 3	Rinehart *et al.*, 1994
Nodularinas	hepatotoxinas	pentapéptidos	50->1200	inibem fosfatases proteicas 1, 2A e 3	Eriksson *et al.*, 1988 Namikoshi *et al.*, 1994 Rinehart *et al.*, 1994
Cilindros-permopsina	hepato / citotoxina	alcalóide	2100/200[b]	inibem síntese proteica	Ohtani *et al.*, 1992 Terao *et al.*, 1994
Anatoxina-a Homoanatoxina-a	neurotoxinas	alcalóides	250	despolarizadores pós-sinápticos	Devlin *et al.*, 1977 Skulberg *et al.*, 1992
Anatoxina-a(S)	neurotoxina	organofosforado	20-50	anticolinesterase	Matsunaga *et al.*, 1989
Saxitoxina Neosaxitoxina	neurotoxinas	alcalóides	10-100	bloqueadores dos canais de sódio nos neurónios	Gorham & Carmichael, 1988 ; Humpage *et al.*, 1994

[a] Injecção intraperitoneal em murganhos ; DL_{50} = dose letal para 50% dos indivíduos aos quais foi administrado o produto tóxico

[b] DL_{50} de 2,1 mg Kg^{-1} após 24 h e 0,2 mg Kg^{-1} após 5-6 dias

1.1.1 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas incluem heptapeptídeos (as microcistinas, também designadas por cyanoginosinas – Jones *et al.*, 1995), pentapeptídeos (as nodularinas) e um alcalóide (a cilindrospermopsina) – tabela 1.1.

As microcistinas foram identificadas em *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Anabaena*, que são os principais géneros cianobacterianos implicados na formação de florescências, e também em *Nostoc*. Foram ainda detectadas numa florescência dominada por *Anabaenopsis milleri* (Codd, 1998), em pelo menos uma cianobactéria terrestre, *Hapalosiphon hibernicus* (Prinsep *et al.*, 1992 *in* Rapala, 1998) e em cianobactérias bênticas em lagos dos Alpes suíços (Mez *et al.*, 1997 *in* Rapala, 1998). Existem também cada vez mais evidências de que a produção de microcistinas pode ocorrer em cianobactérias de águas salobras e ecossistemas marinhos litorais (Codd, 1998).

As microcistinas são um grupo de heptapéptidos cíclicos com uma estrutura geral ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Z-ADDA-D-Glu-Mdha), onde X e Z representam variados L-aminoácidos, D-MeAsp é ácido D-eritro-β-metilaspártico, ADDA é ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico, Mdha é N-metildehidroalanina, Ala é alanina e Glu é glutamina (Carmichael *et al.*,1988). Em 1997 conheciam-se 52 variantes de microcistinas (Carmichael, 1997), sendo as principais diferenças entre estes compostos ao nível dos dois L-aminoácidos e na presença ou ausência de um grupo metilo nos aminoácidos D-MeAsp e/ou Mdha (Sivonen, 1996). Mas novas microcistinas estão sempre a ser acrescentadas à lista, como a detectada por Mahakhant e colaboradores (1998) – uma microcistina contendo o ácido L-2-amino-N-butírico - numa florescência de um pequeno lago de Banguecoque (Tailândia). As designações para as diferentes variantes incluem letras correspondentes às abreviaturas dos dois L-aminoácidos que possuem : A – alanina, L – leucina, R – arginina, Y – tirosina e M – metionina.

Parece serem requisitos para haver toxicidade o péptido ser cíclico e o ADDA apresentar uma ligação dupla 6E em vez da análoga 6Z (Rinehart *et al.*, 1994). O ADDA é responsável pelo espectro UV característico das microcistinas com uma absorvância máxima a um comprimento de onda de 238 nm (Jones *et al.*, 1995). No entanto, as microcistinas que contêm triptofano, como a microcistina-WR e as suas variantes, apresentam uma absorção máxima a 222 nm (Lawton *et al.*, 1994).

As mais frequentemente detectadas são microcistinas produzidas por cianobactérias do género *Microcystis*, sendo, das mais de cinquenta conhecidas, a microcistina-LR (MCYST-LR), produzida por *Microcystis aeruginosa*, a mais comum (Watanabe *et al.*, 1989 ; Carmichael, 1992 ; Vasconcelos *et al.*, 1993 ; Azevedo *et al.*, 1994 ; Donati *et al.*, 1994 ; Oudra *et al.*, 1998). Também em Portugal a MCYST-LR é a toxina mais frequentemente presente nas florescências assim como nas estirpes isoladas, apesar de outras toxinas como MCYST-RR, MCYST-YR, MCYST-LA e [D-Asp^3]MCYST-LR também serem comuns (Vasconcelos *et al.*, 1996).

A DL_{50} intraperitoneal da microcistina-LR é de 50 μg Kg^{-1} de peso do rato, enquanto que para a variante arginina-arginina (microcistina-RR) é somente 600 μg Kg^{-1}. A DL_{50} da variante YR é de 68 μg Kg^{-1}. Estas toxinas podem no entanto ser consideradas medianamente tóxicas em comparação com os valores de DL_{50} intraperitoneal para a toxina do botulismo (0,00003 μg Kg^{-1}), toxina do tétano (0,0001 μg Kg^{-1}) e toxina diftérica (0,3 μg Kg^{-1}), mas são altamente tóxicas quando comparadas com a estricnina (500 μg Kg^{-1}) e o cianeto de sódio (10,0 μg Kg^{-1}) - National Rivers Authority (1990 *in* Keevil, 1991).

A administração de uma dose letal de MCYST-LR a murganhos causa grande hemorragia hepática; os animais apresentam fígados volumosos e vermelho-escuro, acumulação de eritrócitos e destruição do endotélio sinusoidal. A hepatomegalia parece ser causada primariamente pela hemorragia intrahepática (necrose hepatocelular e colapso do parênquima hepático) e a morte dos murganhos resulta do choque hipovolémico (Carmichael, 1994). Estes efeitos resultam da inibição de proteínas fosfatases que ocasiona uma hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto, incluindo os filamentos intermédios, microtúbulos e microfilamentos de actina. Em codornizes injectadas intraperitonealmente com microcistina-RR purificada de *M. viridis* observou-se uma hipertrofia do baço (Takahashi & Kaya, 1993).

As microcistinas ligam-se covalentemente às proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2), inibindo-as (Mackintosh & Mackintosh, 1994), o que acarreta uma desintegração do citoesqueleto causadora dos danos tecidulares anteriormente referidos. As microcistinas são também capazes de inibirem a proteína fosfatase 3 (PP3) – Honkanen *et al.*(1994 *in* Henriksen, 1996). Provavelmente o anel peptídico ajuda a estabilizar a cadeia lateral ADDA, permitindo a interacção desta com o local catalítico da proteína fosfatase (Carmichael, 1997). Runnegar e respectivos colaboradores (1995 *in* Carmichael, 1997), verificaram que a

metildehidroalanina da MCYST se liga covalentemente à Cys273 da subunidade catalítica da proteína serina/treonina fosfatase 1. Por outro lado, Li e Damuni (1994 *in* Carmichael, 1997) demonstraram que a MCYST-LR inibe directamente a metilação da PP2A ; liga-se ao grupo carboxilo da subunidade C da PP2A, impedindo o acesso da metiltransferase ao seu local alvo. A inibição de PP2A, PP3 e PP1, por ordem decrescente de potência, explica a potente acção promotora de tumores exibida pelas microcistinas (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

A cilindrospermopsina, um inibidor da síntese proteica (tabela 1.1), é produzida pela espécie subtropical *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani *et al.*, 1992) e também foi isolada de *Umezakia natans* no lago Mikata no Japão (Harada *et al.*, 1994) e de *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker *et al.*, 1997 *in* Rapala, 1998). O principal alvo deste alcalóide tóxico é o fígado mas também afecta o timo, os rins, o coração, as glândulas supra-renais, os pulmões e o intestino (Codd, 1998), inibindo a síntese proteica. A cilindrospermopsina provoca hipertrofia do fígado e necrose centralobular quando injectada intraperitonealmente em ratinhos. Segundo Runnegar e colaboradores (1995 *in* Carmichael, 1887), o citocromo P-450 está provavelmente envolvido no metabolismo desta toxina, podendo os metabolitos resultantes serem mais potentes que a própria toxina.

As nodularinas foram isoladas da espécie de água salobra *Nodularia spumigena* (Rinehart *et al.*, 1994) e um composto análogo, a motuporina, da esponja marinha *Theonella swinhoei* Gray (de Silva *et al.*, 1992 *in* Henriksen, 1996), apesar de ainda não estar devidamente esclarecido se o produtor da toxina é a alga ou algum microorganismo simbionte. Já foram detectadas nodularinas na Austrália (Jones *et al.*, 1994), na Nova Zelândia, no Mar Báltico (Sivonen *et al.*, 1989) e em lagos litorais do Mar do Norte (Nehring, 1993 *in* Rapala, 1998).

As nodularinas são pentapéptidos cíclicos possuidores de três aminoácidos comuns às microcistinas, D-MeAsp, ADDA e D-Glu. Para além destes aminoácidos o anel é formado por L-Arg e Mdhb (ácido N-metil-dehidro-α-aminobutírico). Caracterizaram-se 7 nodularinas que apresentam diferenças na metilação de D-MeAsp, substituição de Mdhb por ácido D- ou L-metilaminoisobutírico ou alterações no ADDA ou D-Glu (Rinehart *et al.*, 1994). De forma idêntica às microcistinas, os isómeros 6Z-ADDA não possuem actividade tóxica.

As nodularinas são potentes promotores de tumores, devido ao seu efeito inibitório sobre as proteínas fosfatases 1, 2A e 3 (Eriksson *et al.*, 1990), mas inibem mais as PP1 e PP3 do que a PP2A (Honkanen *et al.*, 1994 *in* Rapala, 1998). Ohta e colaboradores (1994 *in* Henriksen, 1996) consideram que as nodularinas devem ser mesmo classificadas como carcinogéneos.

A grande capacidade inibidora das PP1 e PP2A evidenciada pelas microcistinas e nodularinas podem ter consequências a nível genético, metabólico e fisiológico em plantas e animais, uma vez que as proteínas fosfatases intervêm nos processos de regulação celular e do crescimento (Codd, 1998).

1.1.2 Neurotoxinas

Foram caracterizados três grupos quimicamente não relacionados de neurotoxinas : os alcalóides bloqueadores neuromusculares - anatoxina-a / homoanatoxina-a - o inibidor organofosforado da acetilcolinesterase - anatoxina-a(S) - e os bloqueadores dos canais de sódio - saxitoxina e neo-saxitoxina (tabela 1.1). A ingestão de doses letais de qualquer uma destas toxinas provoca a morte por paragem respiratória, mas a nível celular elas exercem a sua toxicidade de forma diferente.

A anatoxina-a e o seu homólogo homoanatoxina-a (=metileno-anatoxina-a) actuam como agentes bloqueadores da despolarização pós-sináptica a nível neuromuscular: ligam-se ao receptor da acetilcolina mas, como não são degradados pela acetilcolinesterase, levam a uma sobrestimulação e paralisia das células musculares (Carmichael, 1994); a anatoxina-a é cerca de oito vezes mais potente que a acetilcolina nicotínica (Carmichael, 1997). A DL_{50} da anatoxina-a para murganhos é de 250 $\mu g\ kg^{-1}$ (tabela 1.1) e a morte ocorre em poucos minutos. A anatoxina-a foi detectada pela primeira vez em florescências de *Anabaena flos-aquae* no Canadá (Gorham, 1964 *in* Carmichael, 1997), mas posteriormente registou- se em florescências, cianobactérias bênticas e culturas de cianobactérias na Escandinávia (Sivonen *et al.*, 1989), nas ilhas britânicas, em Itália e no Japão. Os géneros produtores de anatoxina-a actualmente conhecidos incluem *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* e *Microcystis* (ainda não confirmado segundo Codd, 1998). A única fonte natural de homoanatoxina-a são cianobactérias de água doce *Oscillatoria formosa* (Carmichael, 1992).

Na anatoxina-a(S), o sufixo (S) deriva do facto desta toxina causar hipersalivação nos ratinhos durante os bioensaios. A anatoxina-a(S) provoca inibição da acetilcolinesterase nas placas neuromusculares, evitando a degradação da acetilcolina, o que também acarreta sobrestimulação muscular (Carmichael, 1994). A anatoxina-a(S) foi isolada de *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii* na América do Norte, Dinamarca e Suécia (Henriksen, 1996).

A saxitoxina e a neosaxitoxina actuam por bloqueamento dos canais de sódio nos neurónios; impedem desse modo os impulsos nervosos e os músculos paralisam (Carmichael, 1994). Foram isoladas inicialmente a partir de *Aphanizomenon flos-aquae* no Canadá (Lam *et al.*, 1995), mas foram posteriormente detectadas em *Aphanizomenon* em Portugal (Ferreira *et al.*, 1995), *Anabaena circinalis* na Austrália (Humpage *et al.*, 1994 *in* Rapala, 1998) e na Dinamarca (Henriksen, 1996), *Lyngbya wollei* nos E.U.A. (Carmichael, 1997) e *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil (Lagos *et al.*, 1997 *in* Rapala, 1998).

As neurotoxinas saxitoxina e neosaxitoxina possuem propriedades químicas e fisiológicas similares às toxinas produzidas pelos dinoflagelados responsáveis por PSP ("paralytic shellfish poisoning"), isto é, intoxicação paralisante por moluscos.

Neurotoxinas não identificadas foram registadas em florescências e/ou culturas de *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix agardhii* (Henriksen, 1996) e, nas Caraíbas, em *Trichodesmium thiebautii* (Hawser *et al.*, 1991 *in* Codd & Beattie, 1991).

1.1.3 Dermotoxinas e endotoxinas lipopolissacáridas

As cianobactérias também produzem lipopolissacáridos (LPS); os lipopolissacáridos de *Microcystis* parecem ter apenas 10% da toxicidade dos produzidos por *Salmonella* (Raziuddin *et al.*, 1983). Estas endotoxinas encontram-se em várias espécies de cianobactérias e foram apontadas como causa de gastroenterites (Keleti *et al.*, 1979).

Novas toxinas cianobacterianas têm sido descobertas como, por exemplo, irritantes ao contacto produzidos por *Lyngbia majuscula* Gomont recolhida no Hawaii (Aimi *et al.*, 1990 *in* Codd & Beattie, 1991). De *Lyngbia majuscula* Gomont foram isolados três compostos causadores de dermatites e promotores de tumores (são activadores da quinase): aplysiatoxina, debromoaplysiatoxina e lyngbyatoxina A.

1.2 Intoxicações em humanos

Uma das primeiras referências às cianobactérias como possíveis causadoras de doença em humanos data de 1842 - Farre, numa apresentação para a Royal Microscopical Society, descreveu o caso clínico de uma mulher que se queixou de fortes dores abdominais após ter ingerido acidentalmente *Oscillatoria* (Hunter & Roberts, 1991).

O tipo de intoxicação provocado pelas cianobactérias depende da dose de toxina, da espécie envolvida e da via de entrada no organismo humano. As intoxicações podem ser agudas ou crónicas.

1.2.1 Intoxicações agudas

No caso de intoxicações agudas, as consequências podem ser gastrointestinais, respiratórias e dermatológicas. As intoxicações gastrointestinais ocorrem essencialmente com espécies dos géneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Aphanizomenon*, bem como com certas Oscillatoriaceae. Entre outros sintomas e sinais registam-se náuseas, vómitos, dores epigástricas e inflamação nasofaríngea. Estas intoxicações podem ser ocasionadas pela ingestão involuntária de água com cianobactérias tóxicas ou as suas toxinas, geralmente aquando do mergulho ou natação. Turner e colaboradores (1990 *in* Keevil, 1991) relataram a existência de problemas gastrointestinais e pulmonares em soldados ingleses que ingeriram cianobactérias tóxicas durante um treino. Mas os relatos de doenças em humanos provocadas pela ingestão acidental de cianobactérias tóxicas são raros. O mais frequente é a ingestão de cianotoxinas ocorrer aquando do uso de água de consumo. Também pode ocorrer por utilização de peixes ou moluscos contaminados, e é acompanhada por dores musculares intensas, vómitos, dificuldades respiratórias e escurecimento da urina. Vasconcelos (1995) investigou a acumulação e depuração de microcistina-LR em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, tendo verificado acumulação de microcistina-LR preferencialmente no hepatopâncreas; *Mytilus edulis* acumulam nodularina quando habitam águas estuarinas contendo *Nodularia spumigena* (Falconer *et al.*, 1992). A acumulação de microcistinas em fígados de salmão (Andersen *et al.*, 1993 *in* Codd, 1998) indicia também uma possibilidade de exposição via peixes de aquacultura. Magalhães & Azevedo (1998) detectaram

hepatotoxinas no fígado e órgãos viscerais de peixes da lagoa de Jacarepaguá (Rio de Janeiro, Brasil), três semanas após ter ocorrido uma florescência tóxica de *Microcystis aeruginosa*. Pensa-se que a ingestão de peixes contaminados por cianotoxinas tenha sido a causa da doença de Haff, comum na costa báltica antes da II Guerra Mundial (Berlin, 1948 *in* Keevil, 1991). Até os produtos vegetais poderão estar implicados na exposição às cianotoxinas, uma vez que a microcistina-LR pode penetrar nas folhas das plantas durante a irrigação, pois verificou-se que a aplicação tópica de microcistina-LR causa inibição da síntese foliar (Abe *et al.*, 1996 *in* Codd, 1998). Em 1985 a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* foi considerada na origem de uma grave intoxicação causadora de hepatoenterite em 140 crianças e 10 adultos na Austrália (Falconer, 1998).

A ingestão oral de cianotoxinas é dez vezes menos tóxica que a administração por via intraperitoneal em ratinhos.

Num Centro de Hemodiálise em Caruaru, Brasil, registou-se quarenta e quatro mortes entre os hemodialisados e todos os dados biológicos e químicos recolhidos apontam como sendo uma das principais causas de morte, senão mesmo a principal, a existência de microcistina na água de diálise (Carmichael *et al.*, 1996).

As intoxicações respiratórias por inalação de cianobactérias apresentam sintomas semelhantes aos da "febre dos fenos", com rinite, conjuntivite e dispneia. As intoxicações dermatológicas caracterizam-se pelo aparecimento de dermatites, conjuntivites, prurido generalizado e mesmo certos tipos de "queimadura".

Mas a ingestão de cianotoxinas dissolvidas na água em pequenas doses - exposição crónica - é bem mais provável.

1.2.2 Intoxicações crónicas

Falconer e colaboradores (1983) referem um aumento de problemas no fígado numa população que consumiu água de um reservatório com uma grande florescência de *M. aeruginosa*. As amostras de sangue de indivíduos, sujeitos a exposições crónicas a cianotoxinas, contêm níveis elevados de gama-glutamiltransferase, uma enzima cuja presença indica lesões hepáticas. A alta incidência de cancro do fígado em certas zonas da China tem

sido associada à permanência da exposição a toxinas cianobacterianas presentes na água potável que provém de origens superficiais infestadas de cianobactérias.

A MCYST-LR é encarada como um potente promotor de tumores, principalmente no fígado (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992 ; Falconer, 1991). Em experiências com ratos aos quais era administrado um extracto de *Microcystis* e nos quais tinham sido induzidos papilomas dérmicos, por aplicação de um carcinogéneo na pele, verificou-se um aumento significativo do peso dos tumores (Falconer, 1991). O mecanismo de acção das microcistinas na promoção de tumores, através da inibição de fosfatases específicas – proteínas fosfatases tipo 1, tipo 2A e tipo 3 é muito semelhante ao da caliculina-A e ao do ácido ocadaico, que é um dos mais poderosos promotores de tumores que se conhece (Falconer *et al.*, 1994).

Além disso, nos casos de exposição crónica, existem algumas evidências de genotoxicidade, uma vez que células humanas *in vitro* apresentam quebra clastogénica de cromossomas, e também um possível efeito mutagénico que poderá ser maior do que o das experiências clássicas com benzeno. Também foi sugerido que as cianotoxinas podem provocar toxicidade reprodutiva atendendo aos resultados de uma experiência com embriões de murganhos em que se obteve uma mortalidade de 33% (Kirpenko *et al.*, 1981 *in* Keevil, 1991).

1.3 Influência de factores ambientais na produção de cianotoxinas

A produção de cianotoxinas varia ao longo do ciclo de vida das estirpes tóxicas e quando são colocadas sob diferentes condições nutritivas / ambientais. Van der Westhuizen e Eloff (1985) verificaram que as células de *M. aeruginosa* apresentavam maior toxicidade no final da fase logarítmica do crescimento, quando cultivadas a 20 °C. A temperatura influencia a toxicidade, tendo van der Westhuizen e Eloff (1985) registado uma diminuição marcada da toxicidade para temperaturas superiores a 28 °C. A temperatura óptima de crescimento não coincidia com a óptima para a produção de toxinas, uma vez que a taxa de crescimento máxima foi obtida a 32 °C. Estes dois investigadores verificaram ainda nas suas experiências que, apesar da intensidade luminosa não exercer um efeito muito marcado na toxicidade, esta

tendia a ser menor com intensidades luminosas muito reduzidas ou muito elevadas. Hesse e colaboradores (1998), utilizando culturas de *M. aeruginosa* estirpe HUB 5-2-4, verificaram que a concentração de microcistina-LR era idêntica para toda a gama de intensidades luminosas utilizada (5 a 150 μmol m^{-2} s^{-1}), enquanto que a concentração de microcistina-RR era menor nas culturas com iluminação de 5 μmol m^{-2} s^{-1}.

Pelo contrário, Watanabe e colaboradores (1985) e Utkilen e Gjϕlme (1992) registaram uma alteração na produção de toxinas induzida pela intensidade luminosa. Watanabe e colaboradores (1985) encontraram uma reduzida toxicidade quando as culturas estagnantes de estirpes produtoras de microcistina-LR e–YR cresciam sob uma intensidade luminosa de 7,5 μmol m^{-2} s^{-1}, quando comparada com a toxicidade das culturas sujeitas a 30 ou 75 μmol m^{-2} s^{-1}. Utkilen e Gjϕlme (1992) obtiveram uma concentração máxima de microcistinas produzidas por *Microcystis aeruginosa*, em culturas contínuas, quando irradiadas com 40 μmol m^{-2} s^{-1} de radiação fotossinteticamente activa; para intensidades luminosas superiores verificava-se um decréscimo na toxicidade. Song e colaboradores (1998) obtiveram uma correlação negativa entre a produção de toxina por *M. viridis* e a intensidade luminosa. *Oscillatoria agardhii* produz maior quantidade de toxinas quando colocada a intensidades luminosas de 12 a 24 μmol m^{-2} s^{-1} e a concentração de desmetil-3-microcistina-RR também está dependente da concentração de fósforo e da temperatura (Sivonen, 1990). Rapala (1998) verificou que o coefeito luz-temperatura tinha um papel regulador importante no crescimento das estirpes de *Anabaena* sp. que estudou e na produção de microcistinas e anatoxina-a por parte destas.

Segundo van der Westhuizen e Eloff (1983) o pH influencia quer a taxa de crescimento quer a toxicidade de *Microcystis aeruginosa* UV-006. Esta estirpe crescia melhor a pH 9, onde atingia uma taxa de crescimento de 0,60 d^{-1}. A toxicidade era maior a pH elevados ou reduzidos.

O fósforo parece ser um factor limitante do crescimento e da produção de toxina em *Nodularia spumigena* (Lehtimäki *et al.*, 1994). Codd e colaboradores (1989 *in* Lehtimäki *et al.*, 1994) verificaram que a privação de fósforo não influenciava a toxicidade em *M. aeruginosa*, mas, pelo contrário, Watanabe e colaboradores (1985) registaram uma pequena diminuição na toxicidade doutra estirpe de *M. aeruginosa*, quando crescia em meio com reduzida concentração de fósforo. Sivonen (1990) obteve para *Oscillatoria agardhii* uma

diminuição na toxicidade somente quando a concentração de fósforo era de 0,1 mg L^{-1}; com concentrações de fósforo de 0,4 a 5,5 mg L^{-1} a produção de toxinas não era afectada.

