

PAULO JORGE BATALHA GONÇALVES

Ocorrência e ecotoxicologia de cianobactérias em
praias da costa litoral centro de Portugal



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

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2001

PAULO JORGE BATALHA GONÇALVES

Ocorrência e ecotoxicologia de cianobactérias em
praias da costa litoral centro de Portugal



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

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2001

“ Se não receio o erro, é só
porque estou sempre pronto
a corrigi-lo.”

Bento de Jesus Caraças

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho é com profundo reconhecimento que agradeço:

- ao Prof. Doutor Vítor Vasconcelos, orientador científico desta dissertação e principal responsável pelo meu interesse no estudo das cianobactérias, a sua preciosa orientação científica, a leitura criteriosa dos textos e a inestimável disponibilidade;
- à Direcção do Departamento de Zoologia e Antropologia, as condições de trabalho concedidas;
- à Mestre Rosário Martins, todo o apoio na identificação de cianobactérias, na análise das preparações histológicas e nos testes toxicológicos com Artémia, assim como a seus preciosos conselhos;
- à Mestre Elisa Pereira, todo o apoio na realização e interpretação dos testes E.L.I.S.A.;
- à Mestre Isabel, toda ajuda prestada nos trabalhos de laboratório;
- à Dr.^a Manuela Cerqueira, o seu auxílio na dissecação dos murganhos;
- ao Doutor Martin Saker, o seu auxílio na identificação das cianobactérias;
- à D. Maria Helena, o precioso apoio na elaboração das preparações histológicas;
- ao Prof. Dr^o Douglas Capone a simpatia e a prontidão com que me enviou alguns dos seus artigos e fotografias;
- a todos os colegas de mestrado, a amizade e o bom ambiente de trabalho criado;
- a todos os meus amigos, a sua amizade e incentivo;
- à minha mulher, todo o carinho, compreensão e paciência que demonstrou, durante a “viagem” que trilhamos em conjunto;
- por último, aos meus pais e restante família, o incentivo e o apoio prestado durante todo o curso, e pelo carinho e ensinamentos dispensados ao longo da vida.

RESUMO

As cianobactérias vêm sendo alvo de sucessivas investigações, porque a sua presença no planeta se faz sentir há três mil milhões de anos e porque revelam uma notável ubiquidade. Os estudos têm incidido particularmente nas espécies de água doce uma vez que, hoje em dia, e cada vez mais devido à poluição aquática, constituem um risco para a saúde humana e ambiental.

No que diz respeito às cianobactérias marinhas, e no que concerne à sua presença nas praias portuguesas e à avaliação da sua possível toxicidade, poucos têm sido os trabalhos realizados.

Por essa razão, foram objectivos do presente trabalho: a pesquisa, identificação, isolamento e cultura de cianobactérias marinhas; e a avaliação da toxicidade dos microorganismos cultivados, na sequência da investigação encetada por Martins, em 1999.

Nesse sentido foram escolhidas quatro praias da zona centro do país: ESPINHO, MIRA, CABEDELLO (Figueira da Foz) e SÃO PEDRO DE MOEL.

Do total de amostras recolhidas em cada uma das praias, verificou-se a percentagem de ocorrência de 35,9 %, 50 %, 36,8 % e 56,6 %, respectivamente para as praias de Espinho, Mira, Cabedelo (Figueira da Foz) e São Pedro de Moel.

De todas as cianobactérias identificadas apenas se conseguiram cultivar sete, facto que revela a dificuldade de manuseamento destes organismos em laboratório. Para estas foi avaliada a toxicidade utilizando a técnica imunológica E.L.I.S.A. e ensaios em murganho e artémia.

Os ensaios em murganho demonstraram que todas as cianobactérias cultivadas produzem compostos que apresentam efeito tóxico a nível do fígado, rim, intestino e pulmão, com particular incidência no intestino, o que pressupõe a produção de uma toxina diarreica. Todos os outros órgãos sofreram lesões histopatológicas mais ligeiras.

Os resultados obtidos com artémia indicam que, para as concentrações testadas, as estirpes não são tóxicas para estes organismos.

A técnica E.L.I.S.A. revelou pequenas concentrações de microcistinas, toxinas que podem ser responsáveis por alguns dos efeitos observados.

ABSTRACT

Cyanobacteria are becoming subject of successive scientific studies because their presence in our planet is noticed since about three million years ago and also because they show a remarkable ubiquity. Those studies have particularly fallen upon fresh water species since they became more and more a risk to human and environmental health due to increasing water pollution.

Concerning marine cyanobacteria, only a few studies have been done in order to know the extent of these organisms presence in Portuguese seashores, so that their toxicity can be evaluated.

In this way, the purposes of this work were: the research, identification, isolation and culture of marine cyanobacteria; finally, to evaluate the toxicity of these cultivated microorganisms.

This research follows the subject initiated by MARTINS (1999); so, four beaches have been selected in central Portugal: ESPINHO, MIRA, CABEDELLO (Figueira da Foz) and SÃO PEDRO DE MOEL.

Cyanobacteria occurred in 35,9%, 50%, 36,8% and 56,6% of the sample collected in the beaches Espinho, Mira, Cabedelo and São Pedro de Moel respectively.

Out of all the previously identified cyanobacteria, only seven strains were isolated and cultivated. This fact shows the difficulty in handling such kind of organisms in the laboratory. For testing these cyanobacteria toxicity it was used E.L.I.S.A. technique and also laboratory testing with mice and *Artemia* sp..

Tests with mice proved that all the cultivated cyanobacteria produce compounds with toxic effects on liver, kidney, intestine and lung, having particular incidence in intestine implying that a diarrhoeal toxin is produced. All the other organs have suffered mild histopathological lesions.

The results observed with *Artemia* sp. show that for the tested concentrations these strains are not toxic for this kind of organism.

The E.L.I.S.A. technique has revealed low concentrations of microcistins a toxin wich can be responsible for some of the observed effects.

ÍNDICE GERAL

I – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Caracterização geral das cianobactérias	2
1.2 – Breve história da relação homem/cianobactérias	6
1.3 – Cianobactérias marinhas	8
1.3.1 – Cianobactérias marinhas planctónicas	9
1.3.2 – Cianobactérias marinhas bentónicas	11
1.3.2.1 – Tapetes algais	11
1.3.2.2 – Cianobactérias endolíticas	12
1.3.2.3 – Cianobactérias simbiotes	14
1.4 – Toxinas produzidas por cianobactérias	16
1.4.1 – Irritantes ao contacto	16
1.4.2 – Neurotoxinas	18
1.4.3 – Hepatotoxinas	20
1.5 – Caracterização geológica das praias amostradas	22
1.5.1 – Praia de Espinho	23
1.5.2 – Praia de Mira	24
1.5.3 – Praia da Figueira da Foz- Cabedelo	24
1.5.4 – Praia de São Pedro de Moel	25
1.6 – Objectivos do estudo	26
II – METODOLOGIA	27
2.1 – Locais de colheita	27
2.2 – Amostragem	28
2.3 – Isolamento de cianobactérias	28
2.3.1 – Tratamento das amostras de cianobactérias planctónicas	29
2.3.2 – Tratamento das amostras de cianobactérias planctónicas	30
2.4 – Identificação das cianobactérias observadas	30

2.5 – Cultura de cianobactérias	31
2.6 – Tratamento da biomassa obtida	31
2.7 – Avaliação da toxicidade	32
2.7.1 – Ensaios de toxicidade com murganhos	32
2.7.2 – Ensaios de toxicidade com artémia	33
2.8 – Detecção e quantificação de microcistinas por E.L.I.S.A.	35
2.9 – Técnica histológica	38
 III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	 40
 3.1 – Ocorrência de cianobactérias nas praias amostradas	 40
3.2 – Estirpes de cianobactérias cultivadas	62
3.3 – Toxicidade das estirpes cultivadas	66
3.3.1 – Ensaios de toxicidade com murganhos	66
3.3.2 – Ensaios com artémia	88
3.3.3 – Ensaio imunológico E.L.I.S.A.	90
 IV – CONCLUSÕES	 91
 V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	 94
 VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 96

ÍNDICE DE FIGURAS

I – INTRODUÇÃO

Figura 1.1 – <i>Palaeolyngbya</i> do proterozóico com cerca de 850 m.a.	3
Figura 1.2 – Estromatólito	3
Figura 1.3 – Estromatólitos de Hamelin Pool	4
Figura 1.4 – Frasco de <i>Spirulina</i> para alimentação humana	7
Figura 1.5 – <i>Synechococcus</i> visto em microscopia de epifluorescência	9
Figura 1.6 – Fotografia de satélite de uma florescência de <i>Trichodesmium</i> , ao largo do Cabo Canaveral	10
Figura 1.7 – A – <i>Microcoleus chthonoplastes</i> ; B – <i>Lyngbya majuscula</i>	12
Figura 1.8 – Cianobactéria endolítica (CB) no interior de um oóide	13
Figura 1.9 – Corte de uma raiz de <i>Cycas</i> evidenciando uma zona mais escura que corresponde a cianobactérias simbióticas	14
Figura 1.10 – Fotomicrografia da simbiose entre <i>Rhizosolenia cleveii</i> do Oceano Índico e cianobactérias <i>Richelia intracellularis</i> (R)	15
Figura 1.11 – A – <i>Anabaena circinalis</i> ; B – <i>Oscillatoria</i> sp; C – <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	18
Figura 1.12 – Representação esquemática dos efeitos das toxinas anatoxina-a e anatoxina-a(s) sobre a transmissão dos impulsos nervosos. A – condições normais; B – Efeito da anatoxina-A C – Efeito da anatoxina-A(s)	19
Figura 1.13 – Representação esquemática dos efeitos da saxitoxina e neosaxitoxina. A – Condições normais; B – Efeito da saxitoxina e neosaxitoxina	19
Figura 1.14 – A - <i>Nodularia</i> sp; B - <i>Nostoc</i> sp; C - <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	20
Figura 1.15 – Representação esquemática dos efeitos das hepatotoxinas a nível dos hepatócitos	21

II – METODOLOGIA

Figura 2.1 – Localização geográfica das praias amostradas	27
Figura 2.2 – Recolha de material de uma rocha, onde se suspeitava da existência de cianobactérias	28
Figura 2.3 – Lapa recolhida e colocado num copo de plástico	28
Figura 2.4 – Esquema representativo da disposição das gotas de meio Z8 numa lâmina	29
Figura 2.5 – Meio Z8 solidificado com colónia de cianobactéria inoculada	29

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 3.1 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-4	42
Figura 3.2 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-4	42
Figura 3.3 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-8	43
Figura 3.4 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-8	43
Figura 3.5 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-9	43
Figura 3.6 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-10	43
Figura 3.7 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-1	43
Figura 3.8 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-13	43
Figura 3.9 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-14	44
Figura 3.10 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-14	44
Figura 3.11 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-15	44

Figura 3.12 – <i>Spirulina</i> sp. encontrada na amostra E-15	44
Figura 3.13 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-18	44
Figura 3.14 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-18	44
Figura 3.15 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-24	45
Figura 3.16 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-30	45
Figura 3.17 – Cianobactéria da ordem Chroococcales (setas) encontrada na amostra E-32	45
Figura 3.18 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-32	45
Figura 3.19 – Cianobactérias das ordens Chroococcales e Oscillatoriales (seta) encontradas na amostra E-33	45
Figura 3.20 – Cianobactérias da ordem Chroococcales encontradas na amostra E-36	46
Figura 3.21 – Cianobactérias da ordem Oscillatoriales encontradas na amostra E-39	46
Figura 3.22 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-5	47
Figura 3.23 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra M-5	47
Figura 3.24 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-6	47
Figura 3.25 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-7	47
Figura 3.26 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-8	48
Figura 3.27 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-10	48

Figura 3.28 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-11	48
Figura 3.29 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-12	48
Figura 3.30 – Cianobactérias da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-13	48
Figura 3.31 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-15	49
Figura 3.32– Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra M-16	49
Figura 3.33 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-16	49
Figura 3.34 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-16	49
Figura 3.35 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-17	49
Figura 3.36 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-18	50
Figura 3.37 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-20	50
Figura 3.38 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-27	50
Figura 3.39 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-27	50
Figura 3.40 – <i>Spirulina</i> sp. (seta) encontrada na amostra M-27	50
Figura 3.41 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-29	51
Figura 3.42 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-29	51
Figura 3.43 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-30	51

Figura 3.44 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-2	53
Figura 3.45 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-3	53
Figura 3.46 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-4	53
Figura 3.47 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-7	53
Figura 3.48 – Cianobactéria do género <i>Synechocystis</i> sp. encontrada na amostra FF-9	53
Figura 3.49 – Cianobactéria do género <i>Synechocystis</i> encontrada na amostra FF-15	53
Figura 3.50 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-17	54
Figura 3.51 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra FF-20	54
Figura 3.52 – Cianobactéria do género <i>Phormidium</i> sp. encontrada na amostra FF-21	54
Figura 3.53 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-30	54
Figura 3.54 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-34	54
Figura 3.55 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra FF-34	55
Figura 3.56 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-34	55
Figura 3.57 – Cianobactéria do género <i>Phormidium</i> sp. encontrada na amostra FF-36	55
Figura 3.58 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra FF-37	55
Figura 3.59 – Cianobactérias das ordens Oscillatoriales e Chroococcales encontradas na amostra FF-38	55
Figura 3.60 – Cianobactéria possivelmente do género <i>Chlorogloeopsis</i> sp. (seta) encontrada na amostra SP-1	57

Figura 3.61 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-2	57
Figura 3.62 – Cianobactéria possivelmente do género <i>Chlorogloeopsis</i> sp. encontrada na amostra SP-3	57
Figura 3.63 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra SP-3	57
Figura 3.64 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra SP-3	57
Figura 3.65 – Cianobactérias das ordens Oscillatoriales na amostra SP-4	57
Figura 3.66 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-5	58
Figura 3.67 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra SP-7	58
Figura 3.68 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra SP-7	58
Figura 3.69 – Cianobactérias possivelmente do género <i>Chlorogloeopsis</i> sp. encontrada na amostra SP-8	58
Figura 3.70 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-13	58
Figura 3.71 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-13	58
Figura 3.72 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra SP-14	59
Figura 3.73 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra SP-17	59
Figura 3.74 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-17	59
Figura 3.75 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (setas) encontrada na amostra SP-20	59
Figura 3.76 – Cianobactéria do género <i>Chroococcus</i> sp. encontrada na amostra SP-21	59
Figura 3.77 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra SP-21	59

Figura 3.78 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra SP-22	60
Figura 3.79 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-25	60
Figura 3.80 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-27	60
Figura 3.81 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-29	60
Figura 3.82 – Corte histológico de fígado de murganho utilizado como controle	67
Figura 3.83 – Corte histológico de fígado de murganho utilizado como controle	67
Figura 3.84 – Corte histológico de intestino anterior de murganho utilizado como controle	68
Figura 3.85 – Corte histológico de intestino anterior de murganho utilizado como controle	68
Figura 3.86 – Corte histológico de intestino posterior de murganho utilizado como controle	69
Figura 3.87 – Corte histológico de pulmão de murganho utilizado como controle	69
Figura 3.88 – Corte histológico de rim de murganho utilizado como controle	70
Figura 3.89 – Corte histológico de rim de murganho utilizado como controle	70
Figura 3.90 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-B injectado com a estirpe B-5. Destaca-se o desenvolvimento anormal das placas de Peyer (área apontada pela seta)	72
Figura 3.91 – Corte histológico de intestino anterior do murganho-A injectado com a estirpe B-5, onde se denotam os núcleos picnóticos (setas)	72
Figura 3.92 – Corte histológico de pulmão do murganho-B injectado com a estirpe B-5, onde se notam várias hemorragias (setas)	73