Watanabe e colaboradores (1985) também demonstraram existirem diferenças na toxicidade em culturas com diferentes concentrações de nitrato. Lukač e Aegerter (1993 *in* Orr & Jones, 1998) encontraram uma redução de 25% na concentração de microcistina quando a taxa de crescimento diminuía cerca de 25% em resultado de um crescimento com quantidade limitante de elementos traço.

1.4 Libertação e degradação das cianotoxinas

A libertação de cianotoxinas para a água só ocorre se houver alteração na permeabilidade celular, o que pode ser resultante de envelhecimento das células (Berg *et al.*, 1987), de lise provocada por factores físico-químicos ou por bactérias. Shi e colaboradores (1994), no estudo que realizaram com células de *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, verificaram que as microcistinas se localizavam principalmente na área do tilacóide e no nucleóide, mas também detectaram pequenas quantidades de toxina na parede celular, o que, segundo estes autores, indicia que poderá haver libertação de microcistinas em células intactas. Na espécie *Nodularia spumigena*, a nodularina apresenta uma distribuição na célula semelhante à observada para as microcistinas em *M. aeruginosa* (Shi *et al.*, 1994).

As cianotoxinas são química e fisicamente muito estáveis. Uma degradação química completa só é possível com tratamentos drásticos com, por exemplo, ácido 6N-hidroxiclórico ou ácido trifluoroacético com refluxo (Harada, 1996). Harada (1996) estimou uma vida média para microcistinas de 3 semanas em solução aquosa, mesmo quando sujeitas a pH 1 e a uma temperatura de 40 °C. Estas toxinas também resistiam a hidrólise enzimática por tripsina. Mas os trabalhos já realizados sobre degradação de cianotoxinas sugerem que estas podem persistir ou degradar-se, dependendo das condições ambientais e das populações bacterianas endémicas a que são sujeitas.

Jones e colaboradores (1994) verificaram que, adicionando microcistina-LR numa concentração de 1 mg L^{-1} a águas naturais (com uma microflora própria), a degradação

começava dentro de 2-8 dias. A duração desta fase lag é semelhante à observada em estudos de biodegradação de outras toxinas e poluentes. Mas, se a concentração de MCYST-LR fosse superior a 1 mg L^{-1} ocorria uma fase inicial de remoção que podia demorar até 3 semanas (em vez de uma fase lag distinta), antes de se verificar uma degradação rápida, superior a 95% em 3-4 dias. A fase lag não ocorria se fizessem re-adição de MCYST-LR a águas onde previamente tinha ocorrido degradação desta toxina. Estes investigadores isolaram destas águas superficiais quer culturas bacterianas mistas quer estirpes isoladas capazes de degradar microcistinas. Uma das estirpes bacterianas isoladas, identificada erradamente como *Pseudomonas* sp., possuía capacidade degradativa para microcistina-LR e –RR, mas não era capaz de biodegradar nodularina. Posteriormente Bourne e colaboradores (1996) verificaram tratar-se de uma estirpe de *Sphingomonas* sp., produtora de pelo menos três enzimas intracelulares hidrolíticas importantes no processo de degradação de microcistinas.

Cousins e colaboradores (1996), numa experiência em que adicionaram microcistina-LR a água de uma albufeira, obtiveram uma degradação rápida, com a concentração de microcistina a atingir um valor inferior ao limite de detecção do método analítico utilizado em 7 dias. Os resultados obtidos por Cousins e colaboradores (1996) sugerem que a cadeia lateral do ADDA será o local onde se inicia a biodegradação da microcistina-LR.

Keijola e colaboradores (1988) estudaram a remoção de cianotoxinas em filtros lentos de areia, tendo verificado que a biodegradação das hepatotoxinas variava com os diferentes filtros de acordo com a idade e as condições do biofilme. No entanto, Kirivanta e colaboradores (1991) obtiveram uma degradação lenta, durante 2-3 meses, de hepatotoxinas e não encontraram microorganismos capazes de degradarem estas toxinas na água do rio Vantaanjaki (Finlândia) que utilizaram como inóculo.

Rapala e colaboradores (1994) obtiveram uma degradação mais rápida de hepatotoxinas quando inoculavam água e sedimentos retirados de lagos eutróficos, durante ou após uma florescência. A microcistina-LR e a sua variante [D-Asp^3]-MCYST-LR não eram detectadas 4 dias após a adição de água ou diferentes sedimentos desses lagos. [Dha^7]-MCYST-RR e [D-Asp^3, Dha^7]-MCYST-RR foram detectadas após uma semana de incubação. Nos controlos (sem sedimento) ou quando utilizavam sedimentos esterilizados, as toxinas permaneciam detectáveis até ao final da experiência (14-25 dias).

Berg e colaboradores (1987) obtiveram 90% de biodegradação de microcistinas libertadas após lise de um bloom de *M. aeruginosa*, após 40 dias de incubação laboratorial.

Segundo Jones e Orr (1994) no lago Centenary (Austrália) verificou-se persistência de microcistinas em níveis elevados (1,3 a 1,8 $\mu g\ mL^{-1}$) durante 9 dias, após os quais se iniciou uma degradação bifásica com uma fase rápida de 3 dias (90 a 95% da degradação, correspondente a aproximadamente 0,5 $\mu g\ mL^{-1}\ d^{-1}$) e uma fase lenta que se prolongou até ao final do estudo (21 dias). Lahti e colaboradores (1997) detectaram microcistina-LR no lago Tuusulanjärvi (Finlândia) no final de uma florescência dominada por *Microcystis* , tendo verificado que o período de persistência foi de 30 dias para a microcistina dissolvida e 15 dias para a toxina existente no material particulado. Lahti e colaboradores (1998) isolaram 100 estirpes de bactérias da água e dos sedimentos de dois lagos finlandeses e testaram a sua capacidade para degradar cianotoxinas : 70 conseguiam degradar microcistinas e 3 estirpes degradavam nodularina. No estudo de degradação de microcistinas realizado por Lam e colaboradores (1995) foi necessário 1 semana para 90% da toxina ser removida e 2 semanas para se obter uma redução de 99%.

Luz solar natural ou luz fluorescente não destrói as microcistinas quando estas se encontram dissolvidas em água destilada, mas ocorre fotodegradação quando pigmentos algais em concentrações elevadas estão presentes no meio (Tsuji *et al.*, 1994). Welker e Steinberg (1999) estudaram o efeito da presença de substâncias húmicas na degradação fotoquímica de microcistinas cianobacterianas. Quando exposta a luz solar natural, a concentração de microcistina-LR, -YR e -RR diminuía significativamente (taxa de degradação de 0,4 $\mu g\ L^{-1}\ h^{-1}$) na presença de substâncias húmicas e permanecia constante se utilizassem água pura. Após 8 horas de irradiação a concentração de microcistina-LR, -YR e -RR era, respectivamente, 55% ±4, 53% ±3 e 44% ±5 da concentração inicial. Diferentes concentrações de substâncias húmicas não provocavam diferenças na eficiência da degradação.

Robertson e colaboradores (1997 *in* Welker e Steinberg, 1999) obtiveram destruição rápida (em menos de 45 minutos) de microcistinas em solução (15 a 80 $\mu g\ L^{-1}$) através de irradiação com raios ultravioletas na presença de dióxido de titânio. A degradação fotoquímica poderá ser mais eficaz que a degradação microbiana, uma vez que si inicia logo após a libertação das toxinas para a água sem qualquer fase lag, mas só deverá ser significativa nas camadas superficiais da massa de água.

1.5 Remoção das cianotoxinas / tratamento da água

Os seres humanos podem estar regularmente expostos a dosagens subletais de cianotoxinas se as águas de consumo forem derivadas de lagos e reservatórios contaminados. As Estações de Tratamento de Água (ETA) existentes normalmente estão apetrechadas para a remoção de impurezas suspensas como material argiloso, partículas de quartzo, substâncias orgânicas coloidais, bactérias, etc., possuindo sistemas de coagulação – floculação, sedimentação, filtração e desinfecção (na maior parte dos casos por cloração) - Hoffmann (1976) ; a remoção de cianotoxinas não foi considerada aquando da elaboração do projecto da ETA e é portanto pouco eficiente.

Em 1993 a Direcção Geral do Ambiente (Portugal) realizou uma auditoria a trinta das principais Estações de Tratamento de Água do país, tendo verificado que 30% se encontravam a funcionar inadequadamente (Vieira, 1994). A eficiência de algumas ETA portuguesas é de apenas 24%, encontrando-se grandes densidades de cianobactérias na água que chega à torneira dos consumidores – de 7,1 x 10^2 células mL^{-1} a 1,2 x 10^5 células mL^{-1}, com *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis mediterranea* como espécies dominantes (Oliveira & Monteiro, 1993). Falconer e colaboradores (1994) consideram que o nível máximo admissível (VMA) de cianotoxinas na água de consumo humano deverá ser aproximadamente 1,0 $\mu g\ L^{-1}$de microcistinas / nodularinas, por comparação com os resultados que obtiveram em porcos (possuem um funcionamento do tracto gastrointestinal, fígado e rins muito semelhante ao humano). Kuiper-Goodman e colaboradores (1994 *in* Carmichael, 1997) apontaram um VMA guia de 0,5 $\mu g\ L^{-1}$ para microcistina-LR e 1,0 $\mu g\ L^{-1}$ para microcistinas totais. Ueno e colegas (1996) propuseram um valor ainda inferior (0,01 $\mu g\ L^{-1}$) baseado nos níveis de microcistinas que encontraram nas águas de consumo nas províncias chinesas Jian Su e Guangxi, onde as taxas de cancro primário do fígado são elevadas. Mais recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) apontou um VMA provisório de 1,0 $\mu g\ L^{-1}$ (OMS, 1998 *in* Falconer, 1999).

Nicholson e colaboradores (1993) conseguiram obter destruição de hepatotoxinas produzidas por *M. aeruginosa* e *Nodularia spumigena* por cloração se ao fim de 30 minutos ainda persistisse 0,5 $mg\ L^{-1}$ de cloro residual (mas o uso de doses elevadas de cloro acarreta formação de compostos halogenados). As microcistinas e a nodularina eram rapidamente destruídas com soluções aquosas de cloro e hipoclorito de cálcio, mas a remoção era menos

eficiente com hipoclorito de sódio. Tsuji e colaboradores (1997) obtiveram resultados semelhantes, mas Jones e colaboradores (1993) consideraram uma dose de cloro residual superior, aproximadamente 1,0 mg L^{-1}. Infelizmente na maioria dos casos o cloro é utilizado somente como bactericida, o que não implica uma concentração de cloro tão elevada. Por isso, o mais provável é que a eficiência do tratamento desta água seja reduzida. Além disso, a neurotoxina produzida por *Anabaena circinalis* não é destruída por cloração (Nicholson *et al.*, 1993).

Toxinas de cianobactérias, tanto hepatotoxinas como neurotoxinas, podem ser removidas da água utilizando-se carvão activado (Hoffmann, 1976; Keijola *et al.*, 1988), nomeadamente carvão activado granular, que é bastante eficiente; o carvão activado em pó remove pequenas quantidades de microcistinas (Jones *et al.*, 1993; Donati *et al.*, 1994). Segundo Keijola e colaboradores (1988) o processo convencional de floculação com sulfato de alumínio, filtração em filtros de areia e cloração só permite uma redução na quantidade de microcistinas na ordem dos 11%. Estes investigadores conseguiam remover mais de 90% da toxina, existente na *M. aeruginosa* recolhida de uma florescência, através de uma filtração em areia e carvão activado (20 mg L^{-1}), após uma pré-ozonização (1,0 mg O_3 L^{-1}). Jones e colaboradores (1993) obtiveram uma diminuição na concentração inicial de microcistina de 5 µg L^{-1} para 1 µg L^{-1}, após 30 minutos, utilizando uma dose de carvão activado em pó de 30 mg L^{-1}. Mas numa ETA a presença de matéria orgânica reduz a capacidade do carvão activado para adsorver cianotoxinas. Lambert e colaboradores (1996) encontraram níveis residuais de microcistina-LR de 0,1 µg L^{-1} na água, após o tratamento desta em duas ETA canadianas cujos esquemas de tratamento incluem adsorção por carvão activado granular.

Keijola e colaboradores (1988) estudaram a remoção de cianotoxinas em filtros lentos de areia e verificaram existir uma redução de 70-80% de microcistinas e anatoxina-a dissolvidas na água. Lahti e colaboradores (1996) conseguiram obter maior remoção de microcistinas utilizando colunas de solo ou sedimentos, mas também utilizaram concentrações de microcistinas muito superiores às usadas nas experiências de Keijola e colaboradores (1988).

Nicholson e colaboradores (1993) verificaram que a taxa de oxidação de MCYST-LR, dissolvida em água destilada, com ozono numa dose de 0,1 mg L^{-1} é extremamente rápida, com 99% de remoção da toxina em 15 segundos, não se formando novos produtos tóxicos. Mas quando utilizavam material algal congelado e ressuspendido em água destilada, o tempo de contacto necessário já era de 5 minutos.

Hiirsvirta e Lahti (1990) obtiveram através de uma pré-ozonização com 0,2 mg O_3 L^{-1}, uma remoção de 22 ou 62% de hepatotoxinas produzidas por *M. aeruginosa*, conforme a concentração inicial era, respectivamente, 55 ou 35 µg L^{-1}. Com uma dose de 1 mg O_3 L^{-1} a remoção de microcistinas era total para ambas as concentrações iniciais utilizadas. Obtiveram resultados semelhantes com *Oscillatoria*.

Também se poderá obter uma eficiente remoção de cianotoxinas utilizando permanganato. É um forte oxidante usado nas ETA para oxidação do ferro e do manganésio, permitindo também solucionar os problemas de odor relacionados com fitoplâncton. Uma dose de 1 mg L^{-1} de permanganato de potássio remove 95% de MCYST-LR a uma concentração de 200 µg L^{-1}, após 30 minutos de contacto (Rositano & Nicholson, 1994 *in* Drikas, 1994).

O tratamento com carvão activado é dispendioso, e muitas ETA nem sequer o possuem incorporado no seu sistema de tratamento, mas, combinado com ozonização, pode ser a solução a curto prazo para este problema de contaminação. Aliás, permite simultaneamente a remoção de geosmina e 2-metil-isoborneol, substâncias também produzidas pelas cianobactérias (e outros organismos como Actinomycetes) e que podem provocar cheiro e sabor a "mofo" na água de consumo.

Lawton e colaboradores (1998) testaram a eficiência de aparelhos de filtração domésticos (com carvão activado e resinas de permuta iónica) na remoção de cianobactérias. Verificaram que a remoção atingia 60% no caso de cianobactérias filamentosas como *Oscillatoria* sp. e *Anabaena* sp., mas no caso de *Microcystis* sp. era muito menor (10%). Os filtros testados demonstraram capacidade para reduzir os níveis de microcistina-LR previamente adicionada à água (30 a 60% consoante o tipo de filtro).

1.6 Âmbito e objectivos do trabalho

O âmbito deste trabalho insere-se na problemática da qualidade da água para consumo humano. Com o presente trabalho pretendeu-se determinar o efeito dos factores :

- intensidade luminosa e
- temperatura

na libertação de microcistinas para a água, produzidas pela estirpe tóxica IZANCYA2 da espécie *Microcystis aeruginosa*, assim como determinar a persistência dessa exo-MCYST e restante endo-MCYST ao longo de 28 dias.

Pretendeu-se ainda averiguar se a adição do coagulante / floculante sulfato de alumínio (utilizado na ETA piloto de Águas do Douro e Paiva, S.A.) e de dois outros floculantes utilizados no tratamento da água na ETA de Marco de Canaveses (Locron S e Labufloc C 1210) ao meio de cultura, interferia na libertação e degradação das microcistinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi efectuada no Laboratório de Ecotoxicologia pertencente ao Departamento de Zoologia e Antropologia, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

2.1 Cultura da estirpe de *Microcystis aeruginosa* IZANCYA2

Neste trabalho utilizaram-se culturas de uma estirpe tóxica de *Microcystis aeruginosa*, designada por IZANCYA2, que faz parte da colecção existente no Departamento de Zoologia e Antropologia da F.C.U.P.. Esta estirpe foi isolada da Lagoa de Mira, por Vasconcelos, em 1991 (Vasconcelos, 1995) e, desde então, mantida em meio líquido. Inocularam-se 50 mL desta cultura stock em matrazes de Erlenmeyer de 1L contendo 500 mL de meio Z8 (Kotai, 1972). Quando estas pré-culturas atingiram a fase exponencial foram transferidas para balões de 6 L com 4 L de meio Z8 .

Os recipientes de cultura foram mantidos numa sala climatizada com uma temperatura de 20±1°C, iluminada com lâmpadas fluorescentes Philips TLD 18W/54 e Sylvania GRO-LUX F36W/GRO. O fotoperíodo era de 14 horas luz e a intensidade luminosa média (n=6) de 5,75±0,97 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ (fotómetro Quantum Sensor SKP 216, Skye Instruments, quantifica radiações com comprimentos de onda de 550 nm a 750 nm aproximadamente). As culturas foram agitadas por meio de um sistema de arejamento que proporcionava também um fluxo contínuo de ar filtrado (através de filtros 0,4 μm, Schleicher & Schuell, Alemanha). Para a preparação do meio de cultura utilizou-se água ultra pura Milli-Q e reagentes Merck.

Os ensaios com diferentes intensidades luminosas, diferentes temperaturas e adição de coagulantes / floculantes – sulfato de alumínio, Locron S e Labufloc C 1210 – foram realizados quando as culturas se encontravam na fase exponencial de crescimento. Van der Westhuizen & Eloff (1983) e Watanabe e colaboradores (1989), em trabalhos separados,

verificaram que as células de *M. aeruginosa* produzidas no final da fase logarítmica de crescimento eram as mais tóxicas. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2 Intensidade luminosa

Colocaram-se matrazes de Erlenmeyer de 1L contendo 500 mL da cultura de IZANCYA2, com uma densidade celular de $1{,}308 \times 10^7$ células mL^{-1}, a 4 diferentes intensidades luminosas (passíveis de reproduzirem aquelas a que as cianobactérias/ cianotoxinas estão sujeitas quer nas massas de água superficiais quer nos tanques durante o tratamento da água nas ETA) e na obscuridade, durante 28 dias. Os valores médios (n=6) das diferentes intensidades luminosas foram 21,12±2,57, 5,75±0,97, 2,55±0,25 e 1,03±0,16 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$. As diferentes intensidades luminosas foram obtidas variando a localização dos frascos em relação à fonte luminosa.

As restantes condições ambientais eram iguais às utilizadas na cultura de IZANCYA2 (tabela 2.1), com excepção da não existência de arejamento nesta experiência.

Duas vezes por semana, fez-se uma recolha de alíquotas de 50 mL, filtraram-se através de um filtro Whatman GF/C (0,45 μm). O filtro e o filtrado foram congelados a –20°C, separadamente, até se efectuar a extracção das toxinas.

Recolheram-se também nesses dias alíquotas (com cerca de 1 mL) para estimativa da densidade celular das culturas. Estas alíquotas foram fixadas com uma solução de lugol e conservadas ao abrigo da luz até à sua quantificação. A densidade celular foi avaliada em cada amostra através de seis contagens efectuadas ao microscópio óptico (Leitz, Alemanha) num hematocitómetro Neubauer.

2.3 Temperatura

Matrazes de Erlenmeyer de 1L com 500 mL da cultura de IZANCYA2, com uma densidade celular de $9{,}280 \times 10^6$ células mL^{-1}, foram incubados em banhos termostatizados que se encontravam a 4 temperaturas diferentes : 21±0,5°C, 23±0,5°C, 26±0,5°C e 28±0,5°C . As restantes condições ambientais eram iguais às usadas na cultura de IZANCYA2 (tabela 2.1), excepto não se efectuar arejamento nesta experiência.

As temperaturas escolhidas encontram-se dentro da gama de temperaturas a que as cianobactérias e suas toxinas são sujeitas quer durante a permanência na massa de água, nos dias de maior insolação (Pereira, 1998), quer nos tanques de tratamento das ETA, onde sobre um volume de água relativamente pequeno incide uma grande irradiação solar.

Duas vezes por semana, realizou-se também uma recolha de alíquotas de 50 mL, filtraram-se através de um filtro Whatman GF/C (0,45 μm). O filtro e o filtrado foram congelados a –20°C, separadamente, até se efectuar a extracção das toxinas.

Para a determinação da densidade celular das culturas nesses dias, seguiu-se o procedimento descrito no ensaio anterior.

2.4 Adição de coagulantes e floculantes

Foram escolhidos os coagulantes / floculantes sulfato de alumínio, Locron S e Labufloc C 1210. O sulfato de alumínio, para além de ser usado como coagulante/floculante em esquemas de tratamento de água para consumo humano (tendo sido testado na ETA piloto da Águas do Douro e Paiva, S.A. – apêndice 1), também tem sido utilizado para reduzir o nível de fosfatos em águas eutrofizadas.

O Locron S é um floculante à base de hidroxicloreto de alumínio. Devido à sua estrutura – complexo polinuclear de alumínio – o Locron S forma aglomerados de flocos mais rapidamente do que os sais monoméricos solúveis de alumínio, tais como o sulfato de alumínio. O Labufloc C 1210 é um polímero orgânico de cadeia longa, utilizado para flocular as partículas orgânicas e inorgânicas das lamas, combinadas com sais de ferro e alumínio e

outros coagulantes. O Locron S e o Labufloc C 1210 (Aqua Ambiente) foram gentilmente cedidos pelo Sr. Rui Valedoleiros da ETA do Marco de Canaveses, onde são utilizados em sequência (apêndice 1).

As captações de água para a ETA do Marco de Canaveses e para a ETA piloto da Águas do Douro e Paiva, S.A. estão localizadas na albufeira do Torrão (rio Tâmega) e de Crestuma-Lever (rio Douro), respectivamente, onde se têm registado várias florescências de cianobactérias tóxicas (Vasconcelos *et al.*, 1993).

Nos ensaios com estes coagulantes / floculantes as concentrações utilizadas e os tempos de exposição aos produtos foram escolhidos de forma a abrangerem os utilizados na ETA piloto de Águas do Douro e Paiva, S.A. e ETA de Marco de Canaveses. Na preparação das soluções prévias obedeceu-se à dosagem recomendada pelas empresas distribuidoras destes produtos.

2.4.1 Sulfato de alumínio

A matrazes de Erlenmeyer de 1L com 500 mL da cultura de IZANCYA2, com uma densidade celular de 10^6 células mL^{-1}, foi adicionada solução de sulfato de alumínio/água a 1% (p/v) de forma a se obterem concentrações finais de 30, 60 e 90 mg L^{-1} (tabela 2.1). No início desta experiência e após 20 e 30 minutos, respectivamente, retiraram-se 100 mL de cada matraz e centrifugaram-se durante 10 minutos a 5000 rpm (centrifugadora 3/15, Sigma). Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 10 mL de metanol a 100%. O sobrenadante e o sedimento foram congelados a –20°C, separadamente, até se efectuar a extracção das toxinas.

Aos 0, 20 e 30 minutos também se recolheram alíquotas (cerca de 1 mL) para determinação da densidade celular.

Durante a experiência o conteúdo dos matrazes foi sujeito a agitação magnética.

2.4.2 Locron S e Labufloc C 1210

A matrazes de Erlenmeyer de 1L com 500 mL da cultura de IZANCYA2, com uma densidade celular de 10^6 células mL^{-1}, foi adicionada solução de Locron S/água a 3% (p/v)

de forma a se obterem concentrações finais de 50, 75 e 100 mg L^{-1} de Locron S. Retiraram-se alíquotas de 100 mL para centrifugar. Após 10 minutos retiraram-se novamente amostras de 100 mL para centrifugação e adicionou-se solução de Labufloc C 1210/água a 0,07% (p/v) no volume necessário para a concentração final deste floculante ser de 50 mg L^{-1} (tabela 2.1). Dez e vinte minutos após a adição deste último floculante voltou-se a retirar alíquotas para centrifugação. Todas as alíquotas foram centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm. Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 10 mL de metanol a 100%. O sobrenadante e o sedimento foram congelados a –20°C, separadamente, até se efectuar a extracção das toxinas.