Figura 3.93 – Corte histológico do fígado de murganho-A injectado com a estirpe B-5, onde se notam várias hemorragias (setas azuis), e o desenvolvimento anormal do núcleo dos hepatócitos (setas pretas)	73
Figura 3.94 – Corte histológico do rim de murganho-B injectado com a estirpe B-5, onde se denotam várias hemorragias (setas pretas)	74
Figura 3.95 – Corte histológico do rim de murganho-B injectado com a estirpe B-5 destacando-se a vacuolização das células da periferia	74
Figura 3.96 – Corte histológico de rim do murganho-A injectado com a estirpe B-5, onde se salienta a retracção do glomérulo	75
Figura 3.97 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-A injectado com a estirpe B-8, onde se pode observar uma hemorragia no lúmen de uma vilosidade	76
Figura 3.98 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-B injectado com a estirpe B-8, onde se destaca o desenvolvimento anormal das placas de Peyer (área apontada pela seta)	76
Figura 3.99 – Corte histológico do fígado de murganho-B injectado pela estirpe B-8, observando-se hemorragias (setas)	77
Figura 3.100 – Corte histológico do fígado de murganho-B injectado pela estirpe B-8, revelando a retracção dos hepatócitos (setas azuis) e hemorragias (setas pretas)	77
Figura 3.101 – Corte histológico do rim de murganho-B injectado com a estirpe B-8, salientando-se a degenerescência das células dos túbulos da periferia	78
Figura 3.102 – Corte histológico do rim de murganho-A injectado pela estirpe B-1, revelando hemorragias	79
Figura 3.103 – Corte histológico do fígado de murganho-B injectado pela estirpe B-1, onde se notam os canais sinusóides dilatados	79
Figura 3.104 – Corte histológico do rim do murganho-B injectado com a estirpe B-9, onde se destaca a vacuolização das células dos túbulos da periferia	80
Figura 3.105 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-B injectado pela estirpe B-2, onde se evidenciam os núcleos picnóticos das células epiteliais das vilosidades (setas)	82

Figura 3.106 – Corte histológico do rim do murganho B injectado com a estirpe B-2, onde se destaca a picnose dos núcleos e a degenerescência do citoplasma das células dos túbulos	82
Figura 3.107 – Corte histológico do rim do murganho injectado com a estirpe B-2, salientando-se a retracção dos glomérulos	83
Figura 3.108 – Corte histológico do intestino do murganho-B injectado com a estirpe B-10, salientando-se a destruição de toda a estrutura tecidual	84
Figura 3.109 – Corte histológico do fígado do murganho-A injectado com a estirpe B-10, salientando-se o aumento do espaço dos canais sinusóides	84
Figura 3.110 – Corte histológico do rim do murganho-A injectado com a estirpe B-10, salientando-se a separação dos túbulos	85
Figura 3.111 – Corte histológico do rim do murganho-B injectado com a estirpe B-11, salientando-se as hemorragias	85

ÍNDICE DE TABELAS

II – METODOLOGIA

Tabela 2.1 – Descrição das técnicas de coloração utilizadas nos cortes dos órgãos dos murganhos	39
---	----

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3.1 – Total de amostras recolhidas em cada praia e respectiva percentagem de ocorrência	40
Tabela 3.2 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia de Espinho	41
Tabela 3.3 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia de Mira	46
Tabela 3.4 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia da Figueira da Foz (cabedelo e Cabedelinho)	52
Tabela 3.5 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia de São Pedro de Moel	56
Tabela 3.6 – Estirpes de cianobactérias cultivadas	62
Tabela 3.7 – Tempo médio e tipo de crescimento da cultura, biomassa obtida e diâmetros médio das células Chroococcales	64
Tabela 3.8 – Peso do murganho, percentagem do peso do fígado e tempo de sobrevivência dos murganhos utilizados como controlo	66
Tabela 3.9 – Peso do murganho, volume injectado, concentração da solução injectada, percentagem do peso do fígado, tempo de sobrevivência dos murganhos e observações feitas após a injeção com as estirpes recolhidas na praia de Espinho	71

Tabela 3.10 – Peso do murganho, volume injectado, concentração da solução injectada, percentagem do peso do fígado, tempo de sobrevivência dos murganhos e observações feitas após a injeção com as estirpes recolhidas na praia de Mira	78
Tabela 3.11 – Peso do murganho, volume injectado, concentração da solução injectada, percentagem do peso do fígado, tempo de sobrevivência dos murganhos e observações feitas após a injeção com as estirpes recolhidas na praia de Figueira da Foz	81
Tabela 3.12 – Resultados dos ensaios com artémia. %m – percentagem	88
Tabela 3.13 – Resultados obtidos através do ensaio E.L.I.S.A. das estirpes de cianobactérias cultivadas	90

1 – INTRODUÇÃO

É consabido que a água é o recurso natural mais abundante - ocupa cerca de 71% da superfície terrestre, com uma profundidade média de 3800 metros (WETZEL, 1993). No artigo 2º da Declaração Universal dos Direitos da Água refere-se que *“A água é a seiva do nosso planeta. É a condição essencial de vida de todo o ser vegetal, animal ou humano. Sem ela não poderíamos conceber a atmosfera, o clima, a vegetação, a cultura ou a agricultura. O direito à água é um dos direitos fundamentais do ser humano: o direito à vida, tal qual é estipulado no art. 3º da Declaração dos Direitos do Homem”*, enquanto que no artigo 4º se escreve *“ O equilíbrio e o futuro do nosso planeta dependem da preservação da água e dos seus ciclos. Estes devem permanecer intactos e funcionando normalmente para garantir a continuidade da vida sobre a Terra. Este equilíbrio depende, em particular, da preservação dos mares e oceanos, por onde os ciclos começam.”* Tais asserções revelam a importância deste precioso líquido.

Apresenta ainda a particularidade de ser sempiterna (existe desde a formação da Terra) e de ser imutável (a quantidade da água na Terra sempre foi a mesma).

Apesar de não haver uma definição precisa, o litoral é normalmente identificado como uma zona de fronteira entre o continente e o oceano, onde se concentra um conjunto de comunidades de elevado grau de sensibilidade.

Caracterizado como um hiper-sistema cuja estabilidade depende não somente do equilíbrio de cada um dos seus três sub-sistemas (terra, mar e ar), mas também da harmonia dinâmica entre todas as suas componentes, o litoral torna-se um sistema de extrema fragilidade. As suas formas de vida, resultantes da elevadíssima diversidade biológica, são únicas.

Nas faixas costeiras concentram-se mais de 50 % das formas marinhas, o que nas costas rochosas da Europa equivale a mais de 150 mil espécies, transformando este interface entre a terra, o mar e o ar num bem único e muito frágil.

No entanto, a presença do homem tem levado à sua crescente destruição. Desde a era mesolítica que as populações se concentram nas zonas litorais, devido aos recursos

que potenciam actividades como a pesca e agricultura e devido às suas potencialidades de defesa, amenidade de clima, entre outras. Daí que no litoral se tenham desenvolvido, para além da pesca, várias actividades económicas, como a colheita de algas, a salinicultura e mais recentemente a aquicultura extensiva e intensiva (peixes, ostras, amêijoas, mexilhões etc.). Além disso, o desenvolvimento do turismo balnear, nos séculos XIX e XX, levou ao aparecimento de aglomerados de residências, que têm vindo a alastrar nos últimos 40 anos, bem como de hotéis e de equipamentos recreativos. Esta grande concentração - humana, urbana, industrial e turística - está a contribuir para crescente degradação do litoral (FONSECA, 1999).

Assim, não é de estranhar nos dias de hoje, principalmente no Verão, o aparecimento nos meios de comunicação, de notícias sensacionalistas acerca do estado lastimoso em que se encontram águas das praias do nosso país, baseadas nos relatórios sobre as praias emanados pela Comunidade Europeia. Nessas alturas gera-se um estado de histeria geral que se alastra do poder autárquico (preocupado com os prejuízos que possam ocorrer durante o período balnear os quais lhe podem valer, muitas vezes, a perda de um novo mandato) aos Delegados de Saúde (muitas vezes sem a informação necessária para poder agir) e à população (confusa e sem saber a quem se dirigir para mitigar as suas preocupações).

Torna-se por isso imperativo, que a ciência disseque estes assuntos, tornando-os mais acessíveis e compreensíveis para o leitor comum, por forma a evitar essas situações de alarmismo.

1.1 – CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS CIANOACTÉRIAS

É de aceitação geral, nos meios científicos, que as cianobactérias são dos organismos mais antigos encontrados na Terra. Para BROUTIN (2000) os primeiros traços de existência de organismos unicelulares clorofilinos datam do precâmbrio: em estratos depositados há mais de 3 mil milhões de anos, foram encontradas pequenas esferas orgânicas no jazigo de fósseis de *Fig tree*, na África do Sul. Pelo seu tamanho (20 micrómetros de diâmetro), fazem lembrar as cianobactérias denominadas *Microcystis*. Desse jazigo, também foram extraídas substâncias orgânicas análogas aos produtos de degradação da clorofila (porfirinas) e de proteínas (aminoácidos). Estas

substâncias confirmam a natureza biológica e clorofilina destes “micro-fósseis”. Também no jazigo de Gunflint, no Canadá, datado de dois mil milhões de anos, foram encontrados filamentos constituídos por células ligadas umas às outras: *Gunflintia minuta* (1 a 2 micrómetros de diâmetro) e *Gunflintia grandis* (2,5 a 6 micrómetros) que lembram as cianobactérias *Rivularia* actuais.

Segundo CARMICHAEL (1994), estas cianobactérias desempenharam um papel muito activo na oxigenação da atmosfera. Alguns teóricos defendem, que alguns destes organismos fotossintéticos se associaram a outros micróbios e eventualmente perderam a capacidade de funcionar independentemente dando origem aos cloroplastos. Uma das maiores precursoras desta teoria é L. Margulis¹.

Schofte e Walter (1982), consideram a Era proterozóica como a “idade das cianobactérias”, uma vez que nos terrenos desse período da história da Terra são encontrados grandes quantidades de fósseis de cianobactérias (Figura 1.1) (WHITTON e POTTS, 2000).



Figura 1.1 – *Palaeolyngbya* do proterozóico com cerca de 850 m.a. (in site <http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/cyanofr.html>)



Figura 1.2 – Estromatólito (in site <http://www.cs.cuc.edu/~tfutcher/Cyanophytalab.html>).

Para WHITTON e POTTS (2000), os fósseis mais abundantes são os estromatólitos - palavra derivada do grego que significa “tapetes de pedra”- (Figura 1.2), muito semelhantes aos que hoje são encontrados em Shark Bay, no Oeste da Austrália e em poucos outros locais do globo. Os estromatólitos são estruturas geradas por comunidades bacterianas, onde predominam as cianobactérias, as quais

produzem um gel que as protegem de radiações ultravioletas e da contaminação ambiental; quando os sedimentos que caem sobre a colónia ficam colados ao gel, impedindo a captação de luz, a comunidade desloca-se para “o piso superior”, razão

¹ Para MARGULIS & SAGAN (1992), os plastídeos tiveram provavelmente origem como procariotas fotossintéticos de vida autónoma. O *prochloron* verde e as cianobactérias foram comidos por protistas já dotados de mitocôndrias. Mas nem todos foram digeridos e alguns sobreviveram por meio de simbiose dentro dos seus hospedeiros. Tais ligações levaram por um lado às algas (as bactérias *Prochloron* tornaram-se cloroplastos) e por outro às algas marinhas vermelhas (cianobactérias como *Synechococcus* tornaram-se rodoplastos).

porque os estromatólitos apresentam uma estrutura em camadas (LOPES *in site* www.geocities.com/collegePark/1306/vida1.htm).

O caso de Hamelin Pool (Figura 1.3), uma enseada da supracitada baía, é particularmente importante, porque a livre circulação das águas está obstruída por um imenso banco de areia coberto de zósteros. Nestas condições, a evaporação pelo Sol abrasador torna as águas dessa enseada extremamente salgadas. Desta forma, os animais marinhos como os moluscos, que habitualmente se alimentam destes tapetes, não conseguem ali sobreviver e consequentemente as cianobactérias prosperam sem controle (ATTENBOROUGH, 1979).



Figura 1.3 – estromatólitos de Hamelin Pool (*in site* <http://www.discoverwest.com.au/mapall.html>)

Esta constatação leva a pensar que a abundância destes seres durante este período se deve à ausência de predadores (WHITTON e POTTS, 2000). Curioso, ou talvez não, estes organismos para além da sua longevidade na Terra, apresentam uma ubiquidade notável, podendo ser encontrados em meios aquáticos (água doce, salobra e salgada), e em meios terrestres desde que sejam húmidos (THIEL, *in site* <http://www.netpets.org/fish/reference/reefref/cyanobacteria.htm>), sendo mesmo a comunidade mais abundante em zonas polares (QUESADA, *et al.* 2000). São ainda espécies pioneiras em solos de desertos quentes (WYNN-WILLIAMS, 2000). Devido à grande adaptabilidade a ecossistemas tão inóspitos, alguns autores defendem que, provavelmente, estes organismos existiram e ainda podem existir nos pólos (*permafrost*) gelados e em águas subterrâneas geotérmicas de Marte (WYNN-WILLIAMS, 2000).

Esta capacidade de colonizar ambientes inóspitos e a sua longevidade ao longo da evolução da Terra deve-se entre outros, segundo WYNN-WILLIAMS (2000), aos seguintes factores:

1 – à sua notável resistência à dessecação;

2 – à sua tolerância a temperaturas extremas e a condições extremas de radiação solar, uma vez que são capazes de realizar a fotossíntese em ambientes pouco iluminados;

- 3 – à tolerância ao stress osmótico resultante da dessecação, do congelamento e condições extremas de salinidade, devido à produção de determinados solutos;
- 4 – a conseguirem sintetizar pigmentos que lhes conferem protecção contra níveis elevados de radiação UVB.

Estes organismos, também designados por algas verde-azuladas, devem o seu nome ao facto das primeiras espécies identificadas serem azuis devido ao pigmento ficocianina. No entanto encontram-se cianobactérias com colorações que vão desde o esverdeado até ao avermelhado, passando pelo amarelado, acastanhado, etc. (*in site* <http://www.netpets.org/fish/reference/reefref/cyanobacteria.htm>).

De uma maneira geral apresentam as seguintes características (*in site* <http://www.unex.es/botanica/cyanophy.htm>):

- organização tipicamente procariótica: sem núcleo verdadeiro; com uma parede celular que engloba uma membrana plasmática; Protoplasma dividido em centroplasma (que contém o DNA) e cromoplasma (onde se encontram dispersos ribossomas, aerossomas, ficobilissomas, cianoficina, volutina e carboxissomas e glucogéneo);
- na sua maioria são autotróficos;
- apenas se lhes conhece a reprodução por bipartição, fragmentação, esporulação. No entanto algumas experiências parecem confirmar que existem fenómenos que implicam recombinação de material genético, semelhante ao que ocorre em bactérias;
- alguns vivem em simbiose com outros organismos;
- as suas dimensões variam entre um e vários micrómetros;
- são constituídos por elementos idênticos isolados ou em cenóbios filamentosos, planos ou globulares.

Pode então concluir-se que as cianobactérias, do ponto de vista da estrutura celular, são claramente bactérias. Tendo em conta a sua capacidade fotossintética, e os respectivos pigmentos, são algas. Assim exibem características dos dois reinos, podendo

portanto ser considerados como um elo de ligação entre esse dois tipos de vida (THIEL, *in site* <http://www.netpets.org/fish/reference/reefref/cyanobacteria.htm>).

As cianobactérias, em condições ambientais favoráveis, podem desenvolver-se em grandes densidades, constituindo as designadas florescências ou *blooms*. Os principais factores que favorecem o aparecimento dessas florescências são: as grandes cargas de nutrientes, principalmente sob a forma azotada ou fosfatada, provenientes de esgotos domésticos ou industriais e da actividade agrícola; as temperaturas elevadas; e a alta luminosidade. Devido aos dois últimos factores, estes fenómenos são abundantes desde o fim da Primavera até ao fim do Verão (VASCONCELOS e ARAÚJO, 1994).

Quando aparecem normalmente, as florescências não duram muito, uma vez que a chuva, o vento forte ou as baixas temperaturas, inibem o crescimento das cianobactérias impedindo a sua proliferação. Contudo, sob condições favoráveis, podem durar várias semanas a meses.

1.2 – BREVE HISTÓRIA DA RELAÇÃO HOMEM/CIANOACTÉRIAS

Tendo em conta a longevidade na história da Terra, a ubiquidade e capacidade de adaptação, destes organismos, não seria de estranhar que tenham sido utilizados pelo homem desde os tempos mais remotos até à actualidade.

Na China existe uma lenda, segundo a qual um alquimista, físico e Taoísta da Dinastia Jin de Leste (317-420 AC), de nome Hung Ge, se alimentou de *Nostoc commune* durante os períodos que passava no Sul da China como eremita. Crendo que a sua saúde advinha da ingestão da referida cianobactéria, introduziu este alimento nos hábitos alimentares do Imperador. Como o Imperador também atribuiu, ao novo alimento, sua renovada saúde, decidiu denominá-lo *Nostoc commune* de *Ge-Xian-Mi* (arroz do imortal Ge), nome este que chegou aos nossos dias. Estes e outros relatos, consubstanciados nas propriedades benéficas de cianobactérias, levaram a que estes organismos sejam muito procuradas, atingindo valores elevados (14,8 acres = US\$140) no mercado chinês (POTTS, 2000).

Em relatos mais recentes, viajantes do séc. XVI descreveram como os Aztecas usavam as cianobactérias, apanhadas no lago com redes finas, para produzirem uma

espécie de pão, que apelidavam *tecuitlatl* (VONSHAK e TOMASELLI, 2000).

Nos dias de hoje *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima* são cultivadas e vendidas como alimento para o Homem (Figura 1.4) e como ração animal. O sucesso comercial de *Arthrospira* deve-se ao seu alto valor nutricional, composição química e a segurança do seu consumo, faz dela uma das mais importantes indústrias de cultura de microalgas (VONSHAK e TOMASELLI, 2000).

Gustafson *et al.* (1989), defende que os glicolípidos contendo ácido sulfônico extraídos de certas *Oscillatoria* são extraordinariamente activos contra o vírus da S.I.D.A. *in vitro*. (FOX, 1993).

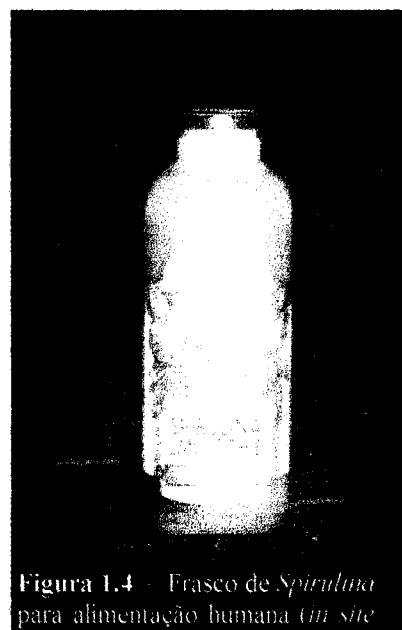


Figura 1.4 - Frasco de *Spirulina* para alimentação humana (*in site* http://mollie.berkeley.edu/~volkman/courses/microbial_slides.html)

Edson X. Albuquerque e os seus colegas da Universidade de Maryland, estão a experimentar um composto modificado de Anatoxina-a, para retardar a degenerescência da doença de Alzheimer (CARMICHAEL, 1994).

Estudos preliminares indicam que algumas estirpes de cianobactérias são capazes de oxidar constituintes aromáticos e alifáticos do petróleo (RADWAN e AL-HASAN, 2000), podendo por isso ser utilizados no combate à poluição provocada por esses compostos.

Segundo CARMICHAEL (1994), a anatoxina-a(s) é o único o organofosforado natural conhecido, muito semelhante ao malatião e paratião, apresentando um igual poder mortífero, e podendo, em teoria constituir a base para novos pesticidas.

Estudos de Asada e Kawamura demonstraram que as cianobacterias produzem hidrogénio, por fermentação em condições anaeróbicas sem luz (*in site* <http://www.fao.org/docrep/w7241e0g.htm>), composto esse que pode ser utilizado como fonte de energia não poluente e renovável.

Também o género *Nostoc*, devido à sua habilidade para interagir com diferentes tipos de plantas hospedeiros (angiospérmicas, gimnospérmica, briófitas e fungos) pode ser utilizado em novas simbioses com plantas importantes para a agricultura (como os cereais). Esta simbiose pode reduzir a dependência do uso de fertilizantes nitrogenosos na agricultura moderna (*in site* <http://www.botan.su.se/fysiologi/Cyano/Intro.htm>).

Estão em curso novas pesquisas de compostos com interesse biomédico que provavelmente conduzirão à descoberta de muitos novos compostos, alguns dos quais podem ser tóxicos. Bioensaios com extractos de células de cianobactérias, muitas vezes, revelam uma maior toxicidade do que as toxinas conhecidas que se encontravam nesse extracto (CHORUS e BARTRAM, 1999).

1.3 – CIANOACTÉRIAS MARINHAS

As cianobactérias têm uma ampla distribuição nos ecossistemas marinhos, mas raramente são dominantes e geralmente passam despercebidas aos observadores mais descuidados (MOORE, 1981).

Embora estes organismos não tenham apresentado, até à data problemas sérios para a saúde e economia, o perigo potencial existe, especialmente devido à utilização intensiva do oceano como fonte de alimento (MOORE, 1981) e de recreio. O contacto com as toxinas de cianobactérias marinhas pode ser feito através da ingestão involuntária, durante os banhos, de água ou de espumas contaminadas, ingestão de organismos marinhos contaminados, do contacto directo com as florescências (Codd, 1998) e da inalação involuntária de aerossóis (<http://www.ceps.ops.oms.org/comum/gestcont/capi6.pdf>), principalmente durante a prática de desportos aquáticos.

Apesar da sua ampla distribuição, têm-se registado maiores densidades de cianobactérias, nomeadamente das formas cocoides, nas regiões tropicais e temperadas. A diminuição de cianobactérias marinhas com o aumento de latitude parece estar relacionada com a diminuição da temperatura, mas outros factores podem estar envolvidos (MURPHY e HAUGEN, 1985).

Em ecossistemas marinhos, as cianobactérias podem não só fazer parte das comunidades planctônicas, mas também colonizar uma variedade de substratos ao longo das costas marítimas, constituindo muitas vezes formações bem visíveis. A ocorrência de cianobactérias em simbiose com vários organismos tem também sido registrada (MARTINS, 1999).

1.3.1 – Cianobactérias marinhas planctônicas

Segundo PAERL (2000), as cianobactérias marinhas planctônicas são classificados em três grupos morfológicos e funcionais: unicelulares, filamentosas não-heterocísticas e filamentosas heterocísticas. No entanto, as mais representativas são as pertencentes às ordens Chroococcales e Oscillatoriales. Na ordem Chroococcales sobressaem os gêneros *Synechocystis* e *Synechococcus* (Figura 1.5), sendo *Trichodesmium*, dentro das Oscillatoriales, o gênero mais conspícuo (FOGG, 1982).

Na ordem Chroococcales são englobadas as cianobactérias picoplanctônicas que têm sido detectadas na zona oceânica em densidades celulares consideráveis. A detecção destas cianobactérias marinhas picoplanctônicas e de forma cocoide, tornou-se possível através da utilização de microscopia de epifluorescência (OLSON *et al.*, 1990), apesar desta técnica não identificar as cianobactérias que não contém ficoeritrina (WATERBURY *et al.*, 1979) e por isso serem de difícil detecção. O aparecimento desta técnica, bem como da citometria de fluxo, tornou evidente que as cianobactérias picoplanctônicas, nanoplanctônicas (5-20 μm) e microplanctônicas (> 20 μm) têm papéis fundamentais em termos biogeoquímicos e tróficos nos ambientes marinhos (PAERL, 2000).

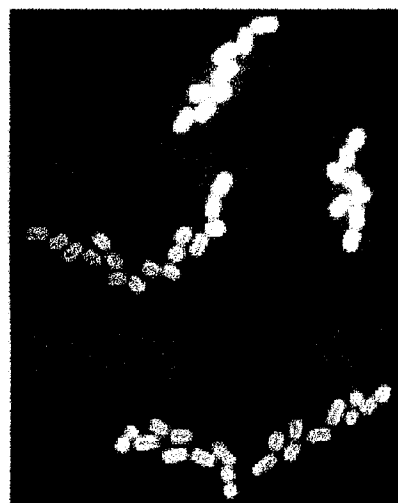


Figura 1.5 – *Synechococcus* visto em microscopia de epifluorescência (in site http://mollie.berkeley.edu/~volkman/courses/microbial_slides.html)

Estas cianobactérias cocoides parecem ser ubíquas nos mares tropicais, subtropicais e temperados, onde são muitas vezes componentes importantes do fitoplâncton, podendo mesmo constituir um dos principais contribuintes para a produção primária da massa de água onde ocorrem. Em águas costeiras, estas formas são em geral mais abundantes em zonas ricas em nutrientes (VanDenHoek *et al.*, 1995 in MARTINS,

1999). Na zona oceânica são especialmente importantes em águas pobres em nutrientes tendo, nomeadamente, sido consideradas o maior produtor primário em águas marinhas oligotróficas do Atlântico Norte (CARPENTER e ROMANS, 1991).

Na ordem Oscillatoriales, destaca-se o género *Trichodesmium*, que é comum em muitas águas oligotróficas dos mares tropicais e sub-tropicais onde, muitas vezes, é o maior componente do fitoplâncton (CAPONE *et al.*, 1998).

Relatos de florescências de *Trichodesmium* são bastante antigos, como os de Sir Joseph Banks durante a viagem de descobrimento da Austrália pelo Capitão James Cook, em 1770 (www.botany.uq.edu.au/research/marine/publication/pdf/files/literatureandrew.pdf), ou de Charles Darwin durante a expedição do Beagle em águas Brasileiras no ano de 1832 (RÖRIG *et al.*, 1998).

Estas florescências (Figura 1.6) estão, geralmente, associadas com tempo calmo, precipitação fraca, temperatura da água elevada (25 – 30 °C), salinidade superior a 34‰, pH alcalino (8.3 – 8.4) e poucos nutrientes inorgânicos dissolvidos (RÖRIG *et al.*, 1998). As características que permitem a *Trichodesmium* ter sucesso em mares

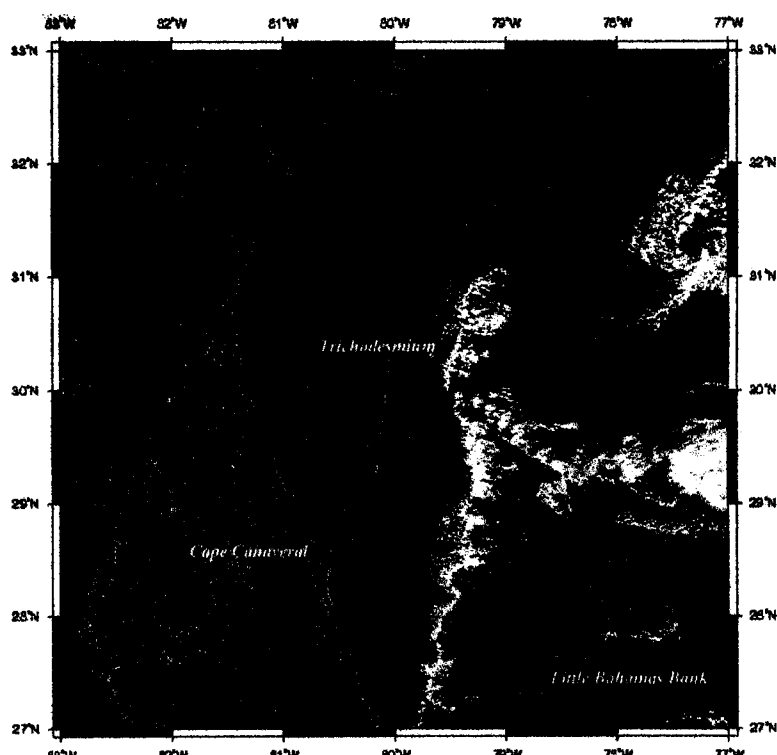


Figura 1.6 – Fotografia de satélite de uma fluorescência de *Trichodesmium*, ao largo do Cabo Canaveral, cedida pelo Prof. Dr. D. Capone.

oligotróficos incluem a sua capacidade de fixar azoto atmosférico; a sua capacidade de flutuabilidade, a qual lhe permite manter-se nos níveis superiores da coluna da água; um aparelho fotossintético adaptado a um regime de grande intensidade luminosa; uma taxa de crescimento relativamente baixa a qual, associada à escassez de predadores, lhe permitem manter uma biomassa relativamente elevada (CAPONE, *et al.*, 1997).

1.3.2 – Cianobactérias marinhas bentónicas

As cianobactérias bentónicas têm uma larga distribuição ao longo das costas marítimas, muitas vezes formando colónias importantes em rochas e sedimentos (WHITTON e POTTS, 1982). Dentro destas formações são de particular interesse os *mats* ou tapetes algais. Estes organismos podem apresentar um crescimento endolítico ou viver em simbiose com outros organismos (MARTINS, 1999).

1.3.2.1 – Tapetes algais

Os tapetes algais são comunidades estratificadas de diferentes microorganismos, que crescem nos sedimentos numa grande variedade de ambientes, tais como: ambientes hipersalinos, fontes termais, e areas expostos na maré baixa (STAL, 2000). Nestes ambientes, a ocorrência de formas de vida superiores é limitada, pelo que o reduzido efeito de herbivorismo, facilita a acumulação de biomassa algal (MARTINS, 1999).

Na maioria dos tapetes algais salinos e hipersalinos, as cianobactérias representam o principal constituinte das comunidades vivas. Geralmente encontram-se em águas sub-litorais pouco profundas, e nas margens litorais ou supralitorais de lagos salinos, onde por vezes se encontram associados com carbonatos e/ou evaporitos. Diatomáceas, clorófitas bem como bactérias fototróficas, encontram-se muitas vezes presentes, podendo ocasionalmente ser dominantes em águas salobras e com baixa salinidade (ANAGNOSTIDIS e ROUSSOMOUSTAKAKI, 1991). Estes tapetes mostram por vezes uma nítida zonação vertical, resultante da sucessão de diferentes organismos. A sobreposição de diferentes populações de organismos é reconhecida devido à existência de diferentes pigmentações (STAL, 1991).

Como factores ambientais, que influenciam o crescimento dos tapetes, contam-se a duração dos períodos de tempo em que ficam imersos e emersos, a acção herbívora de invertebrados, a energia das ondas, e a quantidade e tipo de sedimento transportado

pelas marés e depositado sobre eles (WHITTON e POTTS, 1982). São também factores importantes a luz e a disponibilidade de nutrientes (AL-THUKAIR e AL-HINAI, 1993).

Apesar do herbivorismo ser um entrave ao seu crescimento, estas comunidades constituem óptimos locais de abrigo e uma fonte de alimento para diversos organismos, nomeadamente, ostrácodes, moluscos, anfípodes e outros pequenos crustáceos (AL-THUKAIR e AL-HINAI, 1993). Estas formações algais desempenham ainda um papel importante na ligação de sedimentos, pensando-se que intervêm também na fixação do ferro, quer dissolvido na água quer na forma coloidal (WHITTON e POTTS, 1982).