Aos 0, 10, 20 e 30 minutos também se recolheram alíquotas (cerca de 1 mL) para determinação da densidade celular.

Durante a experiência o conteúdo dos matrazes foi sujeito a agitação magnética como no ensaio 2.4.1 .

Tabela 2.1 – Resumo das condições experimentais

Ensaio	Intensidade luminosa (μmol m^{-2} s^{-1})	Temperatura (°C)	Sulfato de alumínio (mg L^{-1})	Locron S (mg L^{-1})	Labufloc C 1210 (mg L^{-1})
Intensidade luminosa	0; 1,03; 2,55; 5,75; 21,12	20	-	-	-
Temperatura	5,75	21;23;26;28	-	-	-
Sulfato de alumínio	5,75	20	30;60;90	-	-
Locron S + Labufloc C 1210	5,75	20	-	50;75;100	50

2.5 Extracção das toxinas

2.5.1 Intensidade luminosa / temperatura

Os filtros, obtidos nos tratamentos anteriores, foram macerados num almofariz com metanol a 100% (10 mL por filtro) e, posteriormente, colocados em tubos plásticos devidamente identificados. Esta solução foi então submetida à acção de ultra-sons num

sonicador (VibraCell, Sonics & Materials Inc., E.U.A.) durante cerca de 30-40 segundos. Este procedimento provoca lise das células cianobacterianas e consequente libertação das suas toxinas, sem sofrerem alteração (Meriluoto & Ericksson, 1988). Seguiu-se uma centrifugação durante 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e repetiu-se o processo de extracção com o sedimento. Combinaram-se os sobrenadantes e adicionou-se água ultra pura Milli-Q até esta perfazer 80% do volume total. Meriluoto e Eriksson (1988) fizeram fraccionamento de células de estirpes tóxicas de *M. aeruginosa* por homogeneização e ultracentrifugação tendo verificado que a toxina estava presente na fracção citosol e não ligada a estruturas membranares, o que facilita a extracção.

Fez-se passar cada amostra numa coluna Bond-Elut C18 (Waters Corporation, E.U.A.), com 500mg de gel de sílica octadesyl – ODS – após activação da coluna com 10 mL de metanol a 100% e 50 mL de água ultra pura Milli-Q. Após a passagem da amostra lavou-se a coluna com 50 mL de água ultra pura Milli-Q e 50 mL de metanol/água a 20% (v/v) rejeitando-se as soluções. A fracção tóxica foi então recuperada com 20 mL de metanol a 100%. Esta solução foi colocada a evaporar completamente a 40°C num N-Evap Analitical Evaporater (Organomation Associates Inc., E.U.A.). O resíduo foi ressuspendido em 1 mL de acetonitrilo/água (50/50, v/v) e colocado em tubos Ependorfs, devidamente etiquetados, a –20°C, até posterior detecção e quantificação das toxinas.

Para extracção das toxinas eventualmente existentes nos filtrados fizeram-se passar os filtrados na coluna Bond-Elut C18, previamente activada, e seguiu-se o procedimento posterior descrito para os filtros.

2.5.2 Adição de coagulantes e floculantes

Os sedimentos com metanol a 100% foram sonicadas por um período de 30-40 segundos (Sonicador VibraCell, Sonics & Materials Inc., E.U.A.). Fez-se depois uma filtração com filtros FP 030/3 (0,2 μm ; Schleicher & Schuell, Alemanha), para remoção dos restos celulares, e adicionou-se água ultra pura Milli-Q até esta perfazer 80% do volume total. Passaram-se essas soluções na coluna Bond-Elut C18, previamente activada, e seguiu-se o procedimento posterior descrito em 2.5.1 .

Para os sobrenadantes utilizou-se o método descrito para os filtrados em 2.5.1 .

2.6 Detecção e quantificação das toxinas por HPLC

As amostras foram agitadas num Vortex (Top Mix 11118, Bioblock Scientific) durante um minuto e filtradas através de filtros Spartan 3/30 com porosidade 0,2 μm (Schleicher & Schuell, Alemanha) antes de serem injectadas no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) Merck Hitachi, com um Diode Array Detector a 238 nm.

O sistema de HPLC utilizado é composto por LaChron Autosampler L-7200, Lachron Pump L-7100, Lachron Diode Array Detector L-7450 e Interface D-7000. Utilizou-se uma coluna SpherisOrb S10 ODS2 25 cm x 4,6 mm e uma fase móvel constituída por acetonitrilo/ acetato de amónio 0,01M (26/74, v/v). Henriksen (1996) conseguiu a separação de microcistina-LR, -RR, -YR, [D-Asp^3]-LR, [Dha^7]-LR, [D-Asp^3]-RR e [Dha^7]-RR utilizando acetonitrilo e acetato de amónio como solventes.

A lavagem do sistema foi efectuada com metanol/água (50/50, v/v). Para a preparação destas soluções utilizou-se água ultra pura Milli-Q. O solvente acetato de amónio 0,01M e a solução metanol/água foram previamente filtrados (utilizaram-se, respectivamente, GN-6 Metricel Grid 0,45 μm e Hidrophilic Polypropylene Membrane Filters GH-Polydro 0,2 μm, da Gelman Sciences) e desgasificados durante 30 minutos num banho de ultra-sons (Bandelin Sonorex R_K 100H). Fizeram-se injecções de 100 μL com um fluxo de 1 mL min^{-1}; o tempo de corrida foi de 30 minutos.

Nos cromatogramas obtidos foi analisado o espectro de cada amostra entre 220 e 260 nm. Picos possuindo um espectro típico com absorção máxima a 238 ou 240 nm foram considerados como microcistinas. A quantificação de MCYST foi obtida através da relação linear entre as áreas dos picos a 238 ou 240 nm e a quantidade de toxina padrão injectada; utilizou-se uma curva de calibração obtida por várias injecções de diferentes concentrações da toxina padrão MCYST-LR (Sigma, pureza aproximadamente 95%), no mesmo sistema de HPLC e nas mesmas condições de cromatografia. O tempo de retenção da toxina padrão MCYST-LR era de 6,7 minutos. A equação da curva de calibração era $A = 1{,}285 \times 10^{-6}\ C - 8{,}999 \times 10^{-14}\ C^2 + 9{,}024 \times 10^{-21}\ C^3$, em que A é a área e C a concentração ($R^2 = 0{,}9898$; n=4) – ver apêndice 2.

2.7 Análise dos dados

A maior parte das microcistinas detectadas na análise por HPLC não possuía um tempo de retenção coincidente com o padrão de MCYST-LR utilizado. Na impossibilidade de se identificar as microcistinas e/ou suas variantes produzidas / libertadas por IZANCYA2 ao longo do tempo de incubação nas experiências realizadas, por falta dos padrões necessários, as diferentes microcistinas detectadas foram quantificadas como MCYST-LR equivalentes. As microcistinas detectadas, nos filtrados e nos sobrenadantes, foram divididas em três grupos, de acordo com o respectivo tempo de retenção, e serão designadas por microcistina 1 (2,5 min ±15%), microcistina 2 (3,5 min ±15%) e microcistina-LR (6,7 min ±15%).

Os resultados da análise quantitativa de microcistinas são apresentados sob três formas: concentração de microcistinas na cultura (correspondente à concentração de microcistinas no filtro e no filtrado, expressa em μg MCYST mL^{-1} cultura), concentração de microcistinas no filtrado ou sobrenadante (μg MCYST mL^{-1} filtrado ou sobrenadante), quantidade de microcistina por célula (fg MCYST $célula^{-1}$) e taxa de libertação / degradação de microcistinas (μg MCYST mL^{-1} filtrado ou sobrenadante d^{-1}). Optou-se por determinar a quantidade de toxina por célula em detrimento do peso seco, porque este pode variar com alterações de irradiação ou à medida que a concentração de nutrientes no meio de cultura se vai tornando limitante (Orr e Jones, 1998). A taxa de crescimento (μ_c) e a taxa de libertação/degradação de microcistinas (μ_{MCYST}) foram calculadas de acordo com as equações seguintes :

$$\mu_c = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \qquad \mu_{MCYST} = \frac{MCYST_n - MCYST_0}{t_n}$$

em que :

t_n – tempo decorrido entre o início do ensaio e a medição

N_0 – densidade celular inicial

N_n – densidade celular no tempo t_n

$MCYST_0$ – concentração inicial de microcistinas no filtrado ou sobrenadante

$MCYST_n$ – concentração de microcistinas no filtrado ou sobrenadante no tempo t_n

Efectuou-se uma análise de correlação entre a taxa de crescimento (μ_c) e a taxa de libertação/degradação de microcistinas (μ_{MCYST}) de forma a determinar o grau de relacionamento linear entre estas variáveis.

Aos valores obtidos para as variáveis densidade celular, concentração de MCYST na cultura e quantidade de MCYST por célula aplicou-se um teste de análise da variância univariada (ANOVA) para medições repetidas. Os valores de concentração de MCYST na cultura e quantidade de MCYST por célula obtidos na experiência com diferentes intensidades luminosas, os valores de concentração de MCYST na cultura referentes à experiência com diferentes temperaturas e os valores de densidade celular obtidos nas experiências com diferentes concentrações de sulfato de alumínio e de Locron S foram logaritmizados por não possuírem uma distribuição Normal. A Normalidade dos dados foi verificada através do teste Kolmogorov-Smirnov. Como a análise da variância univariada também impõe restrições à matriz de variâncias e covariâncias (deve possuir simetria composta ou esfericidade), efectuou-se o teste-F "θ-ajustado" Huynh e Feldt, que, de entre os testes univariados com graus de liberdade ajustados, é o que providencia melhores resultados (Polidoro, 1996). Por isso, apresentam-se tabelas ANOVA calculadas a partir das suposições usuais e tabelas ANOVA com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" Huynh e Feldt. As diferenças foram consideradas não significativas quando $p \geq 0,05$, significativas quando $0,01 \leq p < 0,05$, muito significativas quando $0,001 \leq p < 0,01$ e altamente significativas quando $p < 0,001$.

Utilizou-se o teste Duncan para comparações múltiplas, com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) - Guimarães & Cabral, 1997

A análise estatística foi efectuada no programa Statistica for Windows, versão 4.5 (Microsoft Inc., 1993).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Intensidade luminosa

Verificou-se, para todas as intensidades luminosas testadas, um decréscimo na densidade celular nos primeiros quatro dias do período de incubação (figura 3.1). Esta diminuição da densidade celular poderá ser atribuída à interrupção do arejamento e da agitação, a que as cianobactérias estavam sujeitas na cultura prévia. Sem arejamento a quantidade de dióxido de carbono poderia ser insuficiente, apesar de as cianobactérias estarem sujeitas a 10 horas de obscuridade diárias. No entanto, um arejamento do meio causaria evaporação de água e, consequentemente, uma sobrestimação da concentração de microcistinas no meio.

A análise da variância para a densidade celular revelou diferenças altamente significativas entre as intensidades luminosas testadas, entre os tempos de incubação e para a interacção intensidade luminosa x tempo de incubação (tabela 3.1). As diferenças nas médias são significativas a partir do dia 12, inclusive ($p< 0,05$).

Tabela 3.1 – Tabela ANOVA para os dados da densidade celular calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects; WS – within subjects; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Intensidade luminosa	4	9,73	55,17*	0,0000
Erro	10	0,44		
WS				
Tempo	7	1,99	13,16*	0,0000
Intensidade luminosa x Tempo	28	9,50	15,67*	0,0000
Erro	70	15,15		

Nos resultados para os novos graus de liberdade ajustados (teste-F "θ-ajustado" Huynh e Feldt) não há alteração dos p-values da tabela 3.1.

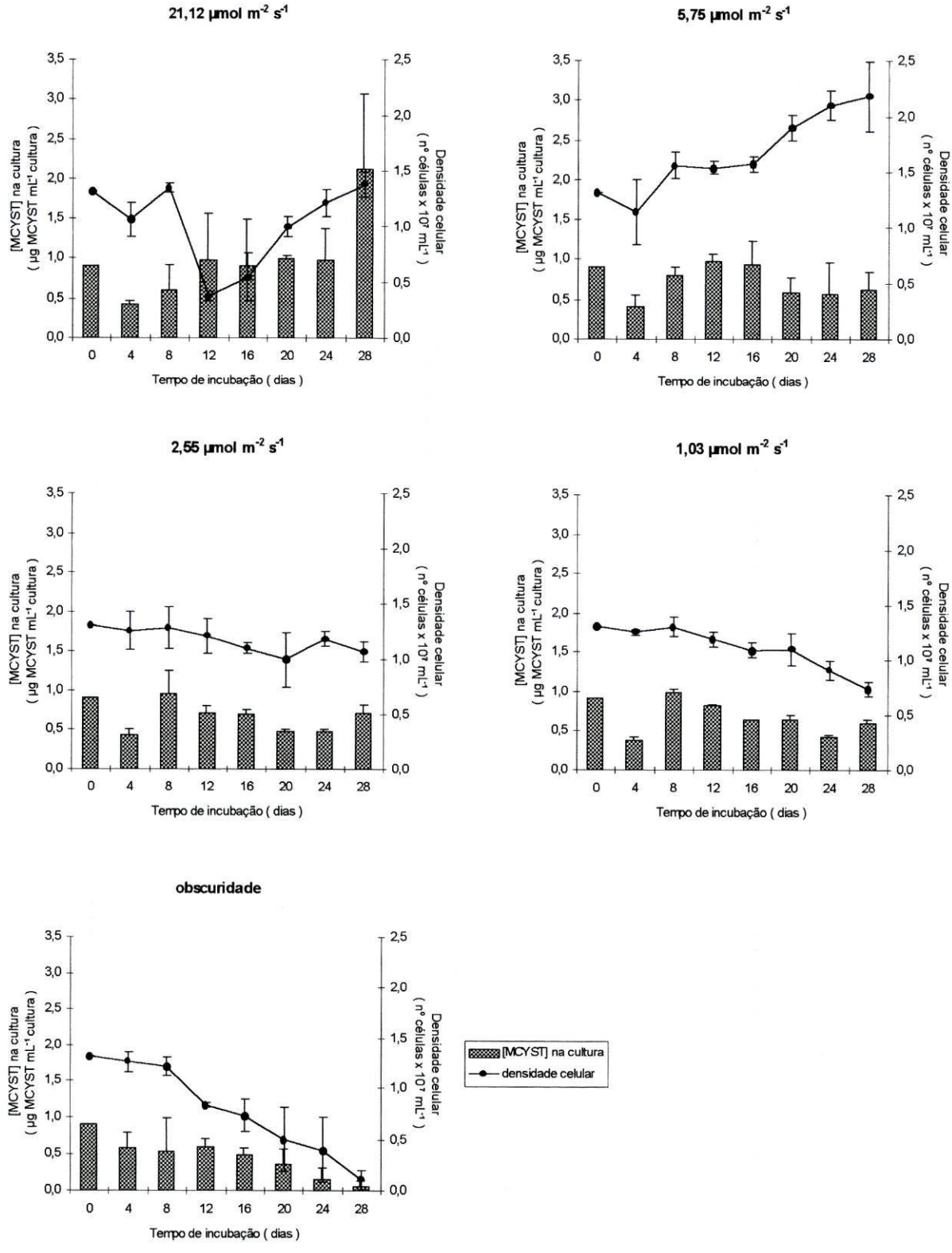


Figura 3.1 – Relação entre a variação da densidade celular e a variação da concentração de microcistinas na cultura, ao longo do tempo de incubação a diferentes intensidades luminosas (valores médios (n=3) ; I desvio padrão).

Após o 4° dia de incubação, com excepção dos frascos mantidos a uma intensidade luminosa de 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} (somente para os dias 8 e 28) e 5,75 μmol $m^{-2}s^{-1}$, a taxa de crescimento apresentou valores sempre inferiores a zero (figura 3.3). O decréscimo mais acentuado da densidade celular foi registado nos frascos mantidos na obscuridade (figura 3.1), resultado esperado, tratando-se de organismos fotoautotróficos. O valor médio máximo para a densidade celular ocorreu ao 28° dia de incubação a 5,75 μmol m^{-2} s^{-1}, e foi de 2,18 ±0,31 x 10^7 células mL^{-1} (figura 3.1), tendo sido aliás a esta intensidade luminosa que se obteve o valor médio global máximo, aproximadamente 1,66 ±0,14 x 10^7 células mL^{-1} (figura 3.2).

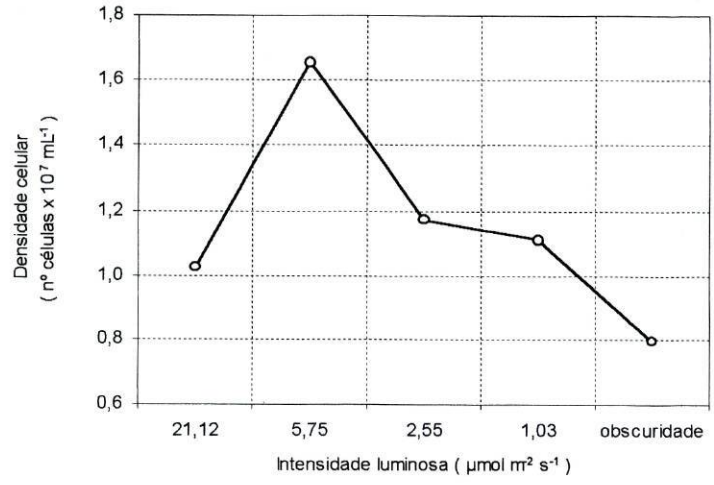


Figura 3.2 – Valores médios globais da densidade celular para as diferentes intensidades luminosas.

Nos frascos expostos à intensidade luminosa 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} verificou-se, 12 dias após o início da experiência, um acentuado decréscimo da densidade celular. A luz é vital para os organismos fotoautotróficos mas também pode ser nefasta: a clorofila-a e a ficobilina, em estado excitado, podem reagir com radicais livres formando superóxidos extremamente reactivos capazes de modificar covalentemente as proteínas celulares; os pigmentos fotossintéticos podem sofrer danos por aumento de temperatura – a absorção de fotões pode ocasionar um aumento de temperatura da ordem dos 200 °C em alguns picosegundos; as radiações ultravioletas podem causar reacções fotoquímicas responsáveis por danos celulares,

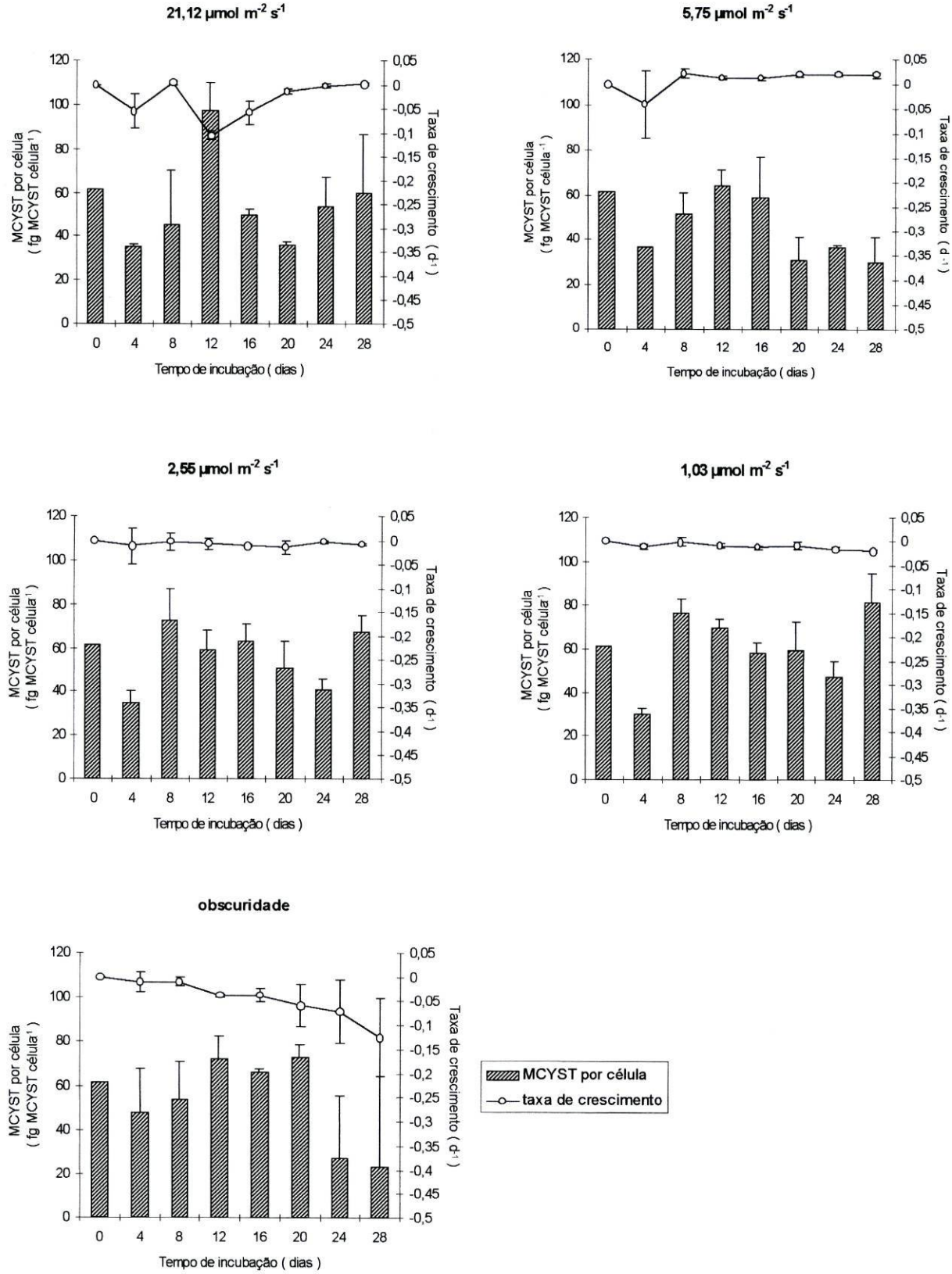


Figura 3.3 – Relação entre a variação da quantidade de MCYST por célula e a variação da taxa de crescimento ao longo do tempo de incubação a diferentes intensidades luminosas (valores médios (n=3) ; I desvio padrão).

nomeadamente ao nível dos ácidos nucleicos; pode ocorrer fotoinibição (Barber & Andersson, 1992 *in* Rapala, 1998).

As cianobactérias conseguem adaptar-se à forte irradiação produzindo, por exemplo, pigmentos fotoprotectores como os carotenóides e as xantofilas (van Liere & Walsby, 1982). A concentração de carotenóides não foi determinada, mas observou-se uma alteração da cor da cultura exposta à intensidade luminosa 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} – tornou-se amarelada. Hesse e colaboradores (1998) verificaram, para a estirpe tóxica de *M. aeruginosa* HUB 5-2-4, que a concentração de carotenóides glicosídicos aumentou claramente com o aumento da intensidade luminosa. *Microcystis aeruginosa* tem ainda a capacidade de se mover ao longo do gradiente de luz, adoptando uma posição que optimize o seu crescimento, mas o volume de cultura utilizado era demasiado pequeno para permitir que evitassem desse modo os efeitos nefastos de uma exposição prolongada a uma intensidade luminosa elevada.

Relativamente à concentração de microcistinas na cultura, a análise da variância permitiu concluir que existiam diferenças significativas entre as intensidades luminosas e muito significativas entre os tempos de incubação, mas não há evidência para rejeitar a hipótese nula para a interacção intensidade luminosa x tempo (tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Tabela ANOVA para os dados da concentração de MCYST na cultura calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Intensidade luminosa	4	2,05	3,61*	0,0453
Erro	10	1,89		
WS				
Tempo	7	8,28	3,49*	0,0029
Intensidade luminosa x Tempo	28	11,79	1,24	0,2297
Erro	70	27,72		

Na tabela 3.3 encontram-se os resultados dos ajustamentos nos graus de liberdade para o modelo de medições repetidas, não se verificando alterações nas conclusões anteriormente obtidas.