As cianobactérias que constróem os tapetes algais pertencem a estirpes filamentosas e a estirpes unicelulares. A cianobactéria não-heterocística, *Microcoleus chthonoplastes* (Figura 1.7-A) é dominante nos tapetes algais marinhos de todo o mundo, ambientes hipersalinos e nos desertos quentes (STAL, 2000). Também se podem encontrar a formar estas estruturas espécies de cianobactérias dos géneros *Spirulina*, *Merismopedia*, *Lyngbya* (Figura 1.7-B), *Schizotrix*, *Calothrix*, *Synechococcus* (STAL, 2000), *Phormidium*, *Chroococcus* (MARTINS, 1999).

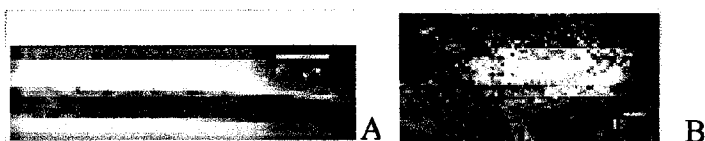


Figura 1.7 – A – *Microcoleus chthonoplastes*; B – *Lyngbya majuscula*, (in site <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/www-cyanosite/images/images.html>).

1.3.2.2 – Cianobactérias endolíticas

O crescimento endolítico parece ser uma estratégia utilizado pelas cianobactérias, e pelas algas verdes, para sobrevirem em ambientes extremos, desde os desertos gelados da Antárctida até aos desertos quentes Norte Americanos; mas recentes observações evidenciam que estas comunidades são frequentes na bacia do Mediterrâneo (ARIÑO *et al.*). As cianobactérias endolíticas dividem-se segundo Golubic, *et al.*, (1981), em euendolíticas, que perfuram e penetram os substratos rochosos; casmoendolíticas, que crescem em fissuras e cavidades de rochas; e criptoendolíticas, que ocorrem dentro das rochas porosas formando uma camada

discreta paralela à superfície (WHITTON e POTTS, 1982).

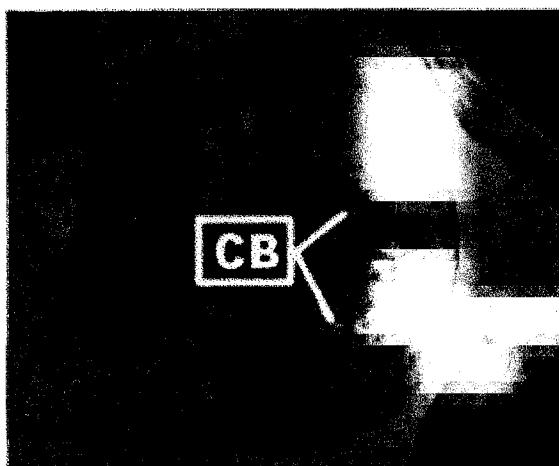


Figura 1.8 – Cianobactéria endolítica (CB) no interior de um oólito (*in site* <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>)

As cianobactérias euendolíticas ocupam um dos mais peculiares, mais antigos e persistentes nichos ecológicos (Campbell 1982, Knol *et al.* 1986, Green *et al.* 1988) conhecidos desde a era do proterozóico médio (Zhang e Golubic 1987). Hoje, os microorganismos euendolíticos penetram vários substratos de natureza calcária, incluindo calcário (Le Campion-Alsumard 1970), dolomite (Danin *et al.* 1982), coral (Lukas 1974, Highsmith 1981), conchas e fragmentos de

conchas (Akpan 1986), assim como oólitos (Figura 1.8) (Harris *et al.* 1979, Lukas e Golubik 1983) (AL-THUKAIR e GOLUBIK, 1991).

A forma de penetração e a colonização dos substratos, por cianobactérias endolíticas, requer a formação de células pequenas especializadas (baeócitos) pelas estirpes não filamentosas ou hormogónios pelas estirpes filamentosas. Al-Thukair e Golubic, (1991), mostraram que os baeócitos de *Hyella immanis* são dotadas de mobilidade e são fototáxicas, características estas que parecem ser comuns às estruturas reprodutivas de todos os euendolíticos (PENTECOST e WHITTON, 2000).

Nas areias, as cianobactérias são uma componente importante da comunidade algal, podendo ser verdadeiramente euendolíticas no caso de areias calcárias e grosseiras (WHITTON e POTTS, 1982). As formas cianobacterianas que perfuram os substratos mais superficialmente tendem a encontrar-se na parte mais alta da zona eulitoral, enquanto que as formas que perfuram o substrato mais profundamente são mais frequentes na zona baixa da zona eulitoral. Este facto é explicado pela acção predadora de vários organismos, que é mais acentuada na parte mais baixa da zona eulitoral (WHITTON e POTTS, 1982).

As cianobactérias euendolíticas mais frequentemente encontradas pertencem aos géneros e espécies: *Hyella* spp., *Solentia*, *Plectonema terebrans*, *Mastigocoleus*

testarum, *Kyrtuthrix* e *Brachytrichia* (PENTECOST e WHITTON, 2000).

1.3.2.3 – Cianobactérias simbiotes

As cianobactérias são únicas na sua capacidade de formar associações simbióticas com uma enorme variedade de hospedeiros eucarióticos, incluindo plantas, fungos, esponjas e protistas. Na maioria dos casos o benefício para o hospedeiro é evidente, pois podem receber azoto ou carbono, enquanto nem sempre é evidente o proveito retirado pelas cianobactérias dessas associações (ADAMS, 2000).

Muitas cianobactérias simbiotes têm características comuns: são filamentosas, fixam azoto nos heterocistos, e apresentam filamentos com mobilidade denominados hormogónios que servem como agentes infecciosos em muitas simbioses (ADAMS, 2000).

Um exemplo de associação com plantas aquáticas é a que se verifica quando, colónias de *Nostoc*, *Gloeotrichia*, *Anabaena*, *Calothrix* e *Cylindrospermum* crescem epifiticamente na epiderme inferior e bolsas reprodutoras das folhas de lentilha-de-água (*Lemna*) (Duong e Tiedje, 1985). Entre as angiospérmicas, apenas os géneros *Gunnera* forma associações simbióticas com cianobactérias, encontrando-se os cianobiontes intracelularmente (ADAMS, 2000). É também comum a presença do

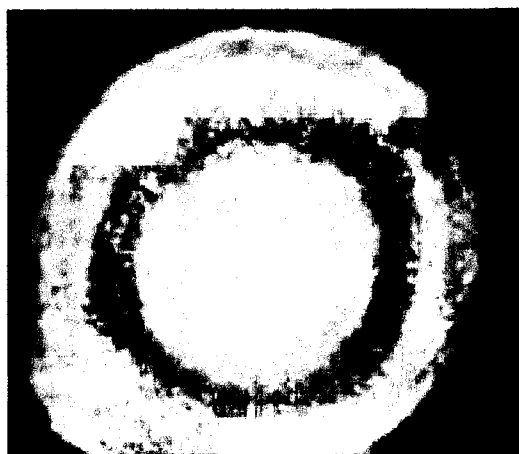


Figura 1.9 – Corte de uma raiz de *Cycas* evidenciando uma zona mais escura que corresponde a cianobactérias simbióticas (*in site* <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>).

cianobionte de género *Nostoc*, nos nódulos das raízes da espermatófita do género *Cycas* (Figura 1.9), de tal forma que alguns autores atribuem a esta relação a razão pela qual ainda se pode encontrar na natureza a referida planta (*in site* <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>).

Cerca de 8 a 15% dos 15000-20000 espécies de líquenes contém cianobactérias como ficobionte, habitualmente *Nostoc*. No entanto espécies de *Calothrix*, *Scytonema*, e *Fischerella*, também são comuns (Peters *et al.*, 1986; Rai, 1990b; Büdel, 1992; Ahmadjian 1993; Hill, 1994 *in* ADAMS, 2000).

Nos recifes de coral, as cianobactérias associadas parecem pertencer fundamentalmente a géneros fixadores de azoto, destacando-se, também neste caso, o género *Trichodesmium* (Bell, 1992 in MARTINS, 1999).

Mais de quarenta géneros de esponjas marinhas contém cianobactérias simbióticas intra e extracelulares, distribuídas por toda a esponja ou apenas nos tecidos superficiais (Rai, 1990a; Wilkinson, 1992). Os cianobiontes são normalmente, membros de géneros unicelulares – *Aphanocapsa* -, ou filamentosos - *Phormidium* - (Rai, 1990a). Porém, o cianobionte da esponja marinha *Dysidea herbacea* foi identificada como *Oscillatoria spongelia* (Unson and Faulkner, 1993; Hinde *et al.*, 1994; Unson *et al.*, 1992a) (ADAMS, 2000).

Um dos casos mais conhecidos de endossimbiose (Figura 1.10), é o que ocorre entre o género *Richelia* e as diatomáceas do género *Rhizosolenia* nas águas tropicais e sub-tropicais oligotróficas. *Rhizosolenia* é beneficiada, uma vez que tem acesso a azoto biológico. Adicionalmente a diatomácea proporciona flutuabilidade que mantém o endossimbionte em zonas iluminadas. (PAERL, 2000). Esta cianobactéria endossimbiótica pode também ocorrer no interior de outras diatomáceas, como *Hemiaulus*, mas é muito mais difícil de visualizar sem utilizar a microscopia de epifluorescência (Villareal, 1994 in CARPENTER *et al.*, 1999).

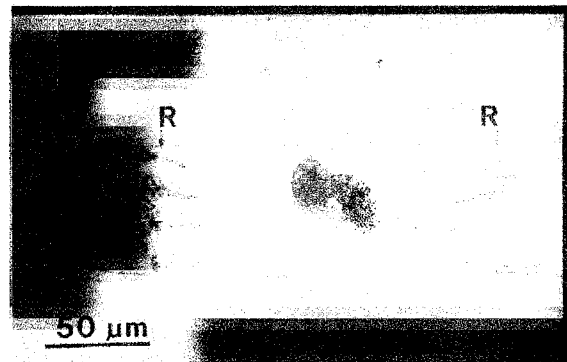


Figura 1.10 – Fotomicrografia da simbiose entre *Rhizosolenia cleveii* do oceano Índico e cianobactérias *Richelia intracellularis* (R) (in site <http://www.ng.hik.se/~njasv/mcb.html>).

Está também confirmada a ocorrência de cianobactérias em simbiose com dinoflagelados produtores de toxinas PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) (FRANCA *et al.*, 1996).

1.4 – TOXINAS PRODUZIDAS POR CIANOBACTÉRIAS

Como seria natural, estes organismos também são conhecidos pelo seu lado nefasto, do ponto de vista dos seus predadores e competidores.

Actualmente ainda não se sabe porque motivo esses organismos começaram a produzir estes compostos. Algumas teorias defendem que esses compostos devem ter uma função protectora contra a herbivoria, como acontece com alguns metabolitos de plantas vasculares (Carmichael, 1992, *in* AZEVEDO, 1998); outras, como aventou Margalef (comunicação pessoal), defendem que esses compostos são produzidos para competirem com outros organismos autotróficos, uma vez que, para a produção desses compostos, as cianobactérias utilizam grande quantidade de compostos orgânicos, que retiram do meio onde vivem, impedindo desta forma o crescimento dos seus competidores.

Por serem causa de um número cada vez maior intoxicações humanas agudas (VASCONCELOS *et al.*, 1993), convém conhecer mais detalhadamente quais os tipos de toxinas produzidas pelas cianobactérias.

Algumas espécies de cianobactérias marinhas são também conhecidas por produzirem substâncias tóxicas. No entanto, em comparação com as cianobactérias de água doce, os episódios de intoxicações são não só mais raros como também mais localizados (MARTINS, 1999).

Para VASCONCELOS e ARAÚJO (1994), as toxinas produzidas pelas cianobactérias são, de acordo com os seus efeitos, essencialmente de três tipos: irritantes ao contacto neurotoxinas e hepatotoxinas.

1.4.1 – Irritantes ao contacto

Em meio marinho, um dos primeiros casos de toxicidade provocada por cianobactérias refere-se ao aparecimento de dermatites de contacto em banhistas, no Hawai, aquando do contacto a cianobactéria filamentosa *Lyngbya majuscula* (Moore, 1977 *in* MARTINS, 1999).

O contacto com *Lyngbya majuscula*, quando se nada no mar, pode resultar num

tipo de dermatite denominada "swimmers itch" ou "seaweed dermatitis", como foi relatado no Havai (Grauer e Arnold, 1961) e no Japão (Okinawa) (Hashimoto, 1979) (W.H.O.G., 1984).

O efeito deste contacto é uma inflamação cutânea com sinais de eritema, bolhas (flictenas) e descamação em menos de 12 horas após a exposição à cianobactéria (Mynderse *et al.*, 1977 in CHORUS e BARTRAM, 1999). As erupções na pele ocorrem especialmente nas partes mais delicadas como olhos, lábios e zonas genitais (Moore, 1977 in MARTINS, 1999).

Lyngbya majuscula distribui-se por todas a regiões tropicais e subtropicais. Dos mais de quarenta compostos químicos, com interesse biológico, isolados a partir desta espécie, três toxinas - debromoaplisiatoxina, aplisiatoxina e lingbiatoxina-A - são apontadas como os agentes causadores da dermatite (OSBORNE, *et al.*, 2000). Estas toxinas são altamente inflamatórias e são fortes compostos promotores de tumores da pele, já que usam mecanismos similares a ésteres de forbol, ao activar a proteína quinase C, (<http://www.ceps.ops.oms.org/comum/gestcont/capi6.pdf>).

A aplisiatoxina é letal para os murganhos quando injectados intraperitonealmente com uma dose 250 µg/kg. A morte dos murganhos é devida a choque hemorrágico, provocado por hemorragias a nível do intestino delgado (ITO e NAGAI, 1999)

A debromoaplisiatoxina também foi isolada a partir de duas outras espécies da família das Oscillatoriaceae, *Oscillatoria nigroviridis* e *Schizothrix calcicola* (Mynderse *et al.*, 1977 in W.H.O.G., 1984). Trata-se de uma substância fenólica que na sua forma cristalina se apresenta em agulhas incolores, com um ponto de fusão de 105,5-107,0 °C e uma massa molecular relativa de 592 (MYNDERSE *et al.*, 1977).

Esta toxina possui um poder altamente inflamatório. Todos os nadadores que estiveram em contacto com a cianobactéria tóxica desenvolveram eritema e descamação profunda da pele em 12 horas, o que leva a classificar este agente como um irritante primário e não como um alergénio (CARMICHAEL *et al.*, 1985).

Apesar do efeito tóxico, foi verificada uma boa actividade antileucémica por parte da debromoaplisiatoxina, quando injectada em ratos com leucemia linfocítica P-388 (Mynderse *et al.*, 1977, in MARTINS, 1999).

Esta cianobactéria, por vezes, cresce epifiticamente em algas comestíveis como a *Acanthophora spicifera* que serve de alimento na Indonésia e nas Filipinas (CHORUS e BARTRAM, 1999). Têm também sido suspeitas como fonte de toxinas na cadeia alimentar (ciguatoxinas), que pode levar a envenenamentos humanos denominados por ciguatera² (Hahn and Capra, 1992; Endean *et al.*, 1993) (CHORUS e BARTRAM, 1999). Esta intoxicação é caracterizada por sintomas neurológicos e gastrointestinais.

Outra toxina, lingbiatoxina-a (Cardellina *et al.*, 1979 in CHORUS e BARTRAM, 1999), encontrada numa outra estirpe de águas pouco profundas de *Lyngbya majuscula*, causa dermatite e severas inflamações a níveis bocais e gastrointestinais (Moore, 1993 in CHORUS e BARTRAM, 1999). A sua toxicidade para murganhos é semelhante à verificada para aplisiatoxina (Moore, 1977 in CHORUS e BARTRAM, 1999), e também é um potente promotor de tumores da pele.