Tabela 3.3 – Tabela ANOVA para os dados da concentração de MCYST na cultura com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" (Huynh e Feldt).

Fonte de variação	g. l.	g- l. aproximados	Valor-F	p-value
BS				
Intensidade luminosa	4	Sem alteração	3,61*	0,0453
Erro	10	Sem alteração		
WS				
Tempo	7	6,85	3,49*	0,0029
Intensidade luminosa x Tempo	28	27,42	1,24	0,2323
Erro	70	68,56		

O valor médio máximo para a concentração de microcistinas na cultura foi obtido na intensidade luminosa máxima testada (21,12 μmol m^{-2} s^{-1}) após 28 dias de incubação (figuras 3.1 e 3.4), sendo de 2,11 ±0,95 μg MCYST mL^{-1}. Segundo o cálculo da média global, também foi com esta intensidade luminosa que se obteve o valor médio global máximo para a concentração de microcistinas na cultura : 0,98 ±0,38 μg MCYST mL^{-1} (figura 3.4). Segundo os resultados obtidos no teste Duncan, existem diferenças significativas para os valores médios de concentração de microcistinas na cultura entre os dias 0 e 4 do tempo de incubação, em todas as intensidades luminosas testadas, coincidente com a diminuição da densidade celular.

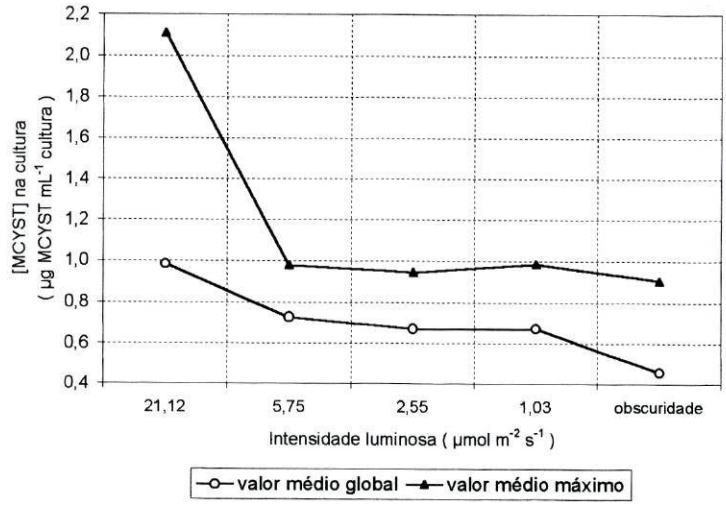


Figura 3.4 – Valores médios global e máximo da concentração de MCYST na cultura para as diferentes intensidades luminosas.

O valor máximo da concentração de microcistinas na cultura foi obtido a uma intensidade luminosa diferente da responsável pelo máximo da densidade celular, o que implica que a simples determinação do número de células por mililitro, aquando da ocorrência de uma florescência de cianobactérias, numa massa de água utilizada para recreio ou como fonte de água para consumo humano, não permitirá por si só avaliar o risco para a Saúde Pública.

A análise da variância para a quantidade de microcistinas por célula revelou diferenças altamente significativas entre os tempos de incubação e na interacção intensidade luminosa x tempo (tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Tabela ANOVA para os dados da quantidade de MCYST por célula calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Intensidade luminosa	4	3,91	3,16	0,0639
Erro	10	3,07		
WS				
Tempo	7	9,86	4,54*	0,0003
Intensidade luminosa x Tempo	28	11,79	2,51*	0,0001
Erro	70	21,81		

Observando os resultados da tabela 3.5 verifica-se que, se devem considerar as diferenças entre os tempos de incubação e na interacção intensidade luminosa x tempo somente muito significativas.

Tabela 3.5 – Tabela ANOVA para os dados da quantidade de MCYST por célula com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" (Huynh e Feldt).

Fonte de variação	g. l.	g- l. aproximados	Valor-F	p-value
BS				
Intensidade luminosa	4	Sem alteração	3,16	0,0639
Erro	10	Sem alteração		
WS				
Tempo	7	4,07	4,54*	0,0039
Intensidade luminosa x Tempo	28	16,27	2,51*	0,0089
Erro	70	40,68		

O valor médio global máximo para a quantidade de MCYST por célula – 60,38 ±6,41 fg MCYST célula^{-1} - foi obtido a uma intensidade luminosa de 1,03 µmol m^{-2} s^{-1} (figura 3.5), mas o valor médio máximo ocorreu, ao 12° dia de incubação, nas culturas colocadas a 21,12µmol m^{-2} s^{-1}, sendo de 96,86 ±13,15 fg MCYST célula^{-1} (figuras 3.2 e 3.5).

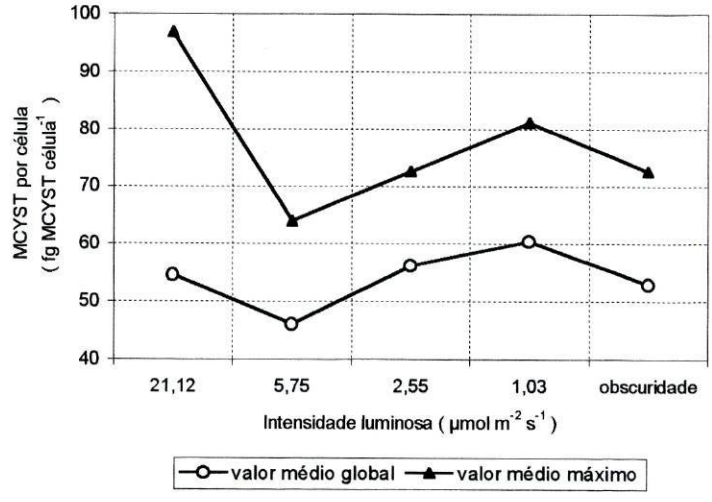


Figura 3.5 – Valores médios global e máximo da quantidade de MCYST por célula para as diferentes intensidades luminosas.

O valor médio máximo para a concentração de microcistinas na cultura foi obtido com a intensidade luminosa 21,12 µmol m^{-2} s^{-1}, mas, se atendermos ao facto de existirem diferenças altamente significativas na densidade celular das culturas incubadas sob diferentes intensidades luminosas, verificamos que a quantidade de microcistinas por célula atingiu , em termos de média global, um máximo para a intensidade luminosa 1,03 µmol m^{-2} s^{-1}, apesar de não ser significativamente diferente do obtido para as restantes intensidades luminosas.

Torna-se assim difícil a comparação com resultados obtidos noutros estudos sobre o efeito da intensidade luminosa no crescimento e produção de toxinas em *Microcystis aeruginosa* (tabela 3.6), em que, para além da utilização de diferentes estirpes de *M. aeruginosa*, diferentes métodos de detecção das toxinas e diferentes condições de cultura, os valores de toxicidade são calculados em relação ao peso seco do material algal.

Tabela 3.6 – Estudos sobre o efeito da intensidade luminosa no crescimento e toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (modificado de Rapala, 1998) ; μ é a taxa de crescimento.

Estirpe	Valores testados	Resultados	Método de detecção das toxinas	Outras condições de crescimento	Referência bibliográfica
NRC-1	220-1600 ft.-c.	μ máx. a 1600 ft.-c. sem efeito na produção de toxinas	FDF bioensaio com murganhos	cultura contínua temperatura 20-25ºC	Gorham, 1964
UV-006	21-205 μmol m^{-2} s^{-1}	μ máx. e toxicidade máx. a 145 μmol m^{-2} s^{-1}	microcistinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" temperatura 24ºC	Van der Westhuizen & Eloff, 1985
M228	7,5-75 μmol m^{-2} s^{-1}	μ máx. a 75 μmol m^{-2} s^{-1} toxicidade máx. a 30-75 μmol m^{-2} s^{-1}	microcistinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" temperatura 25ºC	Watanabe *et al.*, 1985
7813	5-50 μmol m^{-2} s^{-1}	μ máx. a 20 μmol m^{-2} s^{-1}	microcistinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" temperatura 25ºC	Codd & Poon, 1988
CYA 228/1	10-75 μmol m^{-2} s^{-1}	μ máx. a 75 μmol m^{-2} s^{-1} toxicidade máx. a 40 μmol m^{-2} s^{-1}	MCYST-RR HPLC	cultura contínua temperatura 20ºC	Utkilen & Gjølme, 1992

No presente estudo a taxa de crescimento máxima foi atingida com a intensidade luminosa 5,75 μmol m^{-2} s^{-1} e o máximo de toxicidade (expresso em quantidade de toxina por célula), considerando o valor médio global, com uma intensidade luminosa 1,03 μmol m^{-2} s^{-1}. Watanabe e colaboradores (1985) e Utkilen e Gjølme (1992) também obtiveram um máximo de toxicidade a uma intensidade luminosa inferior àquela a que correspondia a taxa de crescimento máxima. Mas estes autores verificaram que intensidades luminosas inferiores a 10 μmol m^{-2} s^{-1}causavam diminuição da hepatotoxicidade (Watanabe *et al.*, 1985) ou da concentração intracelular de microcistinas, calculada em relação ao peso seco (Utkilen e Gjølme 1992), contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo. No entanto, saliente-se que o valor médio máximo foi atingido a 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}.

Nos filtrados obtidos no dia 0 existiam 0,104 μg MCYST mL^{-1}, mas nos ensaios com as intensidades luminosas 5,75 μmol m^{-2} s^{-1}, 2,55 μmol m^{-2} s^{-1}e 1,03 μmol m^{-2} s^{-1} e na obscuridade, mas não se detectaram microcistinas após o 4° dia do período de incubação, inclusive, o que corresponde a uma taxa de degradação de 0,026 μg MCYST mL^{-1} d^{-1}. Watanabe e colaboradores (1992 *in* Jones e Orr, 1994) observaram degradação de MCYST-LR e MCYST-YR em culturas laboratoriais em decomposição, mas só 10-20 dias após o pico de dissolução das microcistinas (aproximadamente 0,75 μg mL^{-1}). Nesse estudo a taxa de degradação era de 0,015 a 0,020 μg mL^{-1} d^{-1}. Se ocorreu libertação de microcistinas para o meio de cultura, nos restantes dias do ensaio, foi seguida por uma degradação de 100% nos 4 dias que mediavam a recolha de amostras. Este resultado não era esperado e talvez se deva à presença de microrganismos no meio de cultura, embora se tenham tomado todas as precauções necessárias para evitar uma contaminação. Rapala e colaboradores (1994) registaram uma degradação completa de microcistina-LR e da sua variante [D-Asp^3]-MCYST-LR em apenas 4 dias, quando utilizavam água natural, com uma população bacteriana endémica.

Nos filtrados obtidos das culturas colocadas a 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} detectaram-se microcistinas com um tempo de retenção de 2,5 min ±15% (microcistina 1), 3,5 min ±15% (microcistina 2) e próximo do obtido para a MCYST-LR padrão (6,7 min ±15%) – figura 3.6 (ver no apêndice 3 a figura 6.3). No gráfico da figura 3.7 encontram-se registados os tempos de retenção obtidos para todas as amostras de filtrados e células ao longo do período de incubação a diferentes intensidades luminosas.

O valor máximo de concentração de microcistinas nos filtrados, obtidos a 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}, foi atingido no 28° dia de incubação – 1,29 ±0,56 μg MCYST mL^{-1} (figura 3.6), sendo cerca de 79,3% microcistina 1. Nos 4°, 12° e 16° dias a microcistina detectada em maior quantidade também era microcistina 1 (100%, 63,6% e 41,4%, respectivamente). No 20° dia do período de incubação 61,1% das microcistinas quantificadas correspondiam a microcistina 2 e no dia 24 a percentagem de microcistina 2 era de aproximadamente 54,3%. As microcistinas designadas por MCYST-LR foram as detectadas em menor percentagem e somente a partir do 12° dia de incubação. Obteve-se uma degradação de microcistinas entre os dias 16 e 20 (14,1%) e entre os dias 20 e 24 (52,9%) do período de incubação.

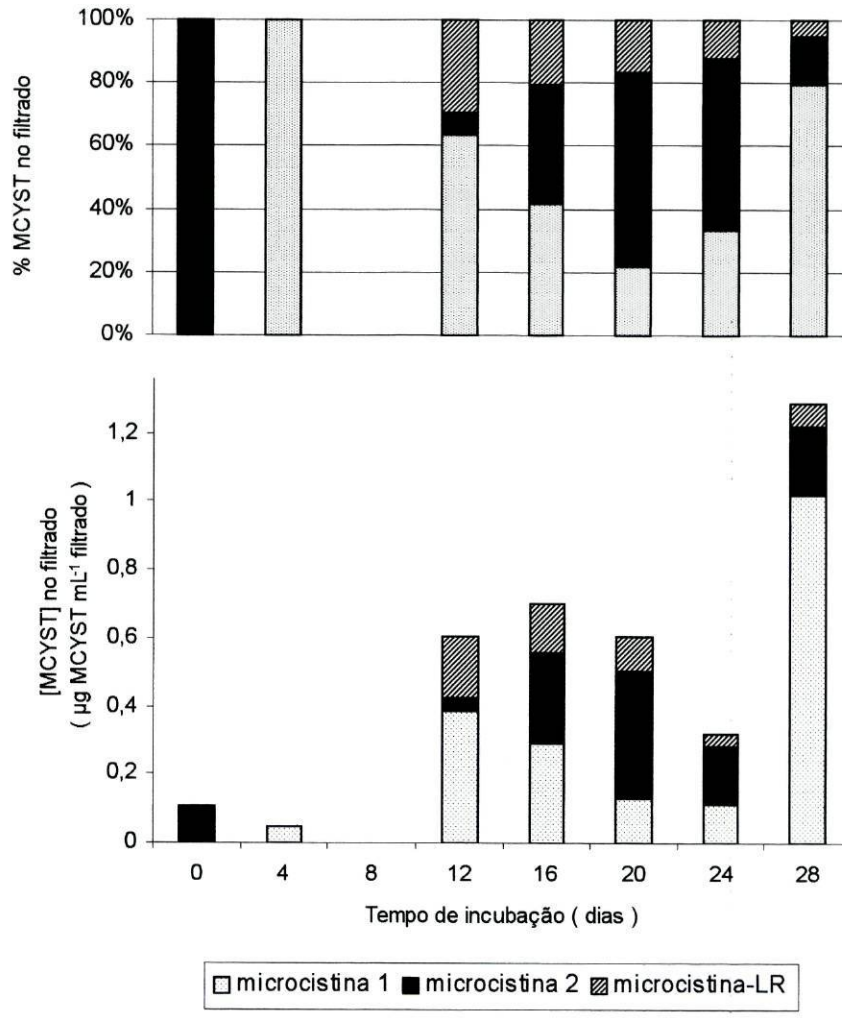


Figura 3.6 – Variação da concentração das três microcistinas detectadas nos filtrados obtidos das culturas incubadas a 21,12 µmol m^{-2} s^{-1}, e respectiva percentagem (n=3).

Nestas culturas incubadas a 21,12 µmol m^{-2} s^{-1}, ocorreu ao 12° dia uma diminuição acentuada da densidade celular. Quando as células começaram a decompor-se houve certamente libertação de microcistinas para o meio de cultura e outros metabolitos celulares, entre os quais se deveriam incluir pigmentos fotossintéticos e, portanto, as microcistinas ficaram expostas à luz juntamente com esses pigmentos. Segundo Tsuji e colaboradores (1994) a microcistina-LR mantém-se estruturalmente estável quando irradiada com luz fluorescente. Mas as microcistinas são degradadas pela luz natural quando pigmentos algais presentes no meio actuam como fotossensibilizadores, pois absorvem a luz levando à subsequente formação de moléculas altamente reactivas, como radicais hidróxido e H_2O_2. Harada (1996) verificou que a presença de vários pigmentos acelerava a degradação de

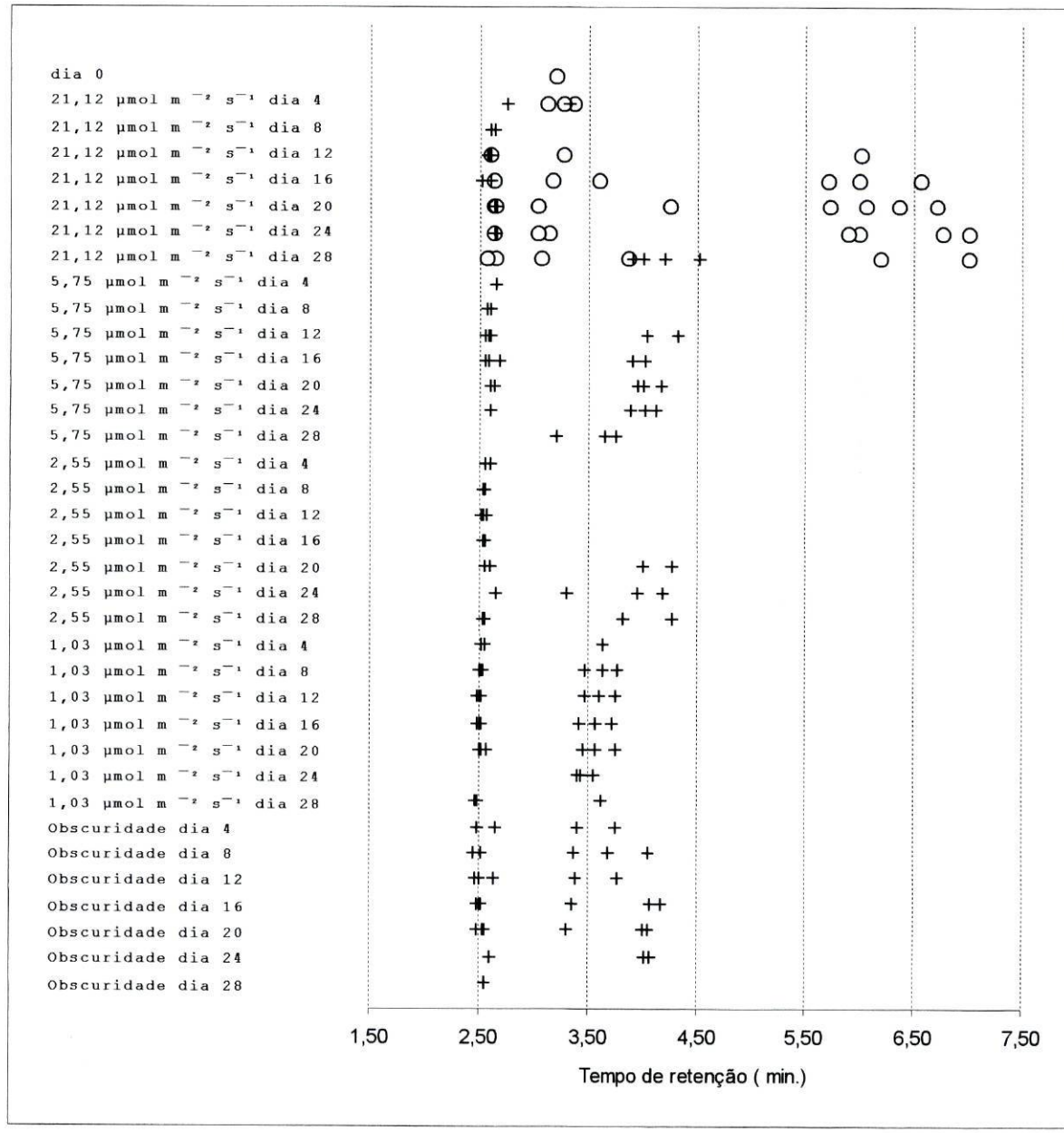


Figura 3.7 – Tempos de retenção das amostras obtidas na incubação a diferentes intensidades luminosas : o filtrados ; + células.

microcistinas por exposição à luz solar, no entanto demorou 15 dias. Após 7 dias obtinha um cromatograma no HPLC com um novo pico que correspondia ao isómero geométrico 4 (E) do ADDA, na microcistina-LR, e o contrário também acontecia, isto é, o isómero 6 (Z) do ADDA transformar-se em microcistina-LR. Mas não detectou uma decomposição significativa de MCYST-LR em solução na presença de pigmentos, quando a irradiação era efectuada com luz fluorescente.

Na figura 3.8 encontra-se representada graficamente a relação entre a taxa de libertação/degradação de microcistinas e a taxa de crescimento, ao longo do tempo de incubação a 21,12 µmol m^{-2} s^{-1}. Estas duas variáveis apresentam uma correlação negativa de -0,307 (n=7). A correlação negativa entre a taxa de crescimento e a taxa de libertação/degradação de microcistinas era esperada, uma vez que se admite que a libertação de microcistinas para o meio só ocorra, pelo menos em quantidades significativas, quando se verifica lise celular (Berg *et al.*, 1987).

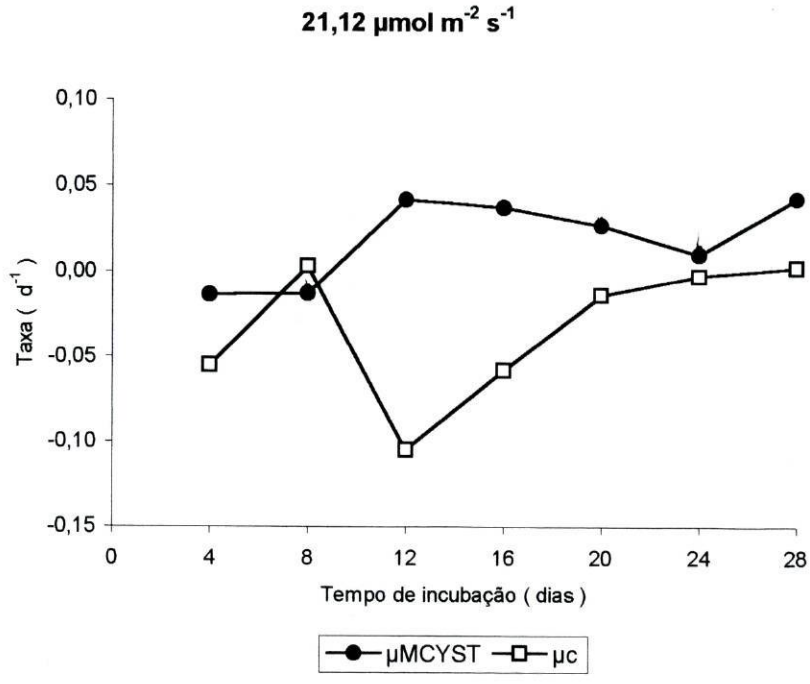


Figura 3.8 – Relação entre a variação da taxa de libertação / degradação de MCYST (μ_{MCYST}) e a variação da taxa de crescimento (μ_c) ao longo do período de incubação para a intensidade luminosa 21,12 µmol m^{-2} s^{-1} (n=3).

3.2 Temperatura

Apesar de se terem registado algumas flutuações na densidade celular, a tendência geral foi para um aumento ao longo do tempo de incubação (figura 3.9), tendo-se obtido taxas de crescimento médias inferiores a zero somente para o dia 8, no caso dos frascos colocados a uma temperatura 21 °C, e o dia 16 para os frascos submetidos a uma temperatura de 23 °C (figura 3.10). A maior taxa de crescimento ocorreu a 28 °C (figura 3.10).

A análise da variância para os valores de densidade celular permitiu concluir que existem diferenças altamente significativas entre os tempos de incubação mas não existem evidências para rejeitar a hipótese nula para o efeito da temperatura nem da interacção temperatura x tempo de incubação (tabela 3.7). Na tabela 3.8 encontram-se os resultados dos ajustamentos nos graus de liberdade, que não introduzem alterações nas conclusões anteriores.

Tabela 3.7 – Tabela ANOVA para os dados da densidade celular calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Temperatura	3	0,96	1,92	0,2053
Erro	8	1,34		
WS				
Tempo	7	3,36	10,45*	0,0000
Temperatura x Tempo	21	1,09	1,13	0,3499
Erro	56	2,57		

Tabela 3.8 – Tabela ANOVA para os dados da densidade celular com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" (Huynh e Feldt).