Esta toxina apresenta-se, na forma cristalina, como um composto viscoso de cor castanho-amarelado. A lingbiatoxina A, isolada de uma variedade de *Lyngbya majuscula* de Kahala Beach em Oahu, constitui também um agente altamente inflamatório. Trata-se de um índole alcalóide, com massa molecular relativa de 437 (Cardellina *et al.*, 1979 in MARTINS, 1999).

O efeito tóxico da lingbiatoxina A faz-se sentir também ao nível da promoção de tumores e activa a proteína Kinase C, dependente de fosfolípidos, e activada pelo cálcio, causando a contracção do tecido muscular liso (DOW e SWOBODA., 2000).

1.4.2 – Neurotoxinas

Quatro tipos de neurotoxinas têm vindo a ser estudadas em detalhe. Destas, a anatoxina-a e anatoxina-a(s) parecem ser exclusivas das cianobactérias. As outras duas, saxitoxinas e neosaxitoxinas, também surgem em certos dinoflagelados marinhos.

A anatoxina-a foi a primeira toxina de

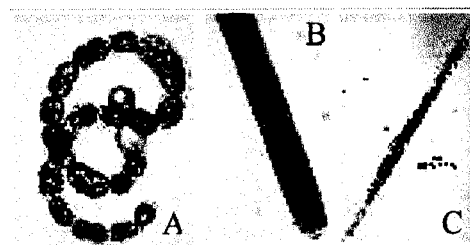


Figura 1.11 – A – *Anabaena circinalis*; B – *Oscillatoria* sp; C – *Aphanizomenon flos-aquae*, (in site <http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/www.cyanosite/images/images.html>).

² O termo ciguatera tem uma origem espanhola, derivando da palavra cigua, que é o nome comum de um caracol marinho das Caraíbas (W.H.O.G., 1984).

cianobactéria a ser química e funcionalmente definida. Trata-se de uma amina secundária com um peso molecular de 165 daltons (AZEVEDO, 1998), produzida pelos géneros *Anabaena* e *Oscillatoria* (Figura 1.11). Esta toxina é letal, porque bloqueia os receptores de acetilcolina (Figura 1.12-B), não sendo posteriormente degradada pela acetilcolinesterase impedindo, deste modo, o relaxamento muscular (CARMICHAEL, 1994). Sendo assim, os principais sintomas da intoxicação por esta toxina são: desequilíbrio, fasciculação muscular, respiração ofegante, convulsões, podendo levar à morte por paragem respiratória.

No caso da anatoxina-a(s), produzida pelo género *Anabaena* pensou-se, inicialmente, que era uma variante da anatoxina-a uma vez que os indivíduos intoxicados apresentavam sintomas análogos. A letra “s” surgiu porque causava nos vertebrados intensa salivação. O modo de actuação desta toxina é diferente do da anatoxina-a, pois esta inibe a acção da acetilcolinesterase (Figura 1.12-C).

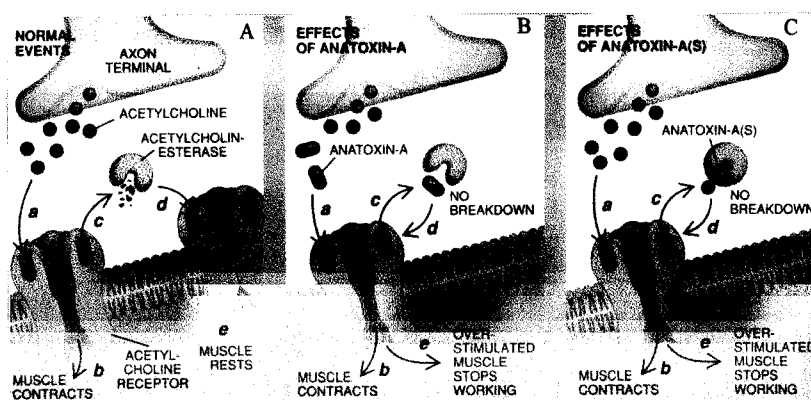


Figura 1.12 – Representação esquemática dos efeitos das toxinas anatoxina-a e anatoxina-a(s) sobre a transmissão dos impulsos nervosos. A – condições normais; B – Efeito da anatoxina-A; C – Efeito da anatoxina-A(s) (in CARMICHAEL, 1994).

A saxitoxina e a neosaxitoxina são produzidas pelos géneros *Anabaena* e *Aphanizomenon* e inibem a condução do impulso nervoso por bloqueamento dos canais de sódio (Figura 1.13), afectando a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas (AZEVEDO, 1998).

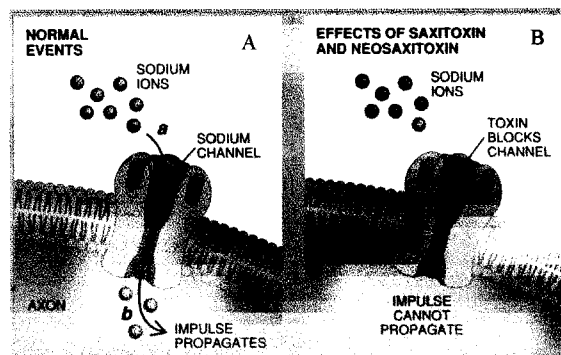


Figura 1.13 – Representação esquemática dos efeitos da saxitoxina e neosaxitoxina. A – Condições normais; B – Efeito da saxitoxina e neosaxitoxina (in CARMICHAEL, 1994).

Uma outra neurotoxina, homoanatoxina-a, foi purificada a partir de *Oscillatoria formosa*. Trata-se de um alcalóide aminado secundário, metileno-anatoxina-a. É muito semelhante à anatoxina-a, sendo um potente bloqueador neuromuscular. A intoxicação por esta toxina leva a uma severa paralisia do corpo, convulsões e morte por paragem respiratória (DOW e SWOBODA, 2000).

Hawser *et al.* (1992), detectaram que estirpes de *Trichodesmium* do Mar das Caraíbas são altamente neurotóxicas para murganhos. O composto em causa não foi, no entanto, identificado, mas sugere a possibilidade de ocorrência deste tipo de toxinas em meio marinho (MARTINS, 1999).

1.4.3 – HEPATOTOXINAS

São as toxinas que se encontram mais envolvidas nos quadros de intoxicação por cianobactérias. Comparativamente às neurotoxinas apresentam uma acção mais lenta causando a morte, entre poucas horas e poucos dias, devido a hemorragias intra-hepáticas e choque hipovolémico. Os sintomas de envenenamento por estas toxinas são a prostração, anorexia, vômitos, dores abdominais e diarreias (Carmichael e Schwartz, 1984; Beasley *et al.*, 1989 in AZEVEDO, 1998).

A detecção de microcistina-LR em mexilhões (Chen *et al.*, 1993), e a sua implicação como causa provável de uma doença que afecta o salmão do atlântico em culturas do nordeste do Pacífico indicam que membros desta classe estarão presentes no meio marinho (MARTINS, 1999).

As cianobactérias responsáveis pela produção destas toxinas pertencem aos géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia* (Figura 1.14-A), *Oscillatoria*, *Nostoc* (Figura 1.14-B) e *Cylindrospermopsis* (Figura 1.14-C) (Carmichael, 1992 in AZEVEDO, 1998).

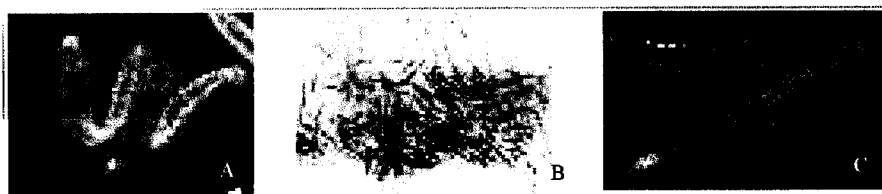


Figura 1.14 – A - *Nodularia* sp; B - *Nostoc* sp; C - *Cylindrospermopsis raciborskii*. (in site <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/www-cyanosite/images/images.html>).

As principais hepatotoxinas até agora caracterizadas são heptapeptídeos cíclicos conhecidas como microcistinas, e pentapeptídeos designados como nodularinas, apresentando ambas na sua constituição o aminoácido Adda, que é essencial para a sua toxicidade (CODD, 1998)

As hepatotoxinas promovem uma desorganização dos filamentos intermediários e dos filamentos de actina. Esta desorganização leva a uma retracção dos hepatócitos, provocando a perda de contacto entre estes e as células que formam os capilares sinusoidais (Figura 1.15). Como consequência, o fígado perde a sua arquitectura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contacto entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais (Hooser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994; Lambert *et al.*, 1994 in AZEVEDO, 1998).

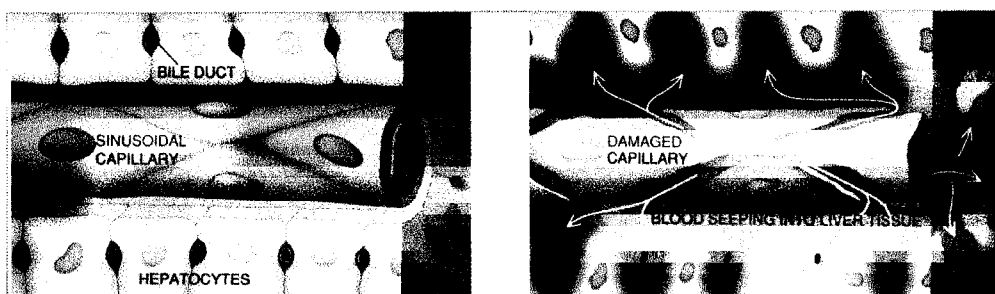


Figura 1.15 – Representação esquemática dos efeitos das hepatotoxinas a nível dos hepatócitos, (in CARMICHAEL, 1994).

Hoje em dia, vários estudos apontam para o facto das hepatotoxinas, em virtude de inibirem as proteínas fosfatases, poderem ser promotores de tumores (CARMICHAEL, 1994).

Recentemente foi descoberto que três espécies de cianobactérias, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani *et al.*, 1992 in AZEVEDO, 1998) e *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1992 in AZEVEDO, 1998), e *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER *et al.*, 1997) produzem um alcalóide hepatotóxico, denominado cilindrospermopsina, que inibe a síntese proteica causando danos severos no fígado, rins, glândulas supra-renais, pulmões e nos intestinos dos animais testados (CODD, 1998). Estudos *in vitro* mostraram que esta toxina inibe a síntese de glutathione e a síntese de proteínas em geral (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Foram ainda identificados como sendo toxinas de cianobactérias os lipopolissacarídeos (LPS) constituintes das suas paredes celulares, uma vez que estas

substâncias foram apontadas como agentes causadores de um surto de gastro-enterite ocorrido em Sewickley, Pennsylvania. Os poucos estudos efectuados com LPS de cianobactérias indicam que eles são menos tóxicos dos que os LPS de outras bactérias gram-negativas, como por exemplo as pertencentes ao género *Salmonella* (CHORUS e BARTRAM, 1999).

1.5 – CARACTERIZAÇÃO GEOLÓGICA DAS PRAIAS AMOSTRADAS

A extensa região de terras baixas assinaladas a norte e sul da Serra da Boa Viagem, faz parte da chamada orla mesozóica da meseta. Esta é separada do maciço ibérico por uma linha que vai de Espinho a Tomar, linha de contacto que constitui a base da orla e é constituída pelo triássico, formação secundária que assenta em discordância sobre o bordo ocidental da meseta. As restantes formações do mesozóico, isto é, o cretácico e o jurássico com as suas séries, vão-se escalonando regularmente para oeste, somente aflorando aqui e além, pois as camadas superficiais são constituídas na sua maior extensão pelo plioceno, a mais recente formação do cenozóico. O plioceno assenta sobre os terrenos secundários em ligeira inclinação para o mar, nas proximidades do qual é recoberto pelas dunas oceânicas, depósitos recentes constituindo uma faixa de cerca de cento e sessenta quilómetros, de Ovar à Nazaré, unicamente interrompida pelo Cabo Mondego e cuja maior largura varia entre 3 e 9 quilómetros. O plioceno e as dunas de formação mais recente, são por consequência, os sistemas predominantes daquela extensa região. O plioceno, e principalmente o da orla meridional, é constituído por areias finas, à mistura com cascalhos argilosos e pequenos calhaus rolados, elementos estes que permitem a distinção com as dunas que o separam do mar, e ocupa uma vasta área que chega a atingir (entre Anadia e Palheiros de Mira) cerca de 36 quilómetros de largura (MAIA, 1939).

Esta descrição caracteriza de forma sucinta a orografia da Costa da Região Centro. Porém de seguida procede-se a uma descrição sumária da geologia das áreas abrangentes das praias amostradas.

1.5.1 - Praia de Espinho

Ao consultar a Carta Geológica de Portugal nº 13-A e a respectiva notícia explicativa, verifica-se que esta praia fica situada numa região caracterizada, em termos geomorfológicos, por extensas zonas aplanadas a que sucedem relevos pouco acentuados. As elevações importantes situam-se na zona média, formando um pequeno dorso de direcção NNW-SSE que separa a faixa litoral da região interior, ou seja, a do Vale do Douro. Esta linha de relevos é, ao mesmo tempo, a divisória das águas que correm para o mar e para a Bacia do Douro.

Para o lado do litoral fica uma extensa faixa que desce gradualmente para o mar, sulcada por linhas de água de pouca importância. Grande parte desta faixa é ocupada por depósitos de praias antigas que se estendem, muito para o interior, até o sopé das elevações atrás citadas.

Em termos geológicos a região apresenta, por um lado, uma área extensa de terrenos do complexo xisto-grauváquico ante-ordovícico. Na maior parte, porém, os terrenos referidos estão profundamente metamorfizados. Foi sobretudo intensa a acção exercida pelo metamorfismo regional e pelos fenómenos de granitização. Dentro da zona cartografada, os terrenos em questão constituem duas faixas diferentes, separadas por comprido afloramento de granito porfíroide orientado na direcção NW-SE. A faixa de nordeste acompanha o vale de Douro; a sudoeste ocupa a região a sul e nascente de Espinho. Sobretudo nesta última, observa-se a existência de diferentes zonas metamórficas (zonas de isometamorfismo), sucedendo-se as faixas de xisto biotítico-moscovítico, de xisto biotítico com granadas e estaurolite. Por outro lado, um extenso afloramento de granito porfíroide, aquerítico, orientado na direcção NW-SE. Este granito é intrusivo no complexo xisto-granito-migmatítico, como se verifica na região do Porto. Predomina o granito porfíroide de grão grosseiro, mas encontra-se, também, uma fácies de grão médio e numerosos afloramentos de granito alcalino. Todas elas patenteiam fenómenos metassomáticos. Fazem parte do conjunto das rochas migmatíticas.

Verifica-se ainda a presença de depósitos modernos, que conferem à região litoral um aspecto baixo e arenoso, embora nalguns pontos, a norte desta vila, apareçam rochedos, muitos deles descobertos apenas na maré baixa.

1.5.2 - Praia de Mira

Do ponto de vista geomorfológico, a área abrangida pelo mapa nº 16-C, onde se encontra esta praia é, de maneira geral, plana e de baixa altitude. As grandes superfícies aplanadas são representadas pelos níveis de depósitos de praias antigas, e por um extenso campo de dunas e areias eólicas. Os depósitos de praias antigas cobrem grande parte da área da carta, dispondo-se em declive suave, desde os 100 m de altitude máxima, a SE, até 10 m, a NW. As dunas e areias eólicas cobrem igualmente extensa área, estendendo-se para o interior até cerca de 15 quilómetros na direcção do paralelo de Febres. Constitui-se, assim, uma faixa marginal com cerca de 10 quilómetros de largura média, onde a cobertura arenosa de natureza eólica assenta sobre formações fundamentalmente do Cretácico e Quaternário.

A Praia de Mira está englobada no estreito cordão litoral ao longo da costa, desde a Vagueira até cerca de cinco quilómetros para sul da Praia de Mira. É constituída por areias médias e grosseiras, por vezes com areão.

1.5.3 – Figueira da Foz - Cabedelo

A Praia da Figueira da Foz fica situada numa área constituída por terrenos cuja idade se estende desde o Hetangiano-Triássico até aos tempos modernos. Do ponto de vista geológico-estrutural é dividida em duas bacias constituídas por terrenos cretácicos e terciários, separadas por uma estrutura anticlinal complexa, de origem diapírica, formada por terrenos jurássicos (ROCHA, R., *et al.*, 1981).

É possível distinguir, deste modo, a NE a zona sinclinal que se estende entre Arzila, Ega, Vila nova de Anços e Alfarelos, prolongando-se a NW até as proximidades de Maiorca e Alhadas. A Sul, uma segunda zona sinclinal estende-se ao longo do bordo meridional do mapa entre Soure, Marinha das Ondas e Figueira da Foz. A estrutura anticlinal intermédia é constituída, de NW para SE, pela estrutura monoclinal da Serra de Boa Viagem, pelo anticlinal de Verride e pelo diapiro de Soure. O extremo SE do mapa abrange uma área de extensão reduzida pertencente ao bordo NW do maciço calcário estremenho. Na Praia do Cabedelo observam-se dunas e areias de duna, com uma orientação N-S, constituídas por areias de granulometria fina, bem calibrada, que assentam sobre formações mais antigas, miocénicas, piocénicas e plistocénicas.

Observam-se ainda areias de praia que, na sua generalidade, são areias com seixos e calhaus rolados que aparecem sobretudo na base (ROCHA, R., *et al.*, 1981).

1.5.4 – Praia de São Pedro de Moel

São muito diversificadas as formas dunares eólicas que se encontram na planície costeira entre o paralelo da Leirosa e São Pedro de Moel, ocupando uma faixa com uma largura máxima de 9 Km à latitude do Carriço. Sobre o substrato meso-cenozóico que apresenta importantes estruturas diapíricas de orientação geral NNW-SSE, para além da existência de uma cobertura de areias eólicas muito antigas (Wurnianas?) com um paleosolo de tipo podzol, existem outras gerações dunares muito mais recentes (históricas e modernas) que se estendem também em faixas paralelas à linha de costa e incluem vários cordões (ALMEIDA, *et al.*, 1998). São Pedro de Moel apresenta afloramentos de sedimentos carbonatados de idade liásica. A sucessão estratigráfica, apesar de estar frequentemente interrompida por uma fracturação transversal, por vezes densa, engloba o topo do Hetangiano (Mouterde, 1967) e o Toarciano médio (Duarte, 1995) (HENRIQUES, *et al.* 1998).

1.6 – OBJECTIVOS DO ESTUDO

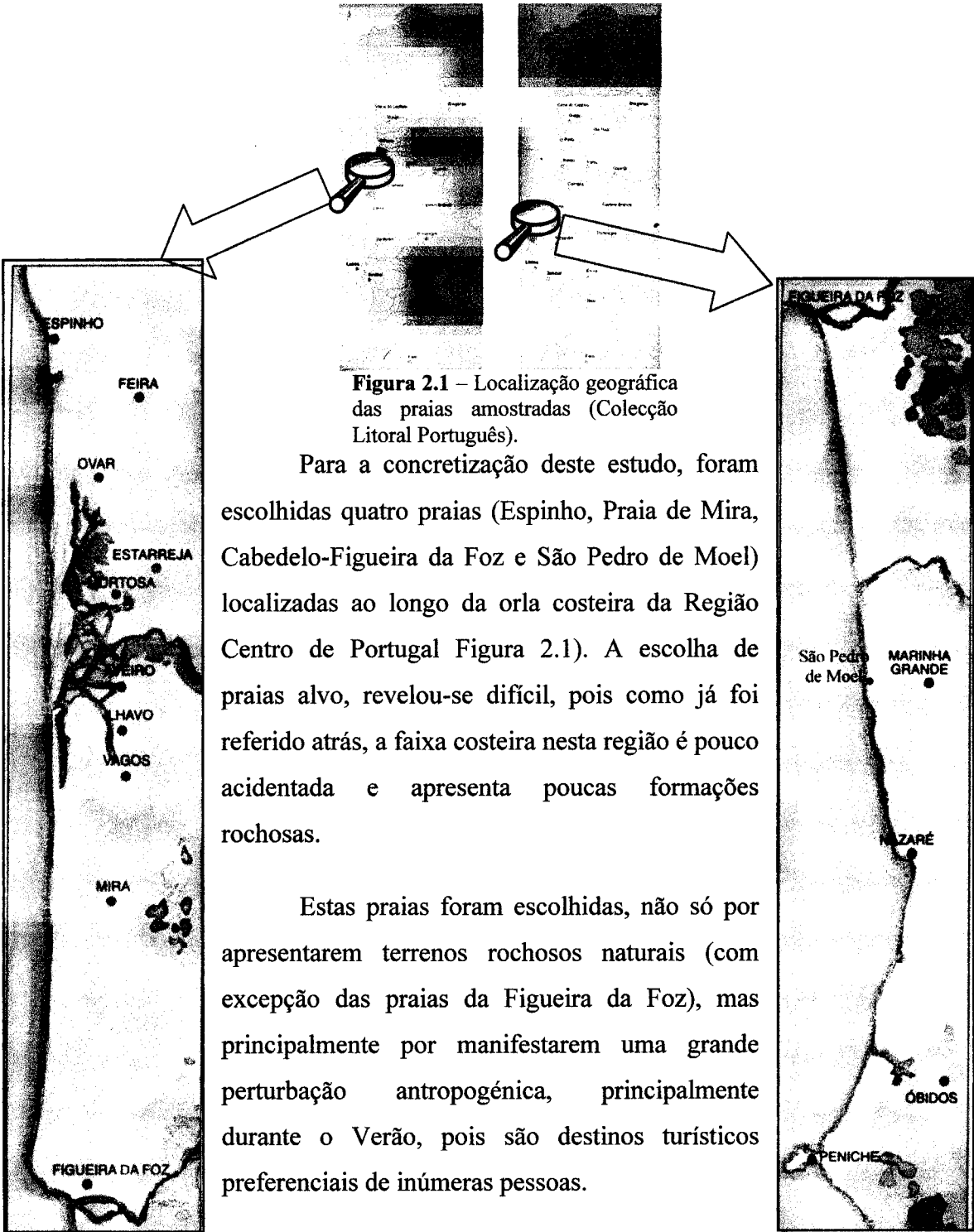
O reconhecimento da ocorrência de toxinas de cianobactérias nos estuários e em águas marinhas, tem sido menor do que as das águas doces, o que talvez reflecta o maior investimento na investigação nas águas doces (CODD, 1998). Em Portugal a carência de trabalhos versando este tema é por demais evidente, agravado pelo facto de muitos deles serem pouco recentes tal com refere MARTINS (1999). Deste modo, e tendo em conta o facto de que o litoral português tem sido sujeito a uma grande pressão por parte do homem, aliada à já referida fragilidade deste sistema, torna-se premente o aparecimento de mais trabalhos nesta área.

Este trabalho pretende dar continuidade ao estudo efectuado por Martins (1999), nas praias da Zona Norte, tendo como principais objectivos os abaixo descriminados:

- ↳ Proceder à colheita e identificação de espécies de cianobactérias marinhas em praias rochosas do Litoral Centro de Portugal.
- ↳ Proceder ao isolamento e cultura das espécies identificadas.
- ↳ Avaliar a toxicidade e detecção dos tipos de toxinas, através da realização de bioensaios com murganhos.
- ↳ Analisar os danos histológicos em murganhos.
- ↳ Avaliar a toxicidade em invertebrados marinhos, através da realização de bioensaios com *Artemia*.
- ↳ Detectar e quantificar as microcistinas pela técnica imunológica E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

2 – METODOLOGIA

2.1 – LOCAIS DE COLHEITA



2.2 – AMOSTRAGEM

As amostras foram colhidas em períodos de maré baixa, entre os meses de Julho e Outubro de 1999.

Para a pesquisa de cianobactérias bentónicas, tendo em conta os conhecimentos adquiridos bibliografia sistematizada no capítulo anterior, foram recolhidas pequenas porções de material sólido como areias, pequenas rochas, conchas, bem como algum material vivo: recifes de sabelária, cracas, lapas, mexilhões, búzios, pedaços de esponjas e macroalgas. Foram ainda obtidas amostras por raspagem de rocha que apresentassem uma cor verde azulada prenunciadora da presença destes microorganismos (Figura 2.2).



Figura 2.2 – Recolha de material de uma rocha, onde se suspeitava da existência de cianobactérias. Fotografia de Paulo Gonçalves.



Figura 2.3 – Lapa recolhida e colocado num copo de plástico. Fotografia de Paulo Gonçalves.

Todo o material recolhido foi colocado em copos de plástico de 100 ml cheios com água do mar, com excepção das raspagens de rocha para as quais se utilizaram tubos de 10 ml com água do mar (Figura 2.3).

Para a pesquisa de cianobactérias planctónicas, recolheram-se amostras de água do mar em frascos de 2 l. No fim da colheita os tubos e os copos foram transportados numa mala térmica para o laboratório.

2.3 – ISOLAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS

Todo o processo de tratamento das amostras foi realizado numa sala climatizada a 19 ± 1 °C e com um fotoperíodo de 14 horas. Uma vez no laboratório, a água do mar, presente em todas as amostras, foi substituída por meio nutritivo Z8 (Kotai, 1972), enriquecido com cloreto de sódio até uma concentração de 35 g/l (MARTINS, 1999). De seguida, as amostras foram analisadas, no intuito de se detectar a presença de cianobactérias, utilizando-se, para o efeito, um microscópio óptico, de marca *Leica*

DMLB. Quando a detecção foi positiva, tiraram-se inicialmente, fotografias de todas as espécies observadas com a ajuda de um programa de captação de imagem, e posteriormente procedeu-se ao isolamento, utilizando-se a seguinte técnica:

- recolha das cianobactérias com uma pipeta de Pasteur estirada à chama;
- lavagens sucessivas em meio Z8, por transferência dos microorganismos, de gota em gota de meio Z8 dispostas numa lâmina, como é indicado na figura 2.4, até se obter apenas a cianobactéria;

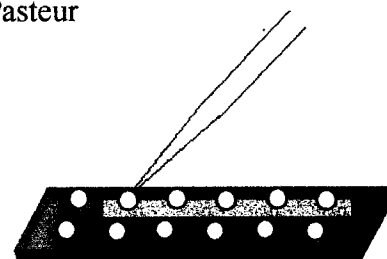


Figura 2.4 – Esquema representativo da disposição das gotas de meio Z8 numa lâmina.

As estirpes isoladas foram colocadas, inicialmente, em tubos de 10 ml com meio Z8, sendo transferidas, quando as culturas se tornaram visíveis a olho nu, para frascos de 50 ml com cerca de 25 ml de meio nutritivo.

Regularmente estes últimos frascos foram observados ao microscópio, renovando-se-lhes, se necessário, o meio nutritivo. Este procedimento foi mantido até à obtenção de uma cultura uniespecífica.

As amostras muito contaminadas com bactérias ou com algas foram inoculadas em placas de petri com meio Z8 com NaCl (35 g/l), solidificado com agar (0,75 %), utilizando uma ansa de inoculação esterilizada à chama (Figura 2.5).



Figura 2.5 – Meio Z8 solidificado com colônia de cianobactéria inoculada. Fotografia de Paulo Gonçalves.

Nos recipientes de recolha de amostras mudou-se, regularmente, o meio Z8 de forma a preservar material, prevenindo possíveis desaires ao longo de todo o processo.

2.3.1 – TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM CIANOBACTÉRIAS PLANCTÓNICAS

As amostras de 2 l de água do mar recolhidas para a pesquisa de cianobactérias planctónicas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm, numa centrífugadora do tipo 3-15 da Sigma. Depois os sedimentos obtidos foram transferidos para matrizes de 100 ml com 50 ml de meio Z8. Os matrizes foram deixados em repouso na sala

referida em 2.3. Quando se verificou o crescimento de microorganismos, fizeram-se observações de forma a identificar e isolar cianobactérias presentes.

2.3.2 – TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM CIANOBACTÉRIAS BENTÓNICAS

Em primeiro lugar, procedeu-se ao tratamento das amostras com material vivo, de forma a evitar a proliferação excessiva de bactérias (MARTINS, 1999)³. Desta forma, procedeu-se, por um lado à raspagem das conchas das lapas, cracas, mexilhões e búzios, e por outro à desintegração das esponjas com ajuda de agulhas de dissecação, e à trituração dos recifes de sabelária com ajuda de um almofariz e um pilão.

Estas amostras e as correspondentes às raspagens de rochas, areias e conchas, foram colocadas em tubos de 10 ml com meio Z8, e colocadas em repouso de forma a permitir o crescimento das cianobactérias. Este último procedimento teve por base os estudos de Gerwick (1994), o qual verificou que algumas espécies se desenvolvem consideravelmente se forem mantidas sem perturbações. Após este período de crescimento, seguiu-se o período em que se isolaram as diferentes cianobactérias (MARTINS, 1999).

2.4 – IDENTIFICAÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS OBSERVADAS

Para a identificação das cianobactérias observadas, foram utilizados trabalhos dedicados ao estudo destes microorganismos, dos quais se destacam os de HUBER-PESTALOZZI (1938), BOURRELLY (1970), RIPPKA *et al.* (1979), KAAS (1985), KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS (1999), sendo os dois primeiros referentes a cianobactérias de água doce. A identificação baseou-se na observação da morfologia das diferentes espécies.

³ Segundo GERWICK (1994), apesar de muitas algas conseguirem sobreviver à presença de grande quantidade de bactérias, muitas outras podem ser destruídas.

2.5 – CULTURA DE CIANOBACTÉRIAS

À medida que se verificou o desenvolvimento das cianobactérias nos tubos de 10 ml, as várias culturas foram sendo transferidas, primeiro para matrizes de 100 ml, com 50 ml de meio Z8 líquido, de seguida para matrizes de 1 l com 500 ml do mesmo meio, e por último para balões de 6 l, com 4 l também do meio referido, até ser obtido material suficiente para a realização dos ensaios de toxicidade.

Nos matrizes de 1 l e de 6 l, as culturas foram mantidas em arejamento constante o que permitiu, por um lado, uma correcta oxigenação, e por outro, impedir a deposição das cianobactérias.

Todos os matrizes, bem como os novos meios de cultura, foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 125° C. A transferência das culturas para recipientes maiores, realizaram-se numa câmara de fluxo laminar (CRUMA, 9005-FL), previamente esterilizada durante 30 minutos.

2.6 – TRATAMENTO DA BIOMASSA OBTIDA

Após a obtenção da biomassa possível, transferiu-se todo material do balão de 6 litros (raspando-se, se necessário, as paredes do balão) para frascos de 1 litro, para permitir a deposição da maior quantidade possível de cianobactérias. Após 24 horas, procedeu-se à decantação dos frascos. O material depositado foi colocado em copos de 100 ml tendo-lhe sido adicionado o material resultante da centrifugação do líquido sobrenadante, durante 7 minutos a uma velocidade de 7000 rpm, no intuito de obter a maior quantidade de biomassa possível. Por fim, para diminuir a salinidade das amostras, estas foram lavadas em água ultra-pura, após o que foram congeladas a -20 °C, liofilizadas, e guardadas para posterior utilização.