Fonte de variação	g. l.	g- l. aproximados	Valor-F	p-value
BS				
Temperatura	3	Sem alteração	1,92	0,2053
Erro	8	Sem alteração		
WS				
Tempo	7	3,97	10,45*	0,0002
Temperatura x Tempo	21	11,89	1,13	0,3739
Erro	56	31,72		

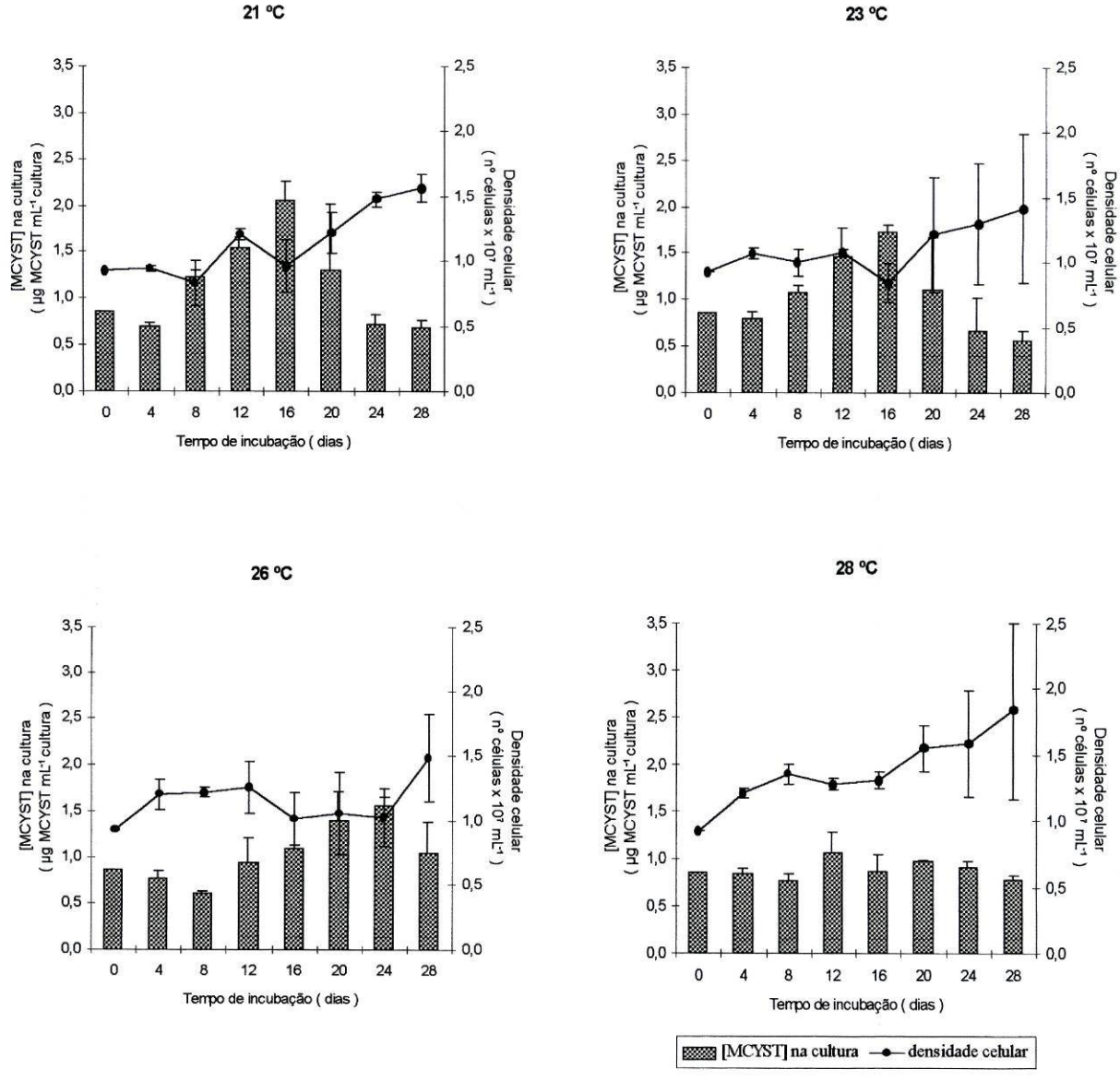


Figura 3.9 – Relação entre a variação da densidade celular e a variação da concentração de microcistinas na cultura, ao longo do tempo de incubação a diferentes temperaturas (valores médios (n=3) ; I desvio padrão).

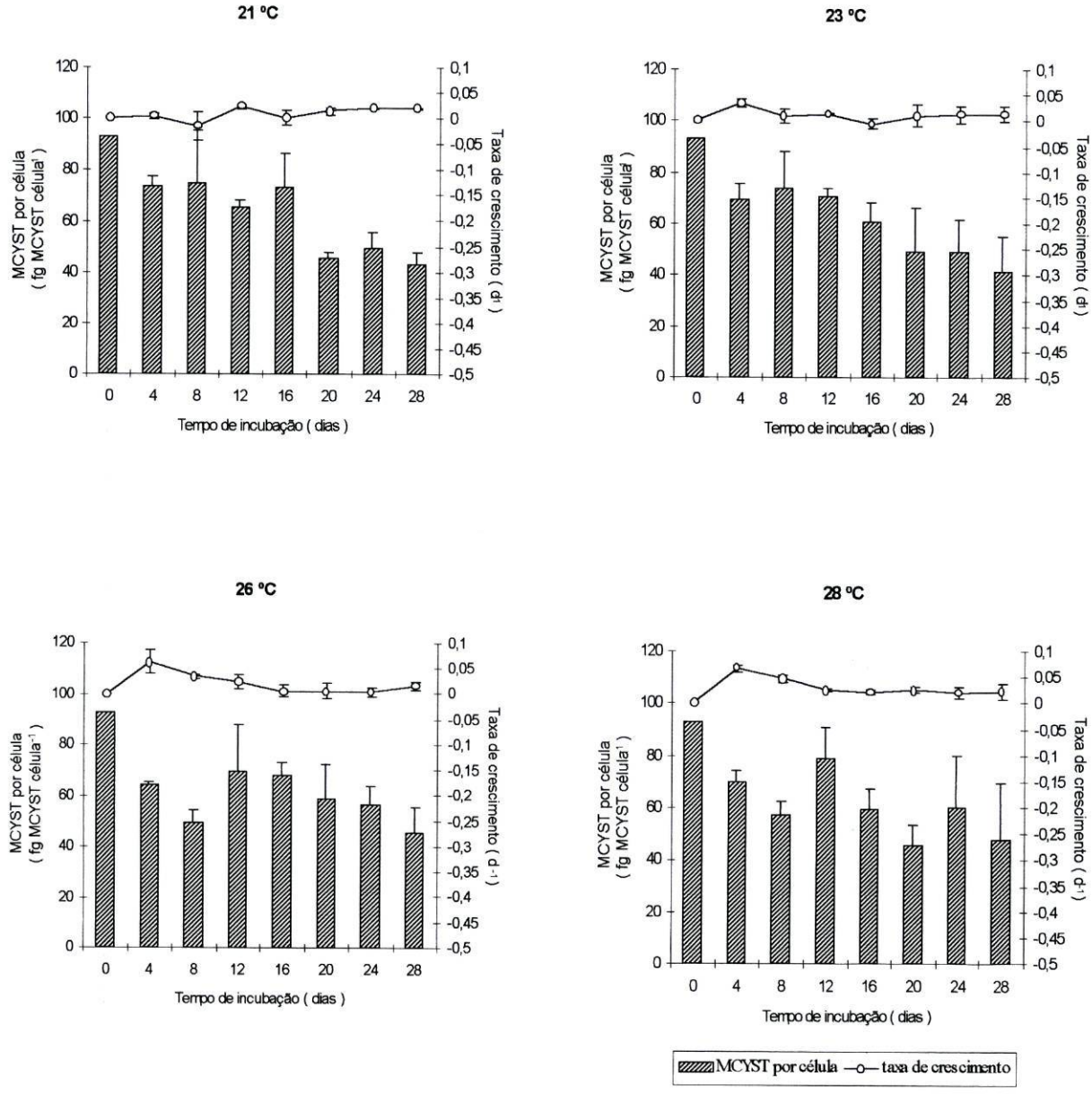


Figura 3.10 – Relação entre a variação da quantidade de MCYST por célula e a variação da taxa de crescimento ao longo do tempo de incubação a diferentes temperaturas (valores médios (n=3) ; I desvio padrão).

Quanto à média global, o valor máximo para a densidade celular foi obtido nas culturas incubadas a 28°C – 1,38 ±0,18 x 10^7 células mL^{-1} (figura 3.11), embora as diferenças entre as temperaturas testadas não sejam estatisticamente significativas. Segundo os resultados do teste Duncan, as diferenças entre as médias da densidade celular obtidas a diferentes temperaturas só são significativas ($p < 0,05$) no 28° dia do tempo de incubação. O valor médio máximo ocorreu, nesse 28 ° dia, nas culturas incubadas a 28 °C, sendo de 1,83 ±0,67 x 10^7 células mL^{-1}.

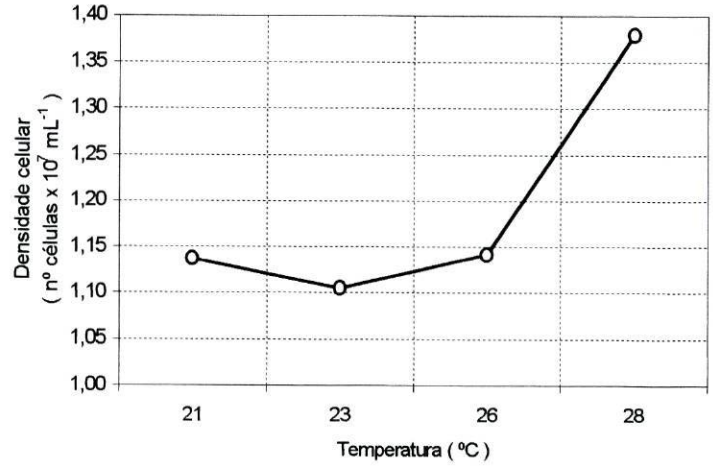


Figura 3.11 – Valores médios globais da densidade celular para as diferentes temperaturas.

Em estudos já efectuados sobre a influência da temperatura no crescimento de *M. aeruginosa* (tabela 3.9), a taxa de crescimento é máxima para temperaturas da ordem dos 30-32 °C, apesar de Codd e Poon (1988) terem registado um máximo para uma temperatura de 25 °C. Como já foi referido anteriormente, as diferenças existentes no planeamento experimental tornam os resultados obtidos nestes estudos dificilmente comparáveis. Mas, a intensidade luminosa utilizada por Codd e Poon é a mais próxima daquela a que foram sujeitas as culturas no ensaio com diferentes temperaturas (5,75 µmol $m^{-2}s^{-1}$), e o coefeito luz-temperatura não deve ser desprezado.

Tabela 3.9 – Estudos sobre o efeito da temperatura no crescimento e toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (modificado de Rapala, 1998) ; μ é a taxa de crescimento.

Estirpe	Valores testados	Resultados	Método de detecção das toxinas	Outras condições de crescimento	Referência bibliográfica
NRC-1	20-35 °C	μ máx. a 32,5 °C sem efeito na produção de toxinas	FDF bioensaio com murganhos	cultura contínua luz 220-1600 ft.-c.	Gorham, 1964
?	18-34 °C	a 22 °C maior toxicidade do que a 34 °C	hepatotoxinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" luz 120 μmol m^{-2} s^{-1} ou luz (20) / obscuridade 10/14h	Runnegar *et al.*, 1983
UV-006	16-36 °C	μ máx. a 32°C toxicidade máx. a 20 °C	microcistinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" luz 200 μmol m^{-2} s^{-1}	Van der Westhuizen & Eloff, 1985
M228	18-32 °C	μ máx. a 32 °C toxicidade máx. a 18 °C	microcistinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" luz 30 μmol m^{-2} s^{-1}	Watanabe *et al.*, 1985
7813	10-34 °C	μ máx. e toxicidade máx. a 25 °C	microcistinas bioensaio com murganhos	culturas "batch" luz 15 μmol m^{-2} s^{-1}	Codd & Poon, 1988
K-139	22 e 30 °C	μ máx. a 30 °C sem efeito na toxicidade	2 microcistinas bioensaio com murganhos	cultura contínua luz 2000 lx	Ohtake *et al.*, 1989

Em relação à concentração de microcistinas na cultura, a análise da variância mostrou existirem diferenças altamente significativas entre os tempos de incubação e diferenças significativas resultantes da interacção temperatura x tempo de incubação (tabela 3.10), conclusões não alteradas com os resultados para os novos graus de liberdade ajustados (tabela 3.11).

Tabela 3.10 – Tabela ANOVA para os dados da concentração de microcistinas na cultura calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Temperatura	3	0,55	1,16	0,3828
Erro	8	1,26		
WS				
Tempo	7	5,16	6,99*	0,0000
Temperatura x Tempo	21	4,64	2,09*	0,0147
Erro	56	6,19		

Tabela 3.11 – Tabela ANOVA para os dados da concentração de microcistinas na cultura com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" (Huynh e Feldt).

Fonte de variação	g. l.	g- l. aproximados	Valor-F	p-value
BS				
Temperatura	3	Sem alteração	1,16	0,3828
Erro	8	Sem alteração		
WS				
Tempo	7	2,27	6,99*	0,0003
Temperatura x Tempo	21	12,83	2,09*	0,0422
Erro	56	34,20		

O valor médio global máximo de concentração de microcistinas na cultura foi obtido à temperatura de 21 °C, sendo 1,13 ±0,17 μg MCYST mL^{-1} (figura 3.12) e o valor médio máximo foi atingido no 16° dia de incubação também a 21 °C – 2,05 ±0,22 μg MCYST mL^{-1} (figuras 3.9 e 3.12).

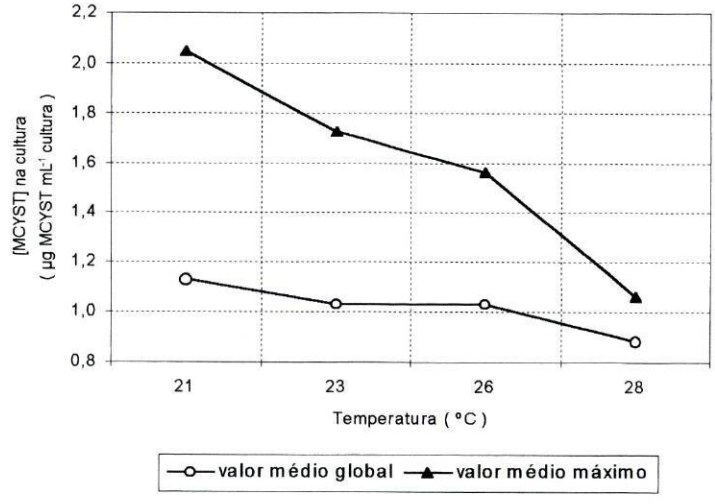


Figura 3.12 – Valores médios global e máximo da concentração de microcistinas na cultura para as diferentes temperaturas.

A análise da variância para a quantidade de microcistinas por célula revelou diferenças altamente significativas entre os tempos de incubação, mas não entre as quatro temperaturas testadas nem para a interacção temperatura x tempo de incubação (tabela 3.12).

Tabela 3.12 – Tabela ANOVA para os dados da quantidade de microcistinas por célula calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Temperatura	3	34,82	0,46	0,9861
Erro	8	2037,46		
WS				
Tempo	7	19231,67	30,74*	0,0000
Temperatura x Tempo	21	2821,54	1,50	0,1140
Erro	56	5005,39		

Nos resultados para os novos graus de liberdade ajustados (teste-F "θ-ajustado" Huynh e Feldt) não há alteração dos p-values.

O valor médio máximo ocorreu no início da experiência – 92,80 fg MCYST célula^{-1} (figura 3.10). O valor máximo de microcistinas por célula, considerando a média global, foi atingido com a temperatura de 21 °C – 64,59 ±6,64 fg MCYST célula^{-1} (figura 3.13). Este resultado está de acordo com os obtidos por Runnegar e colaboradores (1983), van der Westhuizen e Eloff (1985) e Watanabe e colaboradores (1985) - tabela 3.9 - na medida em que o máximo de toxicidade é obtido para uma temperatura inferior àquela a que corresponde a taxa de crescimento máximo.

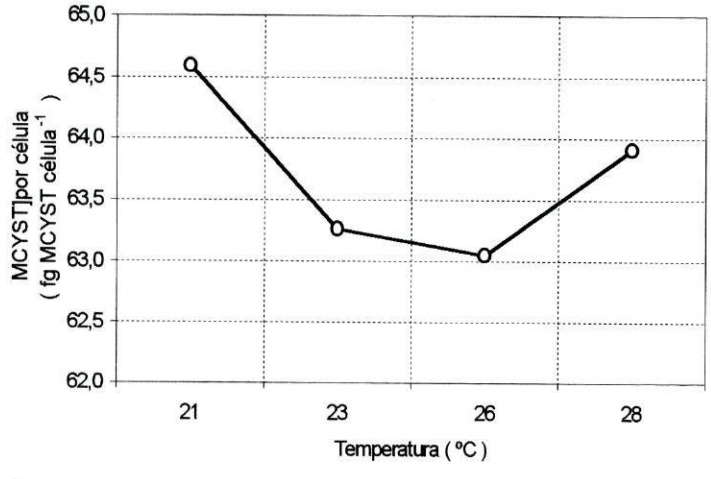


Figura 3.13 – Valores médios globais da quantidade de microcistinas por célula para as diferentes temperaturas.

Nas condições de cromatografia utilizadas obtiveram-se os tempos de retenção, correspondentes a picos com absorvância máxima a 238 – 240 nm, representados no gráfico da figura 3.14. Verifica-se que quer no filtrado quer nas células as microcistinas detectadas apresentavam tempos de retenção de 2,5 min ±15% (microcistina 1) e 3,5 min ±15% (microcistina 2) – ver no apêndice 3 a figura 6.4.

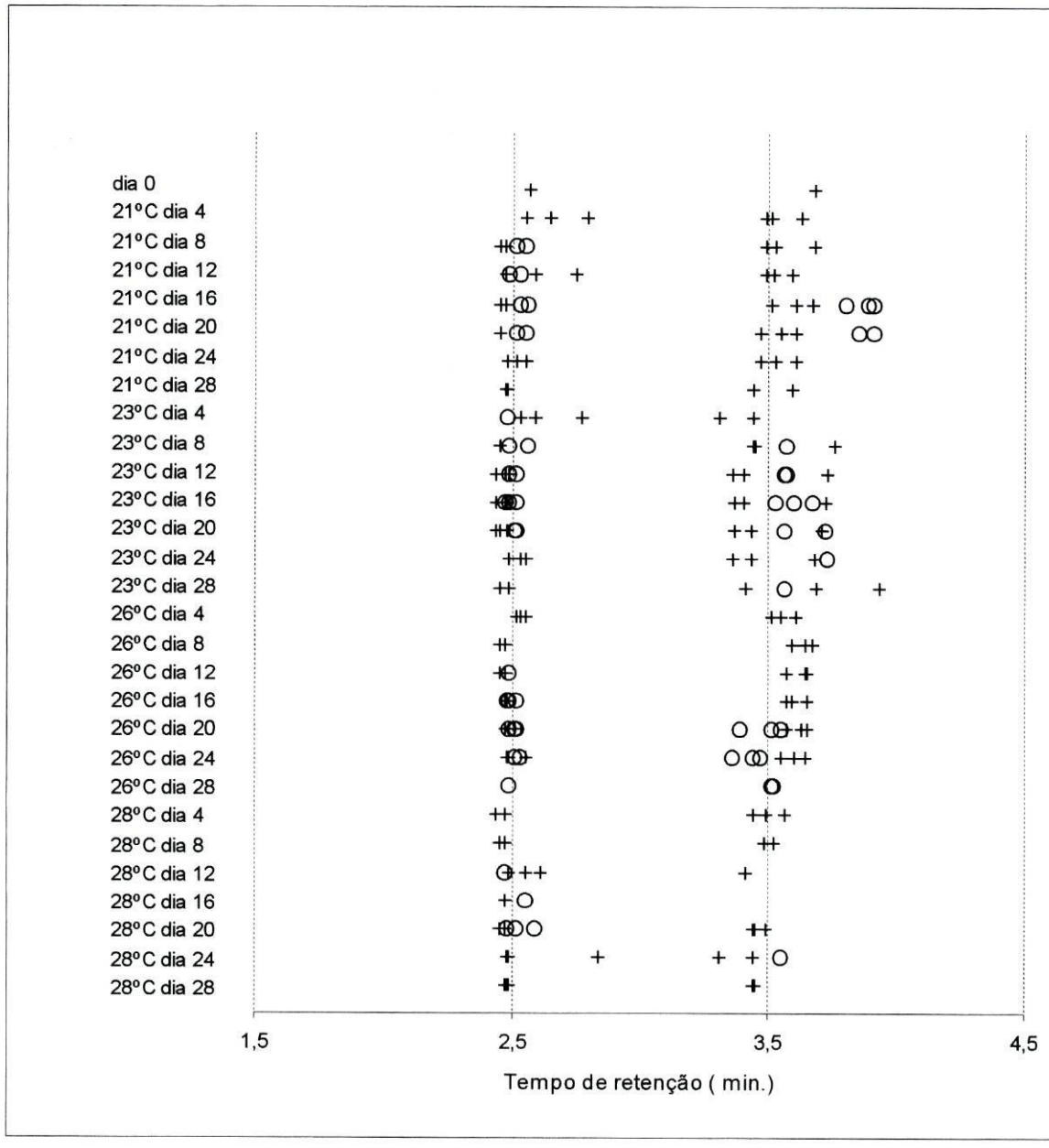


Figura 3.14 - Tempos de retenção das amostras obtidas na incubação a diferentes temperaturas : o filtrados ; + células.

Em relação à concentração de microcistinas no filtrado verificou-se existir uma maior libertação de microcistinas para o filtrado nas temperaturas 21 °C e 23 °C (figura 3.15).

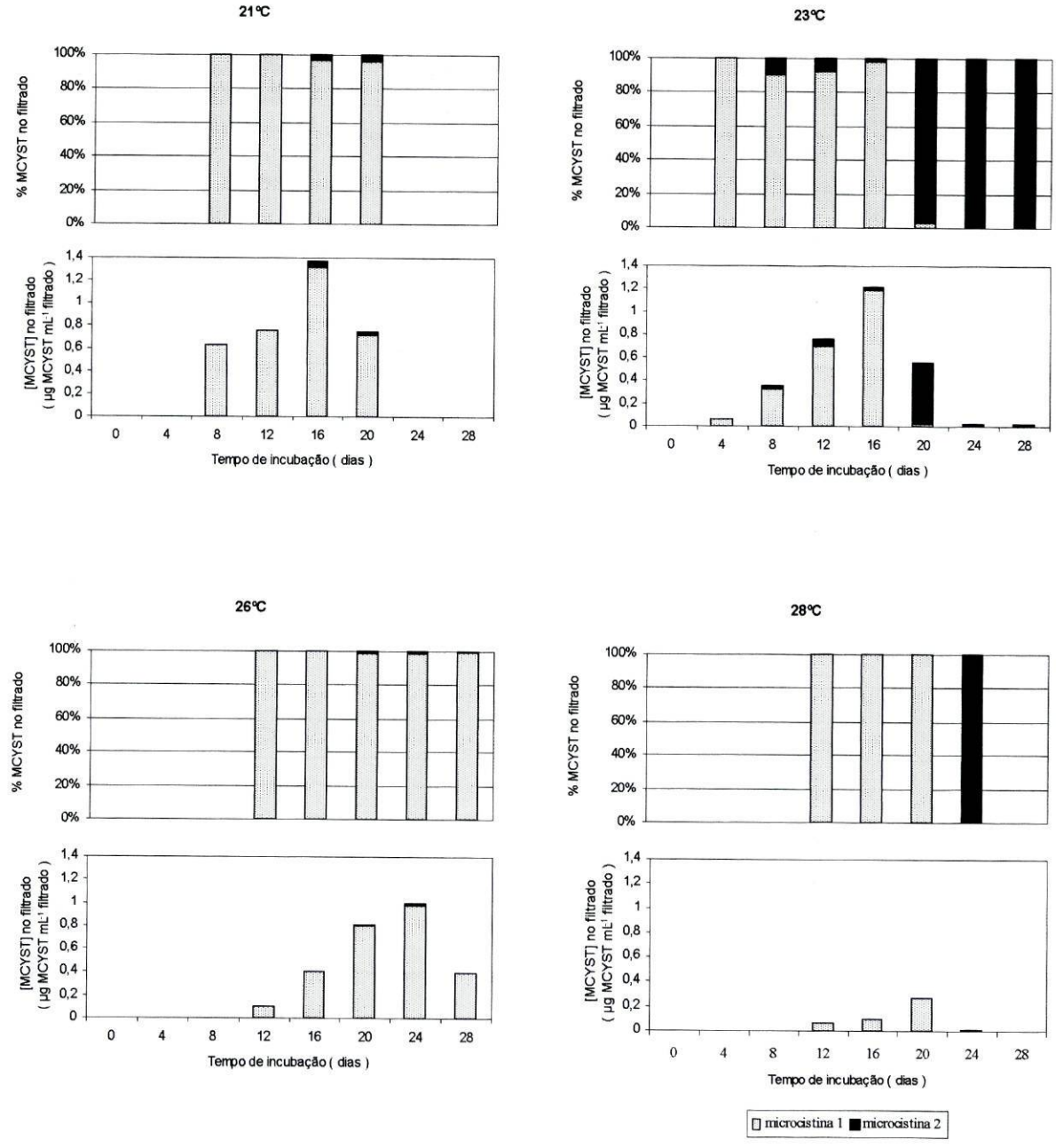


Figura 3.15 – Variação da concentração das duas microcistinas detectadas nos filtrados, obtidos ao longo do período de incubação, para as diferentes temperaturas, e respectivas percentagens (n=3).