2.7 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

2.7.1 – Ensaios de toxicidade com murganhos

Neste tipo de ensaios, os murganhos foram injectados intraperitonealmente com 1 ml de solução de extractos de cianobactérias liofilizadas ressuspendidas em água ultra pura e submetidas a ultra sons.

Preparação do material injectado nos murganhos

Depois de pesar os murganhos a serem injectados (dois por amostra) procedeu-se da seguinte forma:

- com base no peso dos animais, calculou-se a quantidade de amostra a injectar a cada murganho, tendo em conta a dose que se pretendia testar (1500 mg de material liofilizado por kg de murganho). Esta dose tem sido utilizada como valor máximo para ensaios de toxicidade em murganhos, utilizando cianobactérias de água doce (VASCONCELOS, 1994);
- pesou-se o valor obtido no procedimento anterior (multiplicado por três) de cianobactérias liofilizadas, às quais foram adicionados 3 ml de água ultra pura;
- submeteu-se a solução a ultra sons durante 30 segundos a uma intensidade de 22,5 Hz e a uma amplitude de 90%, utilizando para o efeito, um aparelho Vibra Cell 50 (Sonics & Materials Inc. Danbury, CT, USA);
- mediu-se a salinidade das amostras com a ajuda de um refractómetro, usando como padrão uma solução de água ultra pura e cloreto de sódio com uma salinidade de 35 g/l, para calibrar o aparelho;
- injectaram-se intraperitonealmente os murganhos com 1 ml da solução, registando-se a hora do início e do fim da injeção;
- os murganhos utilizados como controlo foram injectados com uma solução de NaCl com uma salinidade 25‰ (salinidade máxima de todas as amostras);

- observaram-se os animais continuamente durante as três primeiras horas, e mais intermitentemente, após as 24 horas e após 48 horas a seguir à injeção. Os animais que não morreram foram sacrificados ao fim dos 48 horas por asfixia com éter;
- após a morte, os murganhos foram dissecados, tendo-se particular atenção a possíveis anomalias ao nível do fígado, intestinos, rins e pulmões (hemorragias, aumento do volume, indícios de diarreias);
- depois do procedimento anterior, pesou-se o fígado, para se poder calcular a sua percentagem em relação ao peso total do animal. Este valor é importante, pois é sabido que determinadas cianobactérias marinhas produzem hepatotoxinas que causam lesões a nível hepático, os quais podem levar a um aumento considerável do peso deste órgão;
- de seguida foram recolhidas amostras do fígado, intestino anterior (junto ao estômago) e posterior (junto ao ânus), pulmões e rins, que, após uma lavagem numa solução tampão fosfato salina (Dulbecco's), foram conservadas em *Bouin*, para posterior realização de preparações histológicas. Para a escolha destes órgãos foi tido em consideração o trabalho de MARTINS (1999).

2.7.2 – ENSAIOS DE TOXICIDADE COM ARTÉMIA

Com estes bioensaios, pretendeu-se testar a toxicidade das cianobactérias num invertebrado que ocupasse uma posição relevante em cadeias alimentares de ecossistemas marinhos. A artémia, para além de poder ser enquadrada no cenário atrás descrito, alia uma facilidade de manuseamento no laboratório.

Os ensaios com artémia visaram a determinação do CL₅₀. para tanto procedeu-se do seguinte modo:

- inicialmente foi colocado 1 g de quistos de artémia a incubar durante 48 h, num litro de água com 35 ‰ de salinidade, os quais foram mantidos num ambiente continuamente iluminado e arejado, e com uma temperatura de rondar os 25 °C (Laboratory for Biological research in aquatic Pollution);

- de seguida prepararam-se os extractos de cianobactérias que se pretendia testar de acordo com o seguinte método:
 - pesaram-se 15 mg de cianobactérias liofilizadas, aos quais se adicionou 1,5 ml de água ultra-pura;
 - a solução foi submetida a ultrasons, segundo o processo utilizado para a obtenção de amostras para os bioensaios com murganhos, após o que foram centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos, e os sobrenadantes foram decantados e filtrados com a ajuda de uma seringa de 1 ml e um filtro estéril Scheicher & Schuell FP 030/2 com uma porosidade de 0,2 μm ;
 - fizeram-se soluções de 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % e 0,01 %, a partir da solução mãe.
- de seguida concentraram-se num gobelé de 10 ml os náuplios de artémia, de forma a obter uma concentração de cerca de 10 indivíduos por 10 μl de solução;
- colocaram-se 100 μl de cada concentração em poços de uma placa de microtitulação, às quais foram adicionadas 10 μl da solução mencionada no ponto anterior. Foi testado como controlo uma solução de água ultra-pura com a salinidade de 35 ‰.
- as placas de microtitulação foram cobertas com parafilme, para evitar a evaporação, e colocadas às escuras em sala climatizada a 19 ± 1 °C durante 48 h;
- após 24 h, e posteriormente 48 h, foi registada a mortalidade ocorrida em cada poço, com a ajuda de uma lupa binocular, tendo sido considerados como mortos os indivíduos que ao fim de 10 segundos não registassem qualquer movimento (AMORIM, 1994);

2.8 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS POR E.L.I.S.A.

A escolha deste tipo de teste ficou a dever-se ao facto, de as microcistinas além de serem produzidos por cianobactérias de água doce (Carmichael, 1997 *in* MARTINS, 1999) poderem ocorrer em ambientes marinhos (Andersen *et al.*, 1993 *in* MARTINS, 1999).

A técnica imunológica E.L.I.S.A. é uma técnica que permite obter rapidamente resultados, oferece boa sensibilidade, e baseia-se na especificidade de anticorpos para os antígenos contra os quais são produzidos (FALCONER, 1993).

Chu *et al.* (1989) desenvolveram uma técnica E.L.I.S.A. usando anticorpos policlonais contra microcistina-LR (PEREIRA, 1998). Através deste método pode-se quantificar o total de toxinas de uma amostra, uma vez que os anticorpos produzidos contra MCYST-LR possuem uma boa reacção cruzada com MCYST-RR, MCYST-YR MCYST-FR e MCYST-WR e com as nodularinas (Chu *et al.*, 1990 *in* PEREIRA, 1998).

A detecção de possíveis toxinas presentes nas amostras, foi feita a partir de extractos de cianobactérias em concentrações de 10 mg/ml.

Para a detecção e quantificação de microcistinas, por este método, foi utilizado o seguinte esquema:

- Inicialmente prepararam-se os extractos de cianobactérias a testar, através do seguinte método:
 - pesaram-se 20 mg de cianobactérias liofilizadas, aos quais se adicionaram 2 ml de água ultra-pura;
 - a solução foi submetida a ultrasons, segundo o processo utilizado para a obtenção de amostras para os bioensaios com murganhos, após o que foram centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos, e os sobrenadantes foram decantados e filtrados com a ajuda de uma seringa de 1 ml e um filtro estéril Scheicher & Schuell FP 030/2 com uma porosidade de 0,2 µm;

- fizeram-se diluições na ordem de 1:100, 1:1000, 1:10000, a partir da solução mãe, as quais foram colocadas em tubos *Eppendorfs*, devidamente etiquetados.
- No passo seguinte, foi utilizado o “kit” com a referência *Millipore Envirogard™ Microcystins Plate Kit SD3P222S4*, que consiste em placas de microtitulação⁴, bem como um controlo negativo (microcistina-LR não tóxica), três soluções padrões de microcistina-LR em concentrações de 0.1, 0.4 e 1.6 ppb, uma solução de conjugado de microcistina-enzima, uma solução de substrato cromático e uma solução stop.
- em primeiro lugar colocaram-se, em duplicado, 100 µl das amostras a testar (diluições incluídas), do controlo negativo e dos três padrões, nas placas de microtitulação, ficando a incubar durante 30 minutos;
- de seguida, adicionaram-se 100 µl de conjugado de microcistina-enzima (que se vai ligar aos anticorpos disponíveis), após o que a placa foi agitada com movimentos circulares, com a ajuda de um agitador *Lab. Rotator, Model:DSR 2800V (Digisystems Laboratory Instruments, Inc.)*, à velocidade máxima, de modo a que todos os componentes se misturem, tendo o cuidado de não os fazer sair das células. Deixou-se incubar durante 30 minutos e procedeu-se a uma lavagem, enchendo quatro vezes as células ocupadas, com água destilada, no intuito de remover todas as moléculas que não se encontrem ligadas;
- adicionaram-se 100 µl do substrato, que foi degradado pelas enzimas do conjugado ligadas a anticorpos, e repetiu-se a agitação. A solução tomou uma cor azulada sendo a intensidade da cor inversamente proporcional à concentração de microcistinas, significando que um maior número de moléculas do conjugado se encontra ligada aos anticorpos. Deixou-se incubar durante 30 minutos;
- adicionaram-se 100 µl da solução stop, agitando-se novamente a placa. A utilização desta solução (solução de ácido clorídrico 1,0 N) tinha como

⁴ Apresentam nas paredes das suas células, anticorpos específicos para microcistina-LR.

objectivo terminar a degradação do substrato, estabilizando deste modo a reacção (as soluções passaram de uma cor azul para uma cor amarela), o que facilita as leituras de densidade óptica com radiação de comprimento de onda de 450 nm (a leitura do branco efectua-se contra o ar);

- procedeu-se à leitura, não sendo utilizado qualquer filtro diferencial.
- com as densidades ópticas obtidas, foram calculadas, para cada padrão e para cada amostra, a %Bo e o coeficiente de variação (%CV), utilizando as fórmulas abaixo descritas:

$$\% CV = \frac{Sd_{n-1}}{\text{Valor médio da DO}} \times 100$$

$$\% Bo = \frac{\text{Valor médio das DO das amostras ou dos padrões}}{\text{Valor médio da DO do controlo negativo}} \times 100$$

sendo,

DO = densidade óptica e Sd_{n-1} = desvio padrão da DO

- quando o coeficiente de variação foi superior a 15 %, , tornou-se necessária a repetição da análise para a amostra em questão, visto os valores obtidos não serem fiáveis;
- através de uma regressão logarítmica entre as concentrações dos padrões e a respectiva % Bo, representadas em papel semi-logarítmico, obteve-se uma recta padrão do tipo:

$$Y = a + b * \log(X)$$

sendo, Y = % Bo e X = Concentração da toxina (em ppb)

- com os valores de % Bo encontrados para as amostras, obtiveram-se as respectivas concentrações, sendo posteriormente necessário convertê-las em µg de microcistina por litro de água. No caso das diluições, os valores obtidos foram multiplicados pelo respectivo factor de diluição.

2.9 – TÉCNICA HISTOLÓGICA

As peças, previamente fixadas em solução de Bouin, foram lavadas em álcool a 70% até ficarem incolores.

De seguida procedeu-se a uma desidratação, passando as peças, sucessivamente, por álcool a 95% (3h), álcool a 100 I (1h), álcool absoluto II (2h) e por fim por salicilato de metilo durante a noite.

Passou-se então à impregnação, tendo as peças passado por salicilato + parafina (1:1) durante 3 horas, por parafina I (2h) e por parafina II (2h)

Depois foi feita a inclusão das peças em moldes com parafina líquida e colocadas a solidificar durante 24 horas.

A partir dos blocos de parafina solidificados, foram feitos cortes com uma espessura de 5, 6 e 7 µm, utilizando para o efeito um micrótomo tipo *Minot* da *Leica*.

De seguida procedeu-se à colagem, tendo os cortes sido colocados dentro de uma tina com água e álcool, após o que foram captados com a ajuda duma lâmina delgada. Este conjunto foi colocado em banho-maria com água a cerca de 45 °C, até ao corte ficar sem rugas. No final colocaram-se as lâminas delgadas numa estufa a 40 °C durante 24h.

Após as 24 horas, as lâminas delgadas foram desparafinadas (xilol I, 2 min; xilol II, 2 min; Álcool + xilol (1:1), 2 min), e rehidratadas (álcool absoluto I, 2 min; álcool 95%, 2 min; álcool 80%, 2 min; álcool 70%, 2 min; água da torneira 5 minutos).

Seguiu-se a coloração, sendo utilizados dois tipos distintos, que se passam a seguir:

Tabela 2.1 – Descrição das técnicas de coloração utilizadas na execução das preparações histológicas.

TÉCNICA I	TÉCNICA II
Coloração I - Hemalúmen – 6 min - Lavagem em água da torneira – 5 min Diferenciação - Álcool clorídrico – 3 segundos - Passagem pelo mordente (solução saturada de carbonato de lítio) – 3 segundos Coloração II - Eosina – 3 min - Lavagem em álcool a 70 %	Coloração I - Hematoxilin de Gill – 3 min - Lavagem em água da torneira – 3 min Diferenciação - Álcool clorídrico – 3 Segundos Coloração II - Eosina – 3 min - Lavagem em álcool a 70 %

Por fim procedeu-se à desidratação (lavagem em álcool 95%, álcool 95%, 3 min; álcool absoluto, 3 min; álcool + xilol (1:1), 3 min), à diafanização (xilol, 3 min) e à montagem, tendo sido utilizado como meio de montagem o xilol.

A observação das preparações definitivas foi efectuada com um microscópio óptico de marca *Nikon*, com uma ampliação de 100x, 400x e 1000x, utilizando-se como suporte bibliográfico o Atlas de Histologia de FREEMAN e BRACEGIRDLE (1966), o Manual de Histopatologia de Rato de FACCINI *et al.* (1990), o Manual de Histologia de KERR, (1999), e o Atlas de Histologia de GENESER, (2000).

A imagens histológicas utilizadas no trabalho, foram captadas num computador *Leica Q500IW*, com o auxílio do programa *Leica Qwin*.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – OCORRÊNCIA DE CIANOBACTÉRIAS NAS PRAIAS AMOSTRADAS

Após a primeira fase do trabalho realizado no laboratório (*vide* capítulo 2, pág. 28) constatou-se a presença de cianobactérias nas quatro praias escolhidas como alvo deste estudo. Na tabela 3.1, discrimina-se, por um lado, o total de amostras recolhidas em cada praia, e por outro, as respectivas percentagens de ocorrência.

Tabela 3.1 – Total de amostras recolhidas em cada praia e respectiva percentagem de ocorrência de cianobactérias.

Praia	Total De Amostras Recolhidas	Percentagem De Ocorrência
Espinho	39	35,9
Mira	32	50,0
Cabedelo-Figueira da Foz	38	36,8
São Pedro de Moel	30	56,6

A praia onde se registou uma maior percentagem de ocorrência de cianobactérias foi a de São Pedro de Moel (56,6), logo seguida da praia de Mira (50,0), da Figueira da Foz (36,8) e de Espinho (35,9). Salienta-se que o valor obtido para a praia de Espinho está de acordo com o valor -31,2%- obtido por MARTINS (1999). Os outros valores obtidos são inferiores aos encontrados para as praias estudadas por MARTINS (1999), o que vem ao encontro da conclusão do estudo de VIEIRA (2001), indicando que as águas das praias da zona norte apresentam menor qualidade do que as da zona centro.

No entanto, o caso da Praia do Cabedelo (Figueira da Foz) parece aparentemente contraditório. Segundo o estudo de VIEIRA (2001), apresenta água de má qualidade, e na verdade foi a única praia em que todas as amostras de água apresentaram cianobactérias; mas, curiosamente, apresentam uma taxa de ocorrência baixa.

Nas tabela 3.2 a 3.5, estão sumariados os resultados obtidos na detecção e identificação de cianobactérias nas praias escolhidas para este estudo. Após a apresentação de cada tabela procede-se a uma análise dos resultados. Para a

identificação de alguns géneros e espécies de algumas amostras recolhidas foi utilizado o Guia da Fauna e Flora do Litoral de Portugal de CAMPBELL (1994).