A libertação de microcistinas para o meio de cultura parece ser mais tardia a 26 e 28 °C, mas esta interpretação dos resultados poderá ser errada, porque nada nos garante que, nas temperaturas mais elevadas, não tenha ocorrido degradação total nos primeiros dias da experiência. Nas temperaturas 21 °C e 23 °C ocorreu entre o 16° e o 20° dias de incubação uma degradação de, respectivamente, 45,3% e 54,1%, e nos 4 dias seguintes uma degradação quase completa (100% para os 21 °C e 97% para os 23 °C). Na temperatura 26 °C verificou-se uma degradação de 60,4% entre os dias 24 e 28 do período de incubação. Estas percentagens são elevadas tendo em conta a concentração de microcistinas no meio de cultura no dia que antecede essa degradação (próximo ou mesmo superior a 1 μg MCYST mL^{-1} filtrado), pois Jones e colaboradores (1994) verificaram que se utilizassem uma concentração de MCYST-LR superior a 1 μg mL^{-1} ocorria uma remoção lenta, que podia durar até 3 semanas. A 28 °C obteve-se uma degradação de 95,1 % também em apenas 4 dias (entre o 20° e o 24° dias), mas a concentração de microcistinas no filtrado no dia 20 era de somente 0,27 μg mL^{-1}.

Quando se verifica um decréscimo na temperatura de uma massa de água superficial ou já nos tanques de uma ETA, a densidade pode diminuir, mas isso não implica diminuição da toxicidade, pois, pelo contrário, a quantidade de microcistinas por célula pode aumentar.

Tal como na experiência com a intensidade luminosa 21,12 μmol m^{-2} s^{-1}, a variação da taxa de libertação / degradação de MCYST possui uma correlação negativa com a variação da taxa de crescimento, mais acentuada para os 26 °C (figura 3.16 e tabela 3.13).

Tabela 3.13 – Coeficientes de correlação entre a taxa de libertação / degradação de MCYST e a taxa de crescimento, para as diferentes temperaturas (n= 7)

Temperatura	Coeficiente de correlação
21 °C	-0,532
23 °C	-0,586
26 °C	-0,823
28 °C	-0,399

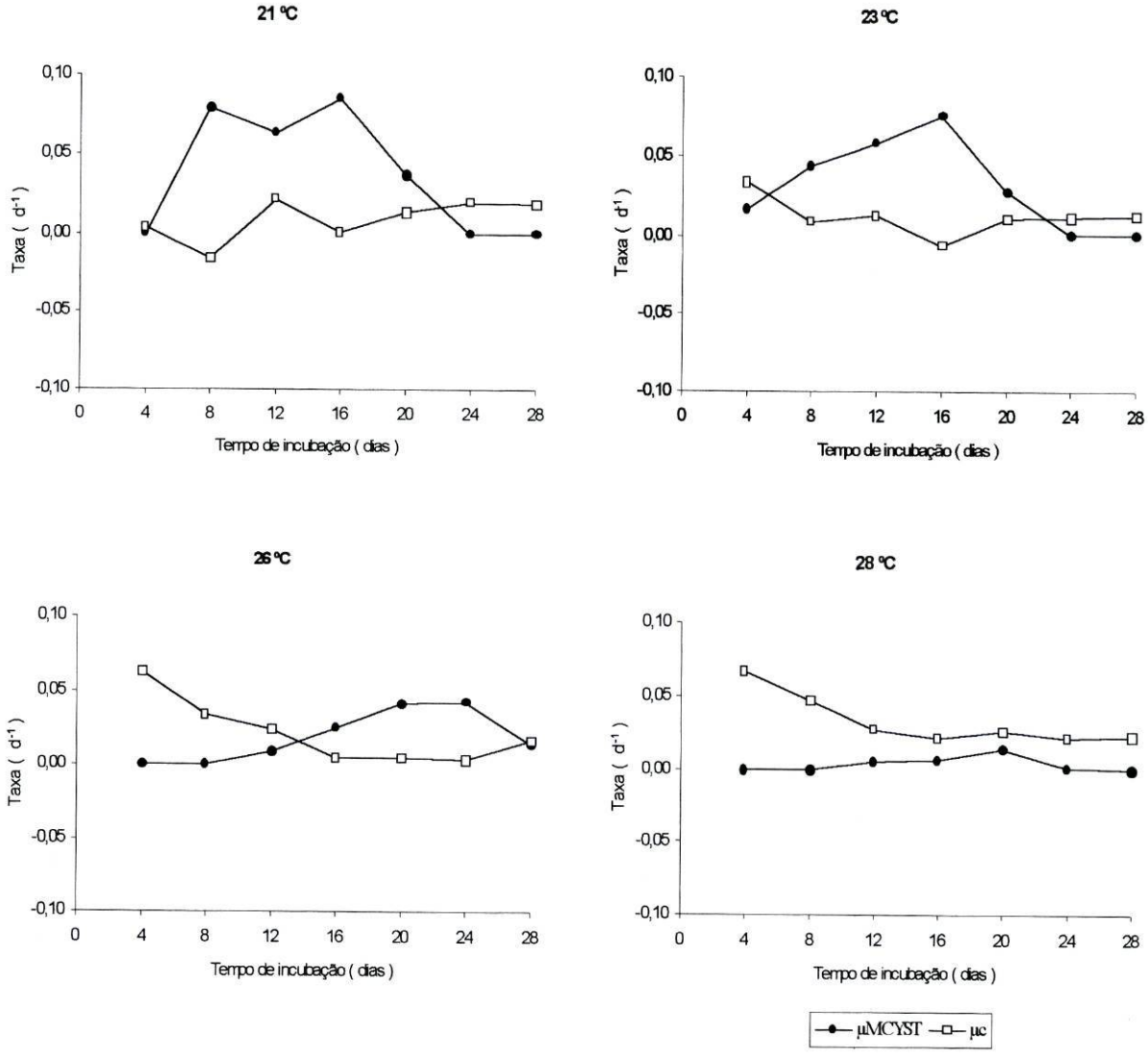


Figura 3.16 – Relação entre a variação da taxa de libertação / degradação de MCYST (μ_{MCYST}) e a variação da taxa de crescimento (μ_c), ao longo do tempo de incubação para as diferentes temperaturas (n=3).

3.3 Adição de coagulantes e floculantes

3.3.1 Sulfato de alumínio

A análise da variância para a densidade celular não revelou diferenças significativas para as diferentes concentrações de sulfato de alumínio utilizadas, para os tempos de contacto ou para a interacção concentração de sulfato de alumínio x tempo (tabela 3.14). Chegou-se à mesma conclusão com a análise da variância para a quantidade de microcistina por célula (tabela 3.15). As microcistinas existentes nas células apresentavam tempos de retenção que permitiam classificá-las como microcistina1 e microcistina 2.

Tabela 3.14 – Tabela ANOVA para os dados da densidade celular calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Sulfato de alumínio	3	0,03	1,69	0,2462
Erro	8	0,04		
WS				
Tempo	2	0,001	0,34	0,7148
Sulfato de alumínio x Tempo	6	0,02	0,50	0,7987
Erro	16	0,13		

Segundo o teste-F "θ-ajustado" Huynh e Feldt não há alteração dos graus de liberdade nem dos p-values nas tabela ANOVA 3.14 e 3.15.

Tabela 3.15 – Tabela ANOVA para os dados da quantidade de MCYST por célula calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Sulfato de alumínio	3	738,14	1,14	0,3901
Erro	8	1727,69		
WS				
Tempo	2	117,49	0,21	0,8135
Sulfato de alumínio x Tempo	6	1022,58	0,61	0,7217
Erro	16	21,81		

Não se detectaram microcistinas nos sobrenadantes no início do ensaio. Nos sobrenadantes obtidos após 20 e 30 minutos de contacto com o sulfato de alumínio existia alguma microcistina do tipo 1 (figura 3.17).

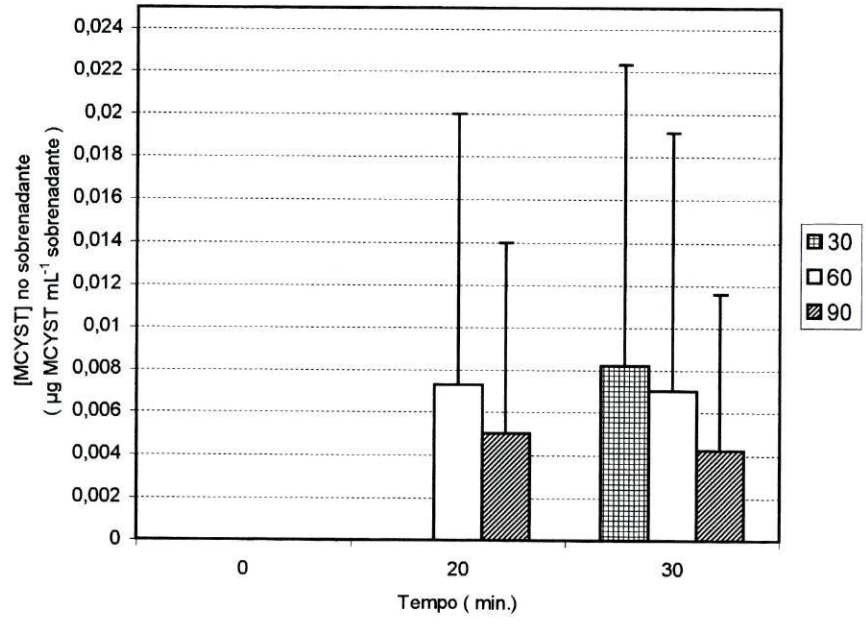


Figura 3.17 – Concentração de MCYST nos sobrenadantes para as diferentes concentrações de sulfato de alumínio testadas (30 mg L^{-1}, 60 mg L^{-1}e 90 mg L^{-1}) e diferentes tempos de contacto (n=3).

Não se registaram alterações significativas na densidade celular nem na quantidade de microcistinas por célula, por isso a libertação de microcistinas para o meio não foi muito significativa, mas as quantidades detectadas (figura 3.17) são superiores ao valor máximo admissível provisório apontado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é 0,001 μg mL^{-1} (OMS, 1998 *in* Falconer, 1999), já para não referir o valor proposto por Ueno e colaboradores (1996) – 0,00001 μg mL^{-1} – que consideraram a acção promotora de tumores evidenciada pelas microcistinas. Curiosamente parece existir uma relação inversa entre a dose de sulfato de alumínio utilizada e a quantidade de microcistinas libertadas.

Lam e colaboradores (1995) sujeitaram células de *M. aeruginosa* a tratamento com sulfato de alumínio (200 mg L^{-1}), tendo também detectado um aumento na concentração de MCYST-LR na água (três vezes mais do que no controlo). No entanto, estes autores consideraram esta libertação de microcistina reduzida, por comparação com outros tratamentos, como, por exemplo, adição de permanganato de potássio. Quando observadas ao microscópio electrónico de transmissão, as células, submetidas a tratamento com sulfato de alumínio, apresentavam a parede celular e o plasmalema intactos, apesar de o plasmalema se encontrar afastado da parede celular, e organelos celulares bem visíveis ; eram poucas as células com danos. Por isso, Lam e colaboradores consideraram que os iões alumínio poderão provocar lise celular, mas pouco significativa. A endo-MCYST-LR persistia dentro das células cianobacterianas em degenerescência durante mais de 26 dias (Lam *et al.*, 1995). O sulfato de alumínio também não causa danos na membrana celular nem é fisiologicamente tóxico para *Aphanizomenon flos-aquae* (Peterson *et al.*, 1995).

A utilização de sulfato de alumínio para redução do nível de fosfatos em massas de água superficiais ou como coagulante / floculante no tratamento da água provoca uma pequena libertação de microcistinas, se existir nessa massa de água uma florescência (neste ensaio utilizou-se uma densidade de 10^6 células mL^{-1}). Mas esta libertação só poderá acarretar riscos para a Saúde, se a ETA não possuir, nas etapas subsequentes, tratamentos que permitam a remoção destas cianotoxinas, como, por exemplo, adsorção por carvão activado em pó (como possui a ETA piloto de Águas do Douro e Paiva – apêndice 1) ou filtros de carvão activado (que existem na ETA de Marco de Canaveses – apêndice 1). Segundo Hoffmann (1976) e Keijola e colaboradores (1988) o carvão activado granular é mais eficiente que o carvão activado em pó. As ETA piloto de Águas do Douro e Paiva e de Marco de Canaveses possuem ainda, como última etapa de tratamento, um tratamento por cloração. Se a dose de cloro residual, ao fim de trinta minutos, for elevada, 0,5 mg L^{-1} (Nicholson *et al.*, 1993 ; Tsuji

et al., 1997) ou 1,0 mg L^{-1} (Jones *et al.*, 1993) também permitirá destruição de microcistinas e nodularina.

É preciso garantir que "a água para consumo humano possa ser consumida com segurança durante toda a vida do consumidor, correspondendo assim a um elevado nível de protecção da saúde" (Proposta de Directiva 95/C 131/03 de 28 de Abril).

3.3.2 Locron S e Labufloc C 1210

As microcistinas detectadas e quantificadas nas pellets eram dos tipos designados por microcistina 1 e microcistina 2. As microcistinas presentes nos sobrenadantes eram do tipo 1 (ver no apêndice 3 a figura 6.5).

Pela análise da variância para a densidade celular (tabela 3.16), análise da variância para a quantidade de microcistinas por célula (tabela 3.17) e análise da variância para a concentração de microcistinas nos sobrenadantes (tabela 3.18), concluiu-se não existirem diferenças significativas entre as concentrações de Locron S + Labufloc C 1210, entre os tempos de contacto ou na interacção Locron S + Labufloc C 1210 x tempo de contacto. O teste-F "θ-ajustado" Huynh e Feldt introduziu alterações nos graus de liberdade e, no caso dos dados da densidade celular, nos p-values, mas sem implicar modificações nas conclusões obtidas através da análise da variância com base nas suposições usuais (tabelas 3.19 e 3.20).

Tabela 3.16 – Tabela ANOVA para os dados da densidade celular calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade; Loc – Locron S ; Lab – Labufloc C 1210)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Loc +Lab	3	0,04	0,56	0,6539
Erro	8	0,21		
WS				
Tempo	3	0,05	0,99	0,4160
Loc + Lab x Tempo	9	0,12	0,83	0,5991
Erro	24	0,39		

Tabela 3.17 – Tabela ANOVA para os dados da quantidade de MCYST por célula calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade ; Loc – Locron S ; Lab – Labufloc C 1210)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Loc + Lab	3	1798,63	2,21	0,2646
Erro	8	2170,77		
WS				
Tempo	3	426,23	1,01	0,3687
Loc + Lab x Tempo	9	1812,21	1,56	0,1847
Erro	24	3101,78		

Tabela 3.18 – Tabela ANOVA para os dados da concentração de MCYST no sobrenadante calculados a partir das suposições usuais (BS – between subjects ; WS – within subjects ; g.l. – graus de liberdade ; Loc – Locron S ; Lab – Labufloc C 1210)

Fonte de variação	g. l.	Soma de Quadrados	Valor-F	p-value
BS				
Loc + Lab	3	0,00012	3,82	0,5762
Erro	8	0,00007		
WS				
Tempo	3	0,00002	0,81	0,4988
Loc + Lab x Tempo	9	0,00005	0,86	0,5684
Erro	24	0,00014		

Tabela 3.19 – Tabela ANOVA para os dados da densidade celular com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" (Huynh e Feldt) ; Loc – Locron S ; Lab – Labufloc C 1210

Fonte de variação	g. l.	g- l. aproximados	Valor-F	p-value
BS				
Loc + Lab	3	Sem alteração	0,56	0,6539
Erro	8	Sem alteração		
WS				
Tempo	3	1,71	0,99	0,3976
Loc + Lab x Tempo	9	5,14	0,83	0,5519
Erro	24	13,70		

Tabela 3. 20 – Tabela ANOVA para os dados da quantidade de MCYST por célula com as respectivas correcções dos graus de liberdade para o teste-F "θ-ajustado" (Huynh e Feldt) ; Loc – Locron S ; Lab – Labufloc C 1210

Fonte de variação	g. l.	g- l. aproximados	Valor-F	p-value
BS				
Loc + Lab	3	Sem alteração	2,21	0,1646
Erro	8	Sem alteração		
WS				
Tempo	3	2,97	1,01	0,3687
Loc + Lab x Tempo	9	8,91	1,56	0,1847
Erro	24	23,77		

Apesar de se terem detectado microcistinas nos sobrenadantes após contacto com Locron S e Labufloc C 1210 (figura 3.18), a sua concentração não diferia significativamente da concentração inicial nem era estatisticamente diferente da obtida nos controlos durante o tempo que durou o ensaio. Parece, portanto, que estes floculantes não provocam grande libertação de microcistinas para o meio nem são causadores de degradação nestas toxinas, durante o tempo de contacto utilizado no processo de tratamento da água na ETA.

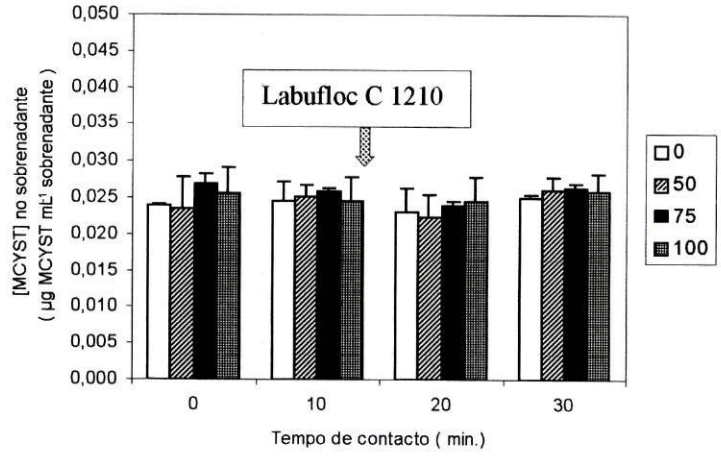


Figura 3.18 – Concentração de MCYST nos sobrenadantes do controlo e nas diferentes concentrações de Locron S testadas (50 mg L^{-1}, 75 mg L^{-1}e 100 mg L^{-1}), para os diferentes tempos de contacto (valores médios (n=3) ; I desvio padrão) ; encontra-se assinalado o momento da adição de Labufloc C 1210.

Como já foi referido relativamente à utilização de sulfato de alumínio, o uso de Locron S e Labufloc C 1210 como floculantes numa ETA não deverá aumentar o risco de contaminação da água de consumo com microcistinas, desde que as pequenas quantidades destas toxinas que são libertadas para a água sejam removidas através da utilização de carvão activado ou cloração (na dose ajustada).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo Vasconcelos e seus colaboradores (1995), a estirpe IZANCYA2 produz microcistina-LR (94,5%), microcistina-LA (4,7%) e [D-Asp^3]microcistina-LR (0,8%). No presente trabalho a maior parte das amostras só possuiam dois tipos de microcistinas, com um tempo de retenção de, respectivamente, 2,5 min. ±15% e 3,5 min. ±15%. Somente nos filtrados obtidos das culturas incubadas a 21,12 μmol m^{-2} s^{-1} se detectaram microcistinas com um tempo de retenção de 6,7 ±15%, ou seja, próximo do tempo de retenção da microcistina-LR padrão, mas mesmo assim podendo incluir variantes desta microcistina resultantes, por exemplo, de isomerização óptica ou desmetilação. Seria interessante isolar e purificar as microcistinas detectadas neste trabalho e realizar uma análise de aminoácidos e determinação do peso molecular. É possível que a estirpe IZANCYA2 tenha sofrido modificações ao longo destes anos em que foi laboratorialmente mantida em cultura.

A quantidade máxima de microcistina por célula detectada foi de 96,9 ±13,1 fg MCYST célula^{-1}, tendo sido obtida no 12° dia de incubação a 21, 12 μmol m^{-2} s^{-1}. Orr e Jones (1998), num estudo realizado com culturas estagnantes da estirpe MASH01-A19 de *M. aeruginosa* determinaram uma quantidade de microcistina por célula durante a fase exponencial, ou logo após o final desta, de 95 ± 9 fg célula^{-1}.

Este trabalho, assim como muitos existentes na literatura, vem salientar o efeito de factores ambientais, como a intensidade luminosa e a temperatura, em alterações de curto prazo na toxicidade de florescências naturais.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma influência pouco relevante dos coagulantes / floculantes testados (sulfato de alumínio, Locron S e Labufloc C 1210) na libertação de microcistinas para a água ou na degradação destas cianotoxinas. A remoção da maior parte das células cianobacterianas intactas permitirá assim reduzir significativamente a concentração de toxinas e outros metabolitos na água. Por isso, a eficiência do tratamento

subsequente será maior, juntamente com uma redução de custos ao minimizar as doses de oxidantes / carvão activado. Mas, quer na ETA piloto de Águas do Douro e Paiva S.A. quer na ETA de Marco de Canaveses, antes da etapa de coagulação / floculação é efectuada uma pré-desinfecção por ozonização (apêndice 1). Este processo provoca lise das células cianobacterianas e, assim sendo, a floculação só vai remover os fragmentos celulares e não as toxinas.

O planeamento experimental revelou algumas lacunas. Nas experiências com diferentes intensidades luminosas e diferentes temperaturas, o plano de amostragem mostrou-se inadequado; um intervalo de recolha de amostras de 4 dias é demasiado extenso, podendo possivelmente ocultar dados importantes sobre a libertação e a degradação das microcistinas. As intensidades luminosas e as temperaturas utilizadas nestas experiências deveriam abranger uma gama maior.

A recolha de alíquotas implica diminuição do volume da cultura, acarretando variação na intensidade luminosa e temperatura a que a restante cultura fica sujeita. A dispersão da luz e a absorção selectiva, de determinados comprimentos de onda, determinam a irradiação luminosa média numa cultura, podendo existir diferenças consideráveis entre a superfície da cultura e o seu centro consoante o volume de cultura utilizado, particularmente em culturas densas.

A utilização de culturas estagnantes implica também variação na idade da cultura e alteração do meio de cultura, o que se pode evitar com a utilização de culturas contínuas. Watanabe e colaboradores (1989) verificaram que as concentrações relativas de MCYST-LR, MCYST-RR e MCYST-YR podem variar com a idade da cultura de *M. aeruginosa*.

Sob condições laboratoriais a estirpe de *M. aeruginosa* IZANCYA2 permanece na forma de células isoladas ou duas células ligadas durante o final da divisão celular, mas nas águas naturais as células de *Microcystis* sp. ficam agregadas após a divisão celular, formando grandes colónias. Haverá certamente diferenças na resposta à variação de factores ambientais. Jungman e colaboradores (1996 *in* Song *et al.*, 1998) mostraram que a concentração de microcistinas estava intimamente correlacionada com o tamanho da colónia da estirpe de *Microcystis* em estudo, revelando a possível existência de mais um factor envolvido na produção de toxinas, que também poderá influenciar a libertação das microcistinas.

Deve-se ainda salientar o facto de as culturas de *M. aeruginosa* no presente estudo terem sido incubadas, sob as diferentes condições experimentais testadas, quando se

encontravam no final da fase de crescimento exponencial e, portanto deverá existir diminuição dos constituintes do meio de cultura. Uma deficiência em azoto, por exemplo, causa uma diminuição significativa da toxicidade em *Microcystis*, enquanto que uma deficiência em fósforo tem uma pequena influência na toxicidade (Codd & Poon, 1988 *in* Rapala, 1998). Quantidades limitantes de elementos traço (Lukač e Aegerter, 1993 *in* Orr & Jones, 1998) induzem uma diminuição da toxicidade.

5. CONCLUSÕES

Com base nas experiências realizadas neste trabalho poder-se-á concluir o seguinte :

- Na experiência com diferentes intensidades luminosas, o valor médio global máximo de toxicidade 60,38 ±6,41 fg MCYST célula^{-1} (expresso em quantidade de toxina por célula) foi obtido com a intensidade luminosa 1,03 µmol m^{-2} s^{-1}, que é inferior àquela a que correspondia o valor máximo de taxa de crescimento (5,75 µmol m^{-2} s^{-1}), mas o valor máximo de microcistinas totais (nas células e no meio de cultura) foi atingido ao 28° dia de incubação a 21,12µmol m^{-2} s^{-1}.

- Nas culturas incubadas a 21,12 µmol m^{-2} s^{-1} (intensidade luminosa máxima testada) obteve-se uma degradação de microcistinas de 14,1% entre os dias 16 e 20 e de 52,9% entre os dias 20 e 24 do período de incubação. A variação da concentração de microcistinas nos filtrados apresentou uma correlação negativa com a taxa de crescimento.

- Nas culturas colocadas a 5,75 µmol m^{-2} s^{-1}, a 2,55 µmol m^{-2} s^{-1}, a 1,03 µmol m^{-2} s^{-1} e na obscuridade registou-se uma degradação completa nos primeiros quatro dias de incubação, a uma taxa de 0,026 µg mL^{-1} d^{-1}, não se tendo detectado posteriormente toxinas no meio.

- Na experiência com diferentes temperaturas, o valor médio global máximo de toxicidade (expresso em quantidade de toxina por célula), 64,59 ±6,64 µmol m^{-2} s^{-1}, verificou-se a 21 °C, enquanto que o valor máximo para a taxa de crescimento se registou para a temperatura mais elevada da gama testada (28 °C).

- A libertação de microcistinas para o meio e a sua degradação ocorreu mais cedo nas culturas incubadas a 21 °C e 23 °C.

- Verificou-se uma correlação negativa entre a taxa de crescimento e a concentração de microcistinas no meio de cultura em todas as temperaturas testadas.

- O sulfato de alumínio provocou uma ligeira libertação de microcistinas para o meio.

- Os floculantes Locron S e Labufloc C 1210 não são responsáveis por libertação significativa de microcistinas para o meio nem são causadores de degradação destas toxinas, durante o tempo de contacto utilizado no processo de tratamento da água na ETA.

- A utilização de sulfato de alumínio ou de Locron S e Labufloc C 1210 no tratamento de água para consumo humano não acarretará riscos para a Saúde Pública se as ETA que os utilizam possuirem, incorporadas no seu sistema de tratamento, etapas subsequentes que permitam eliminar as pequenas quantidades de microcistinas libertadas, como, por exemplo, adsorção com carvão activado.

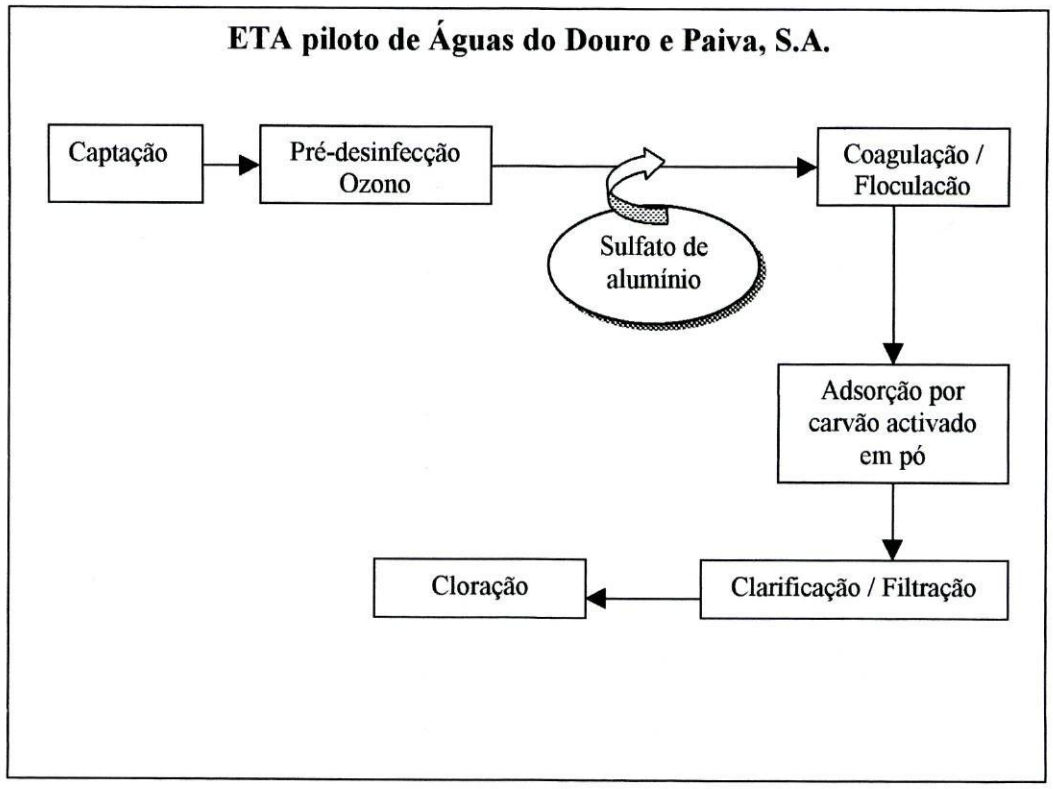
- Os resultados obtidos neste trabalho e noutros estudos do mesmo âmbito tornam premente a necessidade de se efectuarem estudos laboratoriais com culturas contínuas e estudos de campo, nomeadamente em ETA piloto, para melhor averiguar a influência dos factores ambientais e dos seus co-efeitos (nomeadamente intensidade luminosa-temperatura) na libertação e degradação de cianotoxinas.

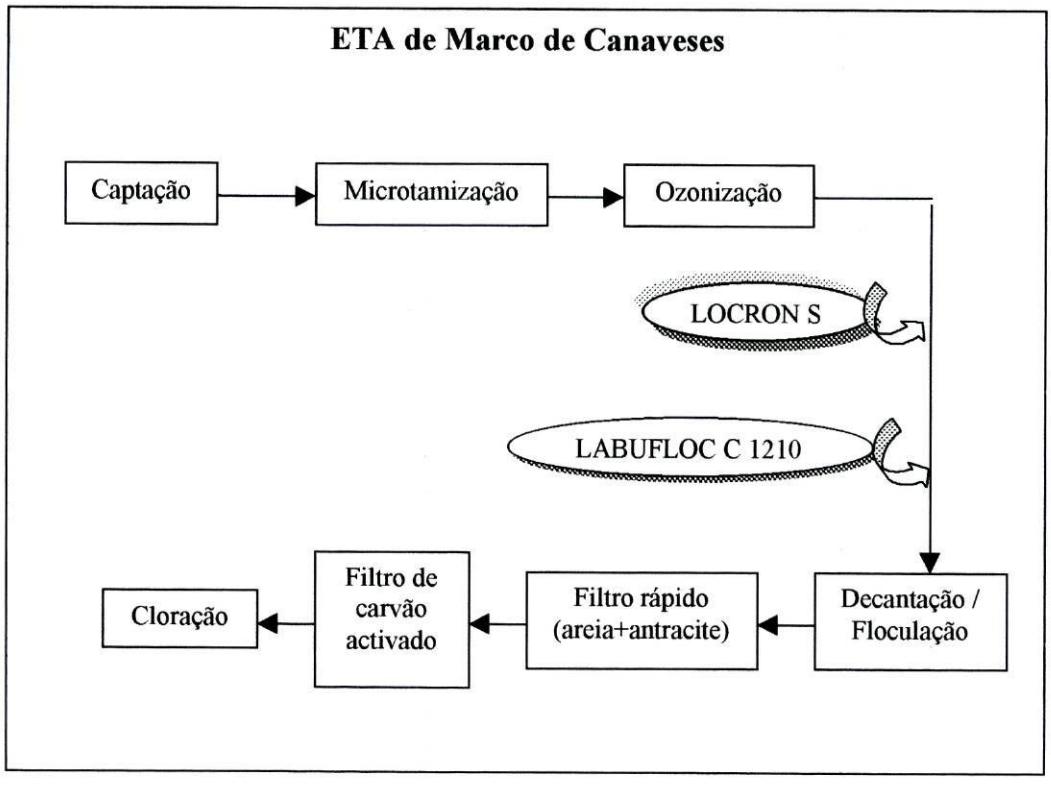
- Seria importante isolar as diferentes microcistinas detectadas neste estudo e realizar uma análise de aminoácidos e/ou espectrometria de massa para a sua identificação, assim como averiguar da sua toxicidade, através de bioensaios ou inibição de fosfatases proteicas.

6. APÊNDICES

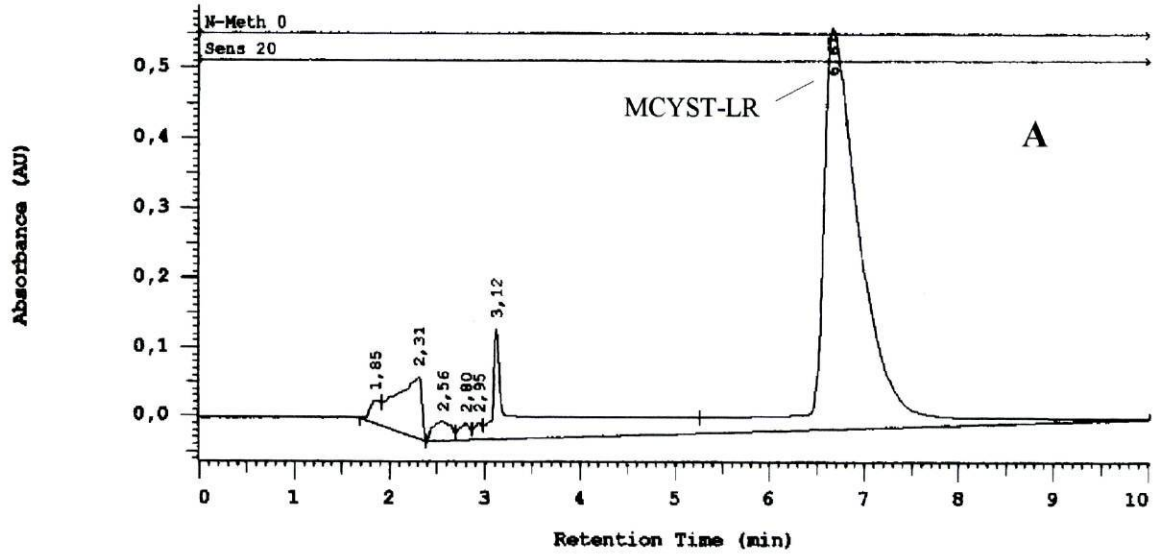
6.1 Apêndice 1

Esquemas de Tratamento da ETA piloto de Águas do Douro e Paiva, S.A. e ETA de Marco de Canaveses





6.2 Apêndice 2



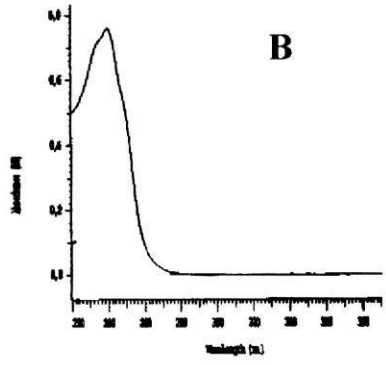


Figura 6.1 – Cromatograma obtido no sistema HPLC (A) para a microcistina-LR padrão e espectro UV (B). Coluna: SpherisOrb S10 ODS2 25cm x 4,6 mm Fase móvel: acetonitrilo / acetato de amónio 0,01M (26/74 , v/v) Fluxo: 1 mL min^{-1} Detecção : 238-240 nm

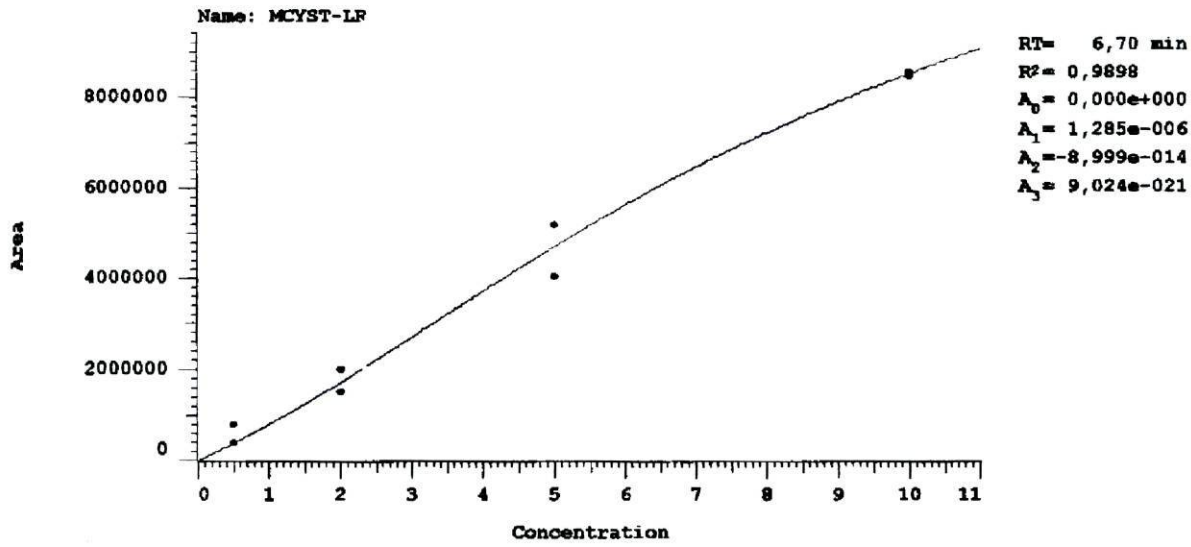


Figura 6.2 - Curva de calibração obtida por injecção de quatro concentrações diferentes de microcistina-LR padrão.

6.3 Apêndice 3

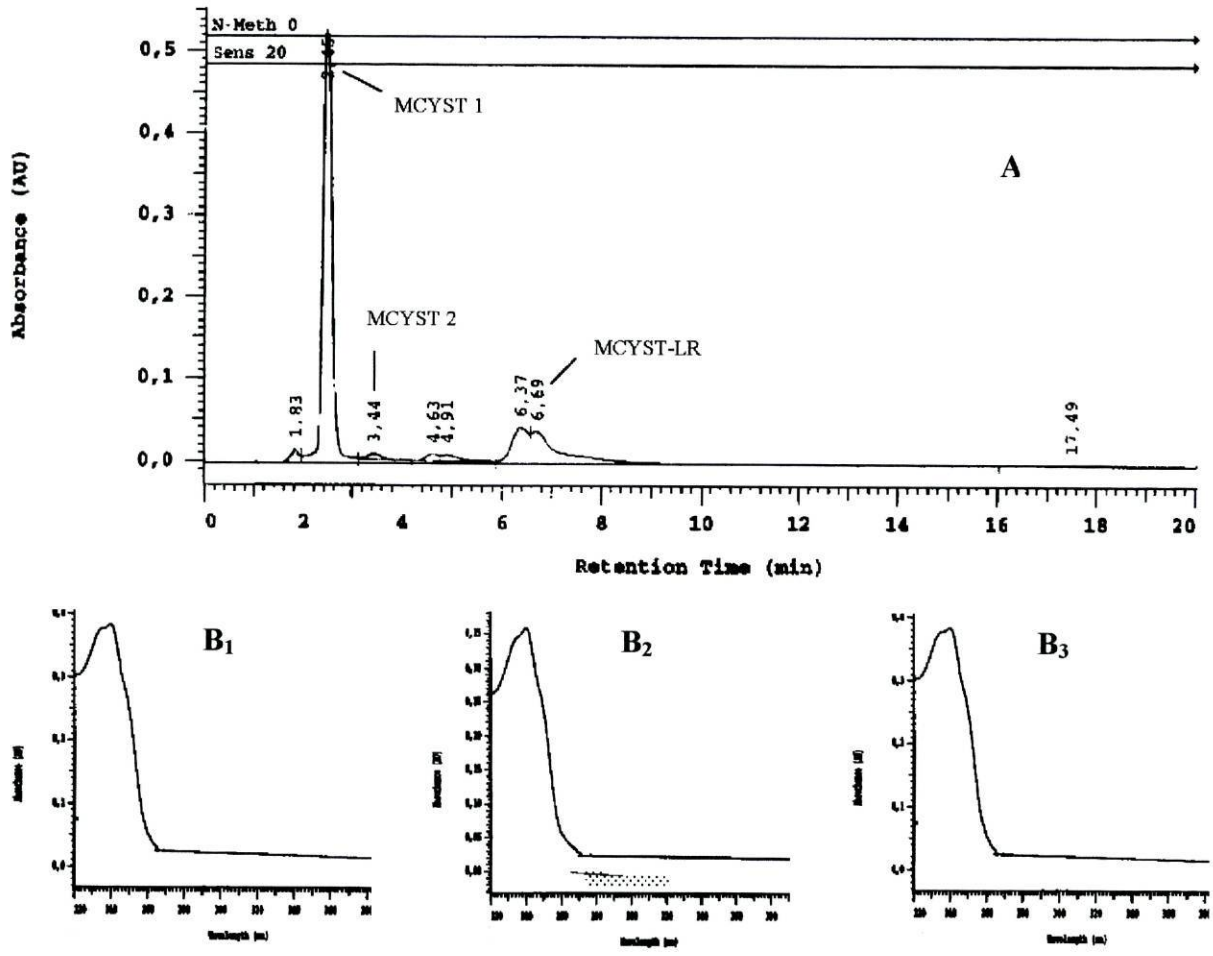


Figura 6.3 – Cromatograma obtido no sistema HPLC (A) para um filtrado das culturas incubadas a 21,12 µmol m^{-2} s^{-1} e espectro UV de microcistina 1 (B_1), microcistina 2 (B_2) e microcistina-LR (B_3). Coluna : SpherisOrb S10 ODS2 25cm x 4,6 mm Fase móvel: acetonitrilo / acetato de amónio 0,01M (26/74 , v/v) Fluxo : 1 mL min^{-1} Detecção : 238-240 nm

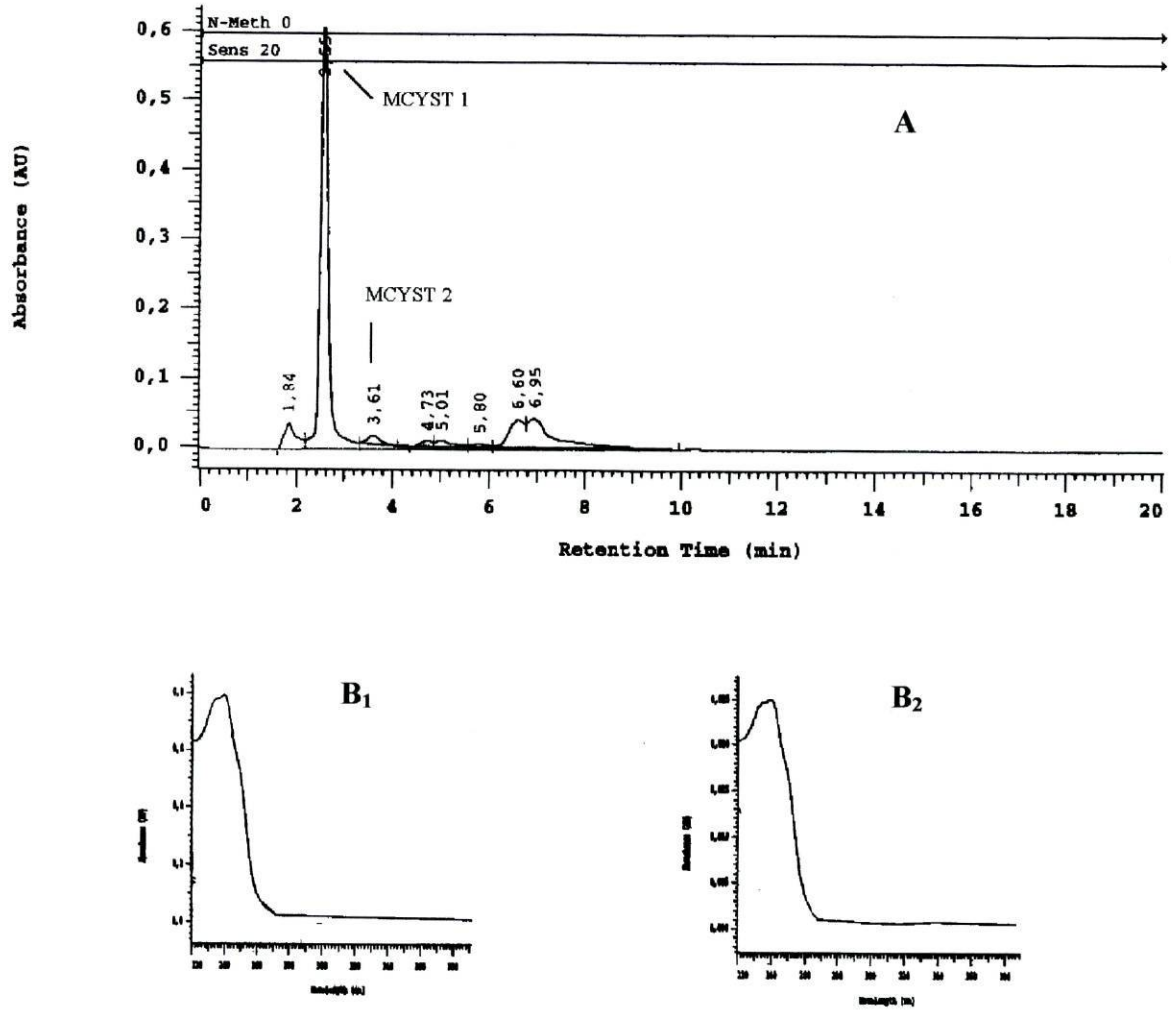


Figura 6.4 – Cromatograma obtido no sistema HPLC (A) para um filtrado das culturas incubadas a diferentes temperaturas e espectro UV de microcistina 1 (B_1), microcistina 2 (B_2). Coluna : SpherisOrb S10 ODS2 25cm x 4,6 mm Fase móvel : acetonitrilo/acetato de amónio 0,01M (26/74 , v/v) Fluxo : 1 mL min^{-1} Detecção : 238-240 nm

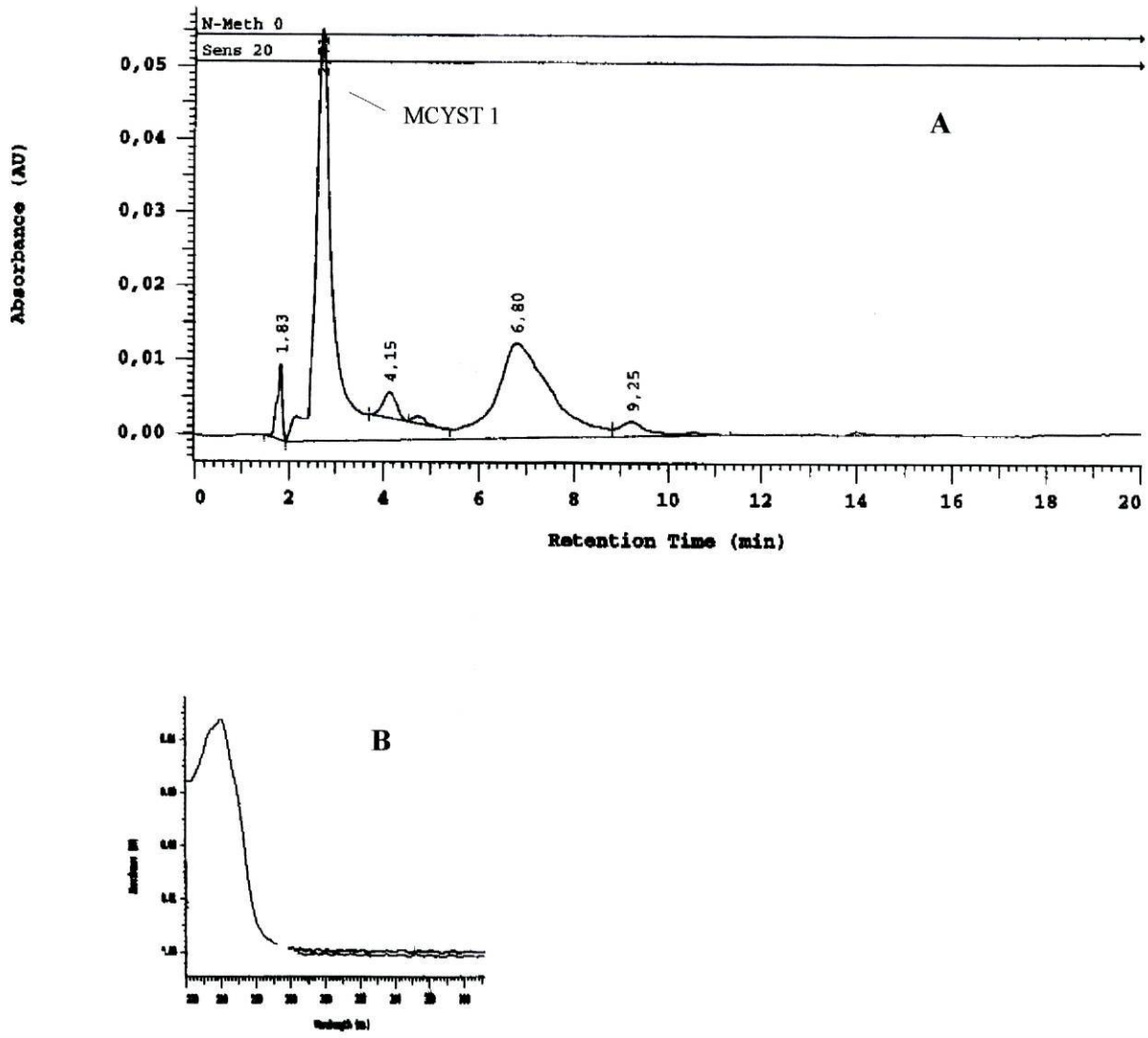


Figura 6.5 – Cromatograma obtido no sistema HPLC (A) para um filtrado dos ensaios com diferentes concentrações de Locron S + Labufloc C 1210 e espectro UV de microcistina 1 (B). Coluna : SpherisOrb S10 ODS2 25cm x 4,6 mm Fase móvel : acetonitrilo/acetato de amónio 0,01M (26/74 , v/v) Fluxo : 1 mL min^{-1} Detecção : 238-240 nm

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo, S.M.F.O., Evans, W.R., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M., 1994. First Report of Microcystins from a Brazilian Isolate of Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. App. Phycol. 6 : 261-265.

Berg, K., Skulberg, O.M. & Skulberg, R., 1987. Effects of Decaying Toxic Blue-green Algae on Water Quality - A Laboratory Study. Arch. Hydrobiol. (108) 4 : 549-563.

Bergman, B., Matveyev, A. & Rasmussen, U., 1996. Chemical Signalling in Cyanobacterial-Plant Symbiosis. Trends in Plant Science. (1) 6 : 191-197.

Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L., Jones, A., Negri, A.P. & Riddles, P., 1996. Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR. Applied and Environ. Microbiology. (62) 11 : 4086-4094.

Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria Secondary Metabolites – the Cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. 72 : 445-459.

Carmichael, W.W., 1994. The Toxins of Cyanobacteria. Scientific American. Janeiro 1994. 64-72.

Carmichael, W.W., 1996. Toxic *Microcystis* and the Environment. *In* Toxic *Microcystis* . Eds. Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Carmichael, W.W. & Fujiki, H. CRC Press. 1-11.

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

Carmichael, W. W., An, J.S., Azevedo, S.M.F.O., Lau, S., Rinehart, K.L., Jochimsen, E.M., Holmes, C.E.M. & da Silva, J.B., 1996. Analysis for Microcystins Involved in Outbreak of Liver Failure and Death of Humans at a Hemodialysis Center in Caruaru, Pernambuco Brazil. Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia. 85-86.

Carmichael, W.W., Beasley, V., Bunner, D.L., Ellof, J.L., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.-I., Krishnamurthy, T., Yu, M.-J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M. & Watanabe, M., 1988. Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria (Blue-green Algae). Toxicon. 26 : 971-973.

Codd, G.A., 1998. Cyanobacterial Blooms and Toxins in Fresh-, Brackish and Marine Waters. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comission of Unesco. 13-17.

Codd, G. A. & Beattie, K. A., 1991. Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins : Awareness and Action in the United Kingdom. Proceedings of a Seminar. PHLS Microbiology Digest. London. 82-86.

Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A. & Sutton, A., 1996. Biodegradation of Microcystin-LR by Indigenous Mixed Bacterial Populations. Wat. Res. (30) 2 : 481-485.

Decreto-Lei 176/98. Diário da República. Série I-A. 1 de Agosto de 1998.

Donati, C., Drikas, M., Hayes, R. & Newcombe, G., 1994. Microcystin-LR Adsorption by Powdered Activated Carbon. Wat. Res. (28) 8 : 1735-1742.

Drikas, M., 1994. Removal of Cyanobacterial Toxins by Water Treatment Processes. *In* Symposium Toxic Cyanobacteria – a Global Perspective. Australian Centre for Water Quality Research. 30-43.

Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriuloto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y.-G. & Hartshorne, D., 1990. Hepatocyte Deformation Induced by Cyanobacterial Toxins Reflects Inhibition of Protein Phosphatases. Biochem.Biophys. Res. Commun. 3 : 1347-1353.

Falconer, I.R., 1991. Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. Envir. Toxic. And Water Quality. 6 : 177-184.

Falconer, I.R., 1998. Toxic Cyanobacteria in Drinking Water Supplies. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comission of Unesco. 37-38.

Falconer, I.R., Beresford, A.M. & Runnegar, M.T.C. 1983. Evidence for Liver Damage by Toxin from a Bloom of the Blue-green Alga *Microcystis aeruginosa*. Med. Journal Austr. 1 : 511-514.

Falconer, I.R., Choice, A. & Hosja, W. 1992. Toxicity of Edible Mussels (*Mytilus edulis*) Growing Naturally in an Estuary during a Waterbloom of the Blue-green Alga *Nodularia spumigena*. Env. Toxicol. Water Quality : An International Journal. 7 : 119-123.

Falconer, I.R., Burch, M.D., Steffensen, D.A., Choice, M. & Coverdale, O R., 1994. Toxicity of the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in Drinking Water to Growing Pigs, as an Animal Model for Human Injury and Risk Assessment. Env. Toxic. and Water Quality. 9 :131-139.

Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M. & Codd, G.A., 1999. Safe Levels and Safe Practices. *In* Chorus, I. & Bartram, J. Eds. Toxic Cyanobacteria in Water – a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. World Health Organization.

Ferreira, F., Franco, J-M., Fidalgo, M-L. & Fernandez-Vila, P., 1995. Detection of PSP-toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) Collected in the Crestuma/Lever Reservoir (Douro River, Northern Portugal) pp.24 *In* Abstracts of Symposium Eutrophication, Causes, Consequences and Remediation, Porto, Portugal.

Guimarães, R. C. & Cabral, J. A. S., 1997. Estatística. Ed. McGraw-Hill de Portugal. pp. 621.

Harada, K.-I., 1996. Chemistry and Detection of Microcystins. *In* Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Carmichael, W.W. & Fujiki, H. Eds. Toxic *Microcystis*. CRC Press. 103-148.

Harada, K.-I, Ohtani, K., Iwamoto, M., Suzuki, M.F., Watanabe, M.F., Watanabe, M. & Terao, K., 1994. Isolation of Cylindrospermopsin from a Cyanobacterium *Umezakia natans* and its Screening Method. Toxicon. 32 : 73-84.

Henriksen, P., 1996. Toxic Cyanobacteria / Blue-green Algae in Danish Freshwater. Ph.D.Thesis. Dept. of Phycology. Botanical Institute. University of Copenhagen. pp. 43.

Henriksen, P., 1996. Microcystin Profiles and Contents in Danish Populations of Cyanobacteria / Blue-green Algae as Determined by HPLC. Phycologia. (35) (suplemento 6) 102-110.

Hesse, K., Woitke, P., Kohl, J.-G., 1998. Physiological State and Microcystins Concentration on Different Strains of *Microcystis aeruginosa*. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comission of Unesco. 333-336.

Hiirsvirta, L. & Lahti, K., 1990. The Effect of Ozonation and Biological Filtration on the Removal of Cyanobacterial Toxins.

Hoffmann, J. R. H., 1976. Removal of *Microcystis* Toxins in Water Purification Processes. Water S . (2) 2 : 58-60.

Hunter, P. R. & Roberts, C., 1991. Human Illness Associated with Freshwater Cyanobacteria (Blue-Green Algae). Proceedings of a Seminar. PHLS Microbiology Digest. London. 96-100.

Jones, G.J. & Orr, P.T., 1994. Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of a *Microcystis aeruginosa* Bloom in a Recreational Lake, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Inhibition Assay. Wat. Res. (28) 4 : 871-876.

Jones, G.J., Falconer, I.R. & Wilkins, R.M., 1995. Persistence of Cyclic Peptide Toxins in Dried *Microcystis aeruginosa* Crusts from Lake Mokoan, Australia. Environmental Toxicology and Water Quality : An International Journal. 10 : 19-24.

Jones, G., Minato, W., Craig, K. & Naylor, R., 1993. Removal of Low Level Cyanobacterial Peptide Toxins from Drinking Water Using Powdered and Granular Activated Carbon and Chlorination – Results of Laboratory and Pilot Plant Studies. Proceedings of Australian Water and Wastewater Association 15 th Federal Convention.

Jones, G.J., Bourne, D.G., Blakeley, R.L. & Doelle, H., 1994. Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by Aquatic Bacteria. Natural Toxins. 2 : 228-235.

Keevil, C. W., 1991. Toxicology and Detection of Cyanobacterial (Blue-Green Alga) Toxins. Proceedings of a Seminar. PHLS Microbiology Digest. London. 91-95.

Keijola, A.M., Himberg, K., Esala, A.L., Sivonen, K. & Hiisvirta, L., 1988. Removal of Cyanobacterial Toxins in Water Treatment Processes : Laboratory and Pilot-Scale Experiments. Toxicity Assessment : An Intern. Journal. 3 : 643-656.

Keleti, G., Sykura, J.L., Lippy, E.C. & Shapiro, M.A., 1979. Composition and Biological Properties of Lipopolysaccharides Isolated from *Schizothrix calcicola* Gomont (Cyanobacteria). Appl. Environ. Microbiol. 38 : 471-477.

Kirivanta, J., Sivonen, K., Lahti, K., Luukkainen, R. & Niemelä, S.I., 1991. Production and Biodegradation of Cyanobacterial Toxins – a Laboratory Study . Arch. Hydrobiol. (121) 3 : 281-294.

Kotai, J., 1972. Instructions for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae. Norwegian Institute for Water Research. Publicação B-11/69. Oslo. pp. 5.

Lahti, K., Kilponen, J., Kivimäki, A.-L. & Erkomaa, K., 1996. Removal of Cyanobacteria and their Hepatotoxins from Raw Water in Soil and Sediment Columns. Artificial Recharge of Groundwater, NHP – report. 38 : 187-195.

Lahti, K., Niemi, M.R., Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Biodegradation of Cyanobacterial Hepatotoxins – Characterization of Toxin Degrading Bacteria. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comission of Unesco. 363-365.

Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M. & Sivonen, K., 1997. Persistence of Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR in Particulate Material and Dissolved in Lake Water. Wat. Res. (31) 5 : 1005-1012.

Lam, A. K.-Y., Prepas, E.E., Spink, D. & Hrudey, S.E., 1995. Chemical Control of Hepatotoxic Phytoplankton Blooms : Implications for Human Health. Wat. Res. (29) 8 : 1845-1854.

Lambert, T.W., Holmes, C.F.B. & Hrudey, S.E., 1996. Adsorption of Microcystin-LR by Activated Carbon and Removal in Full Scale Water Treatment. Wat. Res. (30) 6 : 1411-1422.

Lawton, L.A., Edwards, C. & Codd, G.A., 1994. Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. Analyst. 119 : 1525-1530.

Lawton, L.A., Cornish, B.J.P.A. & MacDonald, A.W.R., 1998. Removal of Cyanobacterial Toxins (Microcystins) and Cyanobacterial Cells from Drinking Water Using Domestic Water Filters. Wat. Res. (32) 3 : 633-638.

Lehtimäki, J., Sivonen, K., Luukkainen, R. & Niemelä, S.I., 1994. The Effects of Incubation Time, Temperature, Ligth, Salinity and Phosphorus on Growth and Hepatotoxin Production by *Nodularia* Strains. Arch. Hydrobiol. (130) 3: 269-282.

Lindholm, T., Eriksson, J.E., Reinikainen, M. & Meriluoto, J.A.O., 1992. Ecological Effects of Hepatotoxic Cyanobacteria. Environ. Toxicology and Water Quality: An International Journal. 7 : 87-93.

MacKintosh, C. & Makintosh, R.W., 1994. The Inhibition of Protein Phosphatases by Toxins : Implications for Health and an Extremely Rapid Bioassay for Toxin Detection. *In* Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W. & Potters, E. (Ed.). Detection Methods for Cyanobacterial Toxins. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.

Magalhães, V.F. & Azevedo, S.M.F.O., 1998. Ecological Implications of Hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in the Jacarepaguá Lagoon, Brazil. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comission of Unesco. 26-28.

Mahakhant, A., Sano, T., Ratanachot, P., Tong-a-ram, T., Srivastava, V.C., Watanabe, M.M. & Kaya, K., 1998. Detection of Microcystins from Cyanobacterial Water Blooms in Thailand Fresh Water. Phycological Research. 46 (Supl.) : 25-29.

Meriluoto, J.A.O. & Eriksson, J.E., 1988. Rapid Analysis of Peptide Toxins in Cyanobacteria. Journal of Chromatography. 438 : 93-99.

Moisés, A., Noronha, V., Oliveira, D. & Portugal, L., 1996. Programa de Monitorização de Cianobactérias - Albufeiras de Coruche e de Salvaterra de Magos. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos.

Namikoshi, M. & Rinehart, K.L., 1996. Bioactive Compounds Produced by Cyanobacteria. Journal of Industrial Microbiology. 17 : 373-384.

Nicholson, B. C., Rositano, J. & Burch, M.D., 1994. Destruction of Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins by Chlorine and Chloramine. Wat. Res. (28) 6 : 1297-1303.

Nicholson, B.C., Rositano, J., Humpage, A.R. & Burch, M.D., 1993. Removal of Algal Toxins in Water Treatment Processes. Australian Water & Wastewater Association. 15 th Federal Convention. Austrália.

Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W. & Fujiki, H., 1992. Liver Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118 : 420-424.

Ohtani, I., Moore, R.E. & Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin, a Potent Hepatotoxin from the Blue-green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J.Am.Chem. Soc. 114 : 7041-7942.

Oliveira, M.R.L. & Monteiro, M.T., 1993. Caracterização Biológica do Sistema de Abastecimento de Água a Évora. Relat. Técn. Cient. INP Lisboa 68. pp. 43.

Orr, P.T. & Jones, G.J., 1998. Relationship between Microcystin Production and Cell Division Rates in Nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* Cultures. Limnol. Oceanogr. (37) 7 : 1604-1614.

Oudra, B., Loudiki, M., Sbiyyaa B., Vasconcelos, V., Zerrouk, H., Dadi, M. & Darley, J., 1998. Ocurrence of Hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* Waterblooms in a Eutrophic Moroccan Lake Reservoir. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comission of Unesco. 29-31.

Pereira, E.G.M., 1998. Avaliação do Estado de Eutrofização do Rio Tâmega (troço Amarante – Entre-os-rios). Ocorrência de Cianobactérias Tóxicas. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada Apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. pp. 100.

Peterson, H.G., Hrudey, S.E., Cantin, I.A., Perley, T.R. & Kenefick, S.L., 1995. Physiological Toxicity, Cell Membrane Damage and the Release of Dissolved Organic Carbon and Geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after Exposure to Water Treatment Chemicals. Wat. Res. (29) 6 : 1515-1523.

Proposta de Directiva 95/C 131/03 de 28 de Abril. Jornal Oficial das Comunidades Europeias nº C131 de 30 de Abril de 1995.

Rapala, J., 1998. Toxin Production by Freshwater Cyanobacteria : Effects of Environmental Factors. Dissertation in Microbiology. Departament of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki. Finlândia. pp. 63.

Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K. & Niemelä, S.I., 1994. Biodegradability and Adsorption on Lake Sediments of Cyanobacterial Hepatotoxins and Anatoxin-a. Letters in Applied Microbiology. 19 : 423-428.

Raziuddin, S., Siegelman, H.W. & Tornabene, T.G., 1983. Lipopolysaccharides of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. European J. Biochemistry. 137 : 333-336.

Rinehart, K.L., Namikoshi, M. & Choi, B.W., 1994. Structure and Biosynthesis of Toxins from Blue-green Algae (Cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 6 : 159-176.

Runnegar, M.T.C., Falconer, I.R., Jackson, R.B. & McInnes, A., 1983. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* Cultures. Toxicon. 3 (suplemento) : 377-380.

Schopf, J.W., 1994. Disparate Rates, Differing Fates : Tempo and Mode of Evolution Changed from the Precambrian to the Phanerozoic. Proc. Natl.Acad. Sci. 91 : 6735-6742.

Shi, L., Carmichael, W.W. & Miller, I., 1994. Immuno-gold Localization of Hepatotoxins in Cyanobacterial Cells. Arch. Microbiol.

Sivonen, K., 1990. Effect of Ligth, Temperature, Nitrate, Orthophosphate and Bacteria on Growth and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2658-2666.

Sivonen, K., 1996. Cyanobacterial Toxins and Toxin Production. Phycologia. 35 (suplemento 6) : 12-24.

Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I., Poon, G.K. & Codd, G.A., 1989. Preliminary Characterization of Neurotoxic Cyanobacteria Blooms and Strains from Finland. Toxic. Assess. 4 : 339-352.

Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A. & Skulberg, R., 1993. Taxonomy of Toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria) *In* Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Falconer, I.R. . Academic Press . 145-164.

Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M.M., Liu, Y. & Kaya, K., 1998. Microcystin Production of *Microcystis viridis* (Cyanobacteria) under Different Culture Conditions. Phycological Research. 46 (suplemento) : 19-23.

Stotts, R.R., Namikoshi, W.M., Haschek, K.L., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M. & Beasley, V.R., 1993. Structural Modifications Imparting Reduces Toxicity in Microcystins from *Microcystis* sp. Toxicon. 31 : 783-789.

Takahashi, S. & Kaya, K., 1993. Quail Spleen is Enlarged by Microcystin-RR as a Blue-green Algal Hepatotoxin. Natural Toxins. 1 : 283-285.

Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, F., Suzuki, M. & Harada, K. 1994. Stability of Microcystins from Cyanobacteria : Effect of Ligth on Decomposition and Isomerization. Environ. Sci. Technol. 28 : 173-177.

Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H. & Harada, K.-I., 1997. Stability of Microcystins from Cyanobacteria – IV. Effect of Chlorination on Decomposition. Toxicon. (35) 7 : 1033-1041.

Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.-D., Chen, G.-C., Chen, G. & Yu, S.-Z., 1996. Detection of Microcystins, a Blue-green Algal Hepatotoxin, in Drinking Water Sampled in Haimen and Fusui, Endemic Areas of Primary Liver Cancer in China, by Highly Sensitive Immunoassay. Carcinogenesis. vol. 17, 6 : 1317-1321.

Utkilen, H. & Gjølme, N., 1992. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* as a Function of Ligth in Continuous Cultures and its Ecological Significance. Appl. Envir. Microbiol. 58 : 1321-1325.

Van der Westhuizen, A.J. & Eloff, J.N., 1983. Effect of Culture Age and pH of Culture Medium on the Growth and Toxicity of the Blue-green Alga *Microcystis aeruginosa*. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 110 : 157-163.

Van der Westhuizen, A.J. & Eloff, J.N., 1985. Effect of Temperature and Light on the Toxicity and Growth of the Blue-green Alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). Planta. 163 : 55-59.

Van Liere, L. & Walsby, A.E., 1982. Interations of Cyanobacteria with Light. *In* Carr, N.G. & Whitton, B.A. The Biology of Cyanobacteria. Blackwell Scientific Publications. 9-45.

Vasconcelos, V. M., 1992. Toxicidade de "Blooms" de Cianobactérias em Águas Portuguesas. Impacto na Saúde Pública e Medidas de Prevenção. Actas da 3ª Conferência Nacional sobre Qualidade do Ambiente. vol. I : 338-345. Aveiro.

Vasconcelos, V. M., 1994. Uptake and Depuration of the Heptapeptide Toxin Microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology. 32 : 227-237.

Vasconcelos, V. M., 1995. Toxicologia de Cianobactérias. Distribuição de Cianobactérias Tóxicas e suas Toxinas em Águas Doces Portuguesas. Bioacumulação em Bivalves. Dissertação para a Obtenção do Grau de Doutor em Ecologia Aplicada Apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. pp. 137.

Vasconcelos, V. M., Evans, W.R., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M., 1993. Isolation of Microcystin-LR from a *Microcystis* (Cyanobacteria) Waterbloom Colected in the Drinking Water Reservoir for Porto, Portugal. J. Environ. Sci. Health. 28 : 2081 : 2094.

Vasconcelos, V. M., Sivonen, K., Evans, W. R., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M., 1996. Hepatotoxic Microcystin Diversity in Cyanobacterial Blooms Collected in Portuguese Freshwaters. Wat. Res. (30) 10 : 2377-2384.

Vieira, P. A. 1994. Contributo para um Sistema de Controlo da Qualidade da Água para Consumo Humano em Portugal. Actas da 4ª Conferência Nacional sobre Qualidade do Ambiente : 142-150. Lisboa.

Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Matsuura, K., Watanabe, M. & Suzuki, M., 1989. Heptapeptide Toxin Production During the Batch Culture of Two *Microcystis* species (Cyanobacteria). Journal of Applied Phycology. 1 : 161-165.

Watanabe, M.F., Oishi, S., Harada, K.-I., Matsuura, K., Kawai, H. & Suzuki, M., 1985. Toxins Contained in *Microcystis* Species of Cyanobacteria (Blue-green Algae). Toxicon. 26 : 1017-1025.

Welker, M. & Steinberg, C., 1999. Indirect Photolysis of Cyanotoxins : One Possible Mecanism for their Low Persistence. Wat. Res. vol. 33, 5 : 1159-1164.