Tabela 3.2 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia de Espinho (16/07/99).

CÓDIGO	MATERIAL	LOCAL	CYANOBACTÉRIA
	RECOLHIDO	DE RECOLHA	IDENTIFICADA
E-1	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	V.N.	—
E-2	Craca (<i>Balamus</i> sp.)	V.N.	—
E-3	Raspagem de rocha	V.N.	—
E-4	Raspagem de rocha	V.N.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-5	Raspagem de rocha	V.N.	—
E-6	Percebe (<i>Lepas</i> sp.)	V.N.	—
E-7	(Mexilhão) <i>Mytilus</i> sp.	V.N.	—
E-8	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	V.N.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-9	Craca (<i>Balamus</i> sp.)	V.N.	Oscillatoriales
E-10	Alga verde	V.N.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-11	Alga filamentosa	V.N.	—
E-12	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	V.N.	—
E-13	Raspagem de rocha	V.S.	Chroococcales
E-14	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	V.S.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-15	Raspagem de rocha	V.S.	Oscillatoriales e <i>Spirulina</i> sp.
E-16	Alga (<i>Chondria coerulescens</i>)	V.S.	—
E-17	Búzio (<i>Gibbula</i> sp.)	V.S.	—
E-18	Alga verde	V.S.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-19	Rec. de <i>Pomatoceros triqueter</i>	V.S.	—
E-20	(Mexilhão) <i>Mytilus</i> sp.	V.S.	—
E-21	Búzio (<i>Gibbula</i> sp.)	V.S.	—
E-22	Amêijoia	V.S.	—
E-23	Cracas (<i>Balamus</i> sp.)	V.S.	—
E-24	Rec. de <i>Pomatoceros triqueter</i>	V.S.	Oscillatoriales
E-25	Esponja cor de laranja	V.S.	—
E-26	Craca (<i>Balamus</i> sp.)	V.S.	—
E-27	Esponja verde	V.S.	—
E-28	Rec. de <i>Pomatoceros triqueter</i>	V.S.	—
E-29	Raspagem de rocha	R.C.	—
E-30	Raspagem de rocha	R.C.	Chroococcales
E-31	Raspagem de rocha	R.C.	—
E-32	Raspagem de rocha	R.C.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-33	Rec. de <i>Pomatoceros triqueter</i>	R.C.	Oscillatoriales e Chroococcales
E-34	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	R.C.	—
E-35	Esponja cor de laranja	R.C.	—
E-36	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	R.C.	Chroococcales
E-37	Alga (<i>Dictyota</i> sp.)	R.C.	—
E-38	Água do mar	V.N.	—
E-39	Água do mar	V.S.	Oscillatoriales

Observações – A recolha destas amostras foi feita numa praia em frente ao Casino de Espinho. O dia apresentava uma temperatura amena, com vento fraco de Norte. Ondulação de cerca de meio metro. Salienta-se que na vertente norte do paredão (V.N.) a abundância e diversidade de espécies era muito menor do que na vertente sul (V.S.). Foram também feitas recolhas num agregado de rochoso natural (R.C.). (—) não foram observadas cianobactérias.

Analisando a tabela 3.2, verifica-se que nas amostras recolhidas no intuito de detectar cianobactérias planctónicas apenas se identificaram estes microorganismos na amostra recolhida na vertente sul do paredão (Figura 3.21).

No que se refere às amostras recolhidas para a detecção de cianobactérias bentónicas, constatou-se que nas recolhidas no lado sul do paredão (V.S e R.C) foi detectado uma maior diversidade de cianobactérias (15 estirpes em 25 amostras) do que nas recolhidas no lado norte (7 estirpes em 12 amostras). Verifica-se também que o número de amostras com cianobactérias é maior na vertente sul (10 amostras em 25) do que na vertente norte (4 amostras em 12). Todos os factos atrás mencionados estão de acordo com o que foi observado durante a recolha das amostras: a diversidade biológica era maior na vertente sul do que na vertente norte.

Abordando mais detalhadamente a tabela 3.2, verifica-se que as cianobactérias bentónicas detectadas provieram de amostras de rochas (Figuras 3.1, 3.2, 3.8, 3.11, 3.12, 3.16, 3.17 e 3.18), algas verdes (Figuras 3.6, 3.7, 3.13, 3.14), Cracas (Figura 3.5) e recifes de *Pomatoceros triqueter* (Figuras 3.15 e 3.19) e de *Sabellaria alveolata* (Figuras 3.3, 3.4, 3.9, 3.10 e 3.20).

Por fim verifica-se que nesta praia foram encontradas doze estirpes pertencentes à ordem Oscillatoriales, dentro da qual se conseguiu identificar uma pertencente género *Spirulina* sp. e dez à Chroococcales representadas nas fotografia que se seguem.

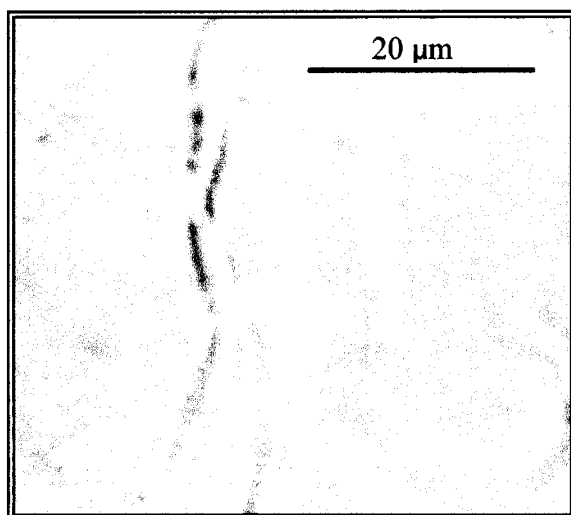


Figura 3.1 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-4.

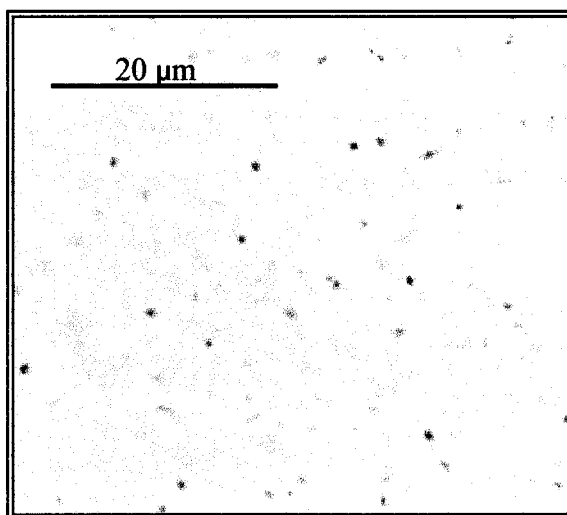


Figura 3.2 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-4.

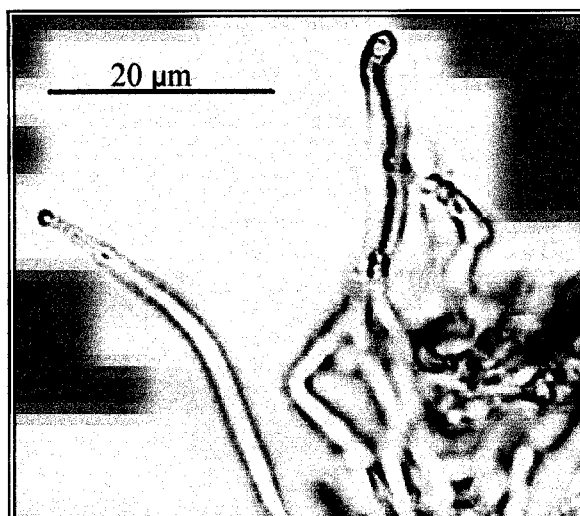


Figura 3.3 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-8.

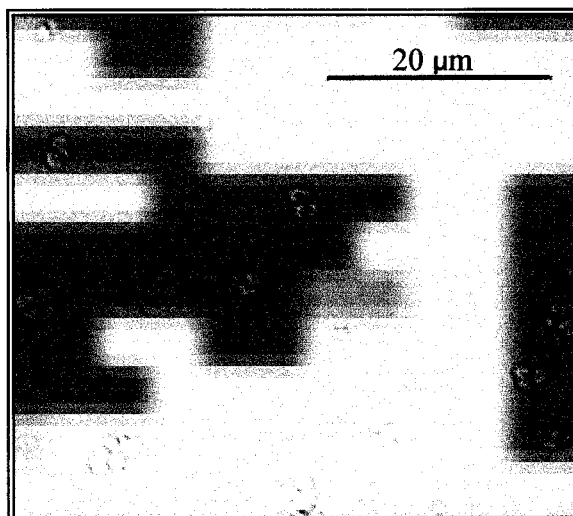


Figura 3.4 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-8.

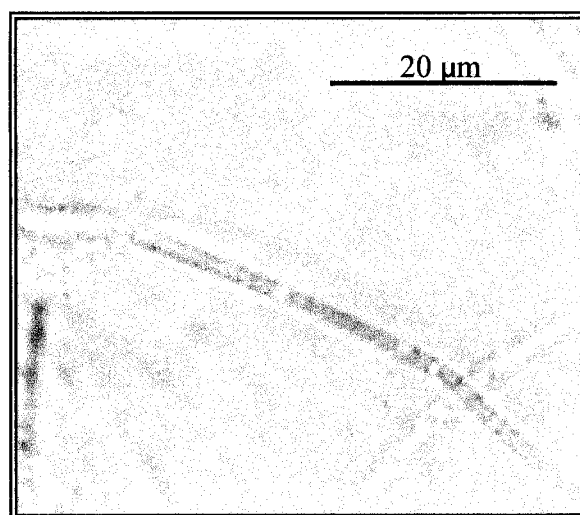


Figura 3.5 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-9.

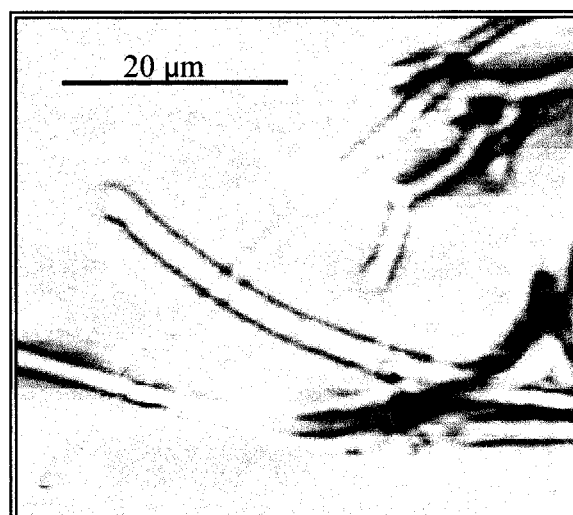


Figura 3.6 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-10.

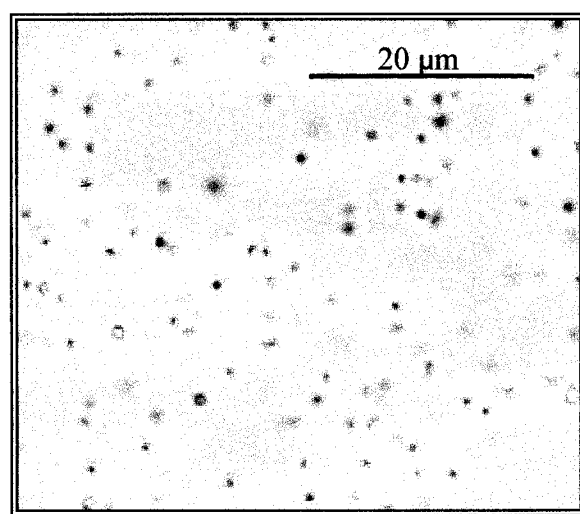


Figura 3.7 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-10.

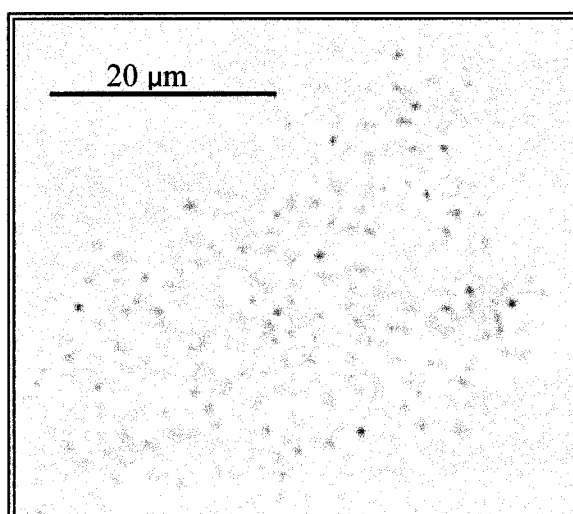


Figura 3.8 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-13.

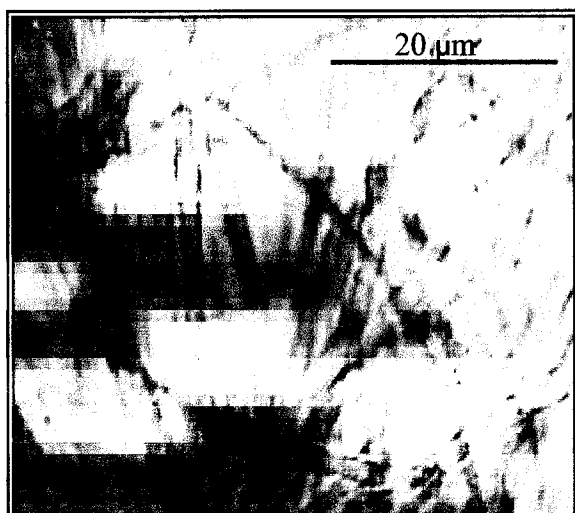


Figura 3.9– Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-14.

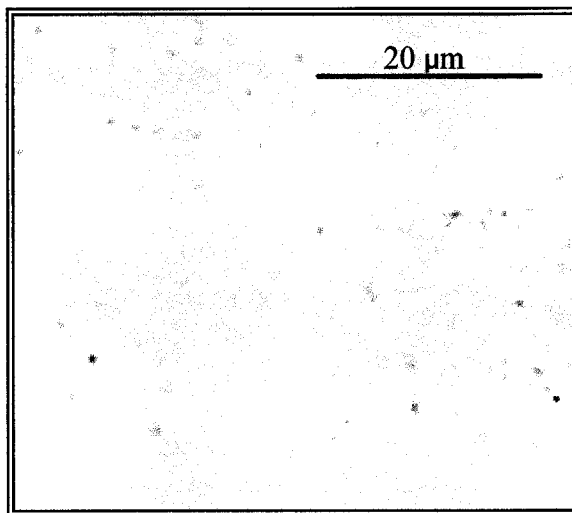


Figura 3.10 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-14.

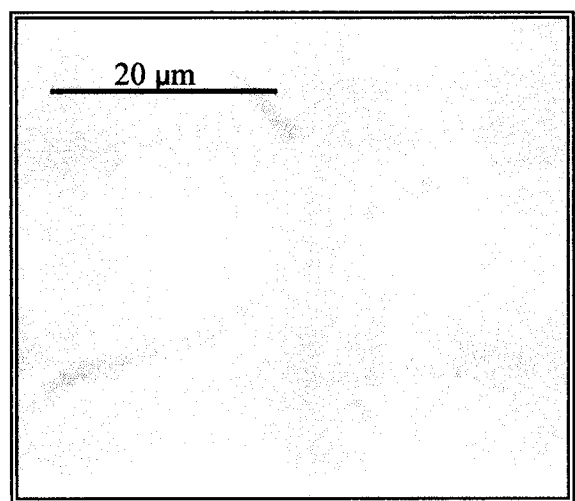


Figura 3.11 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-15.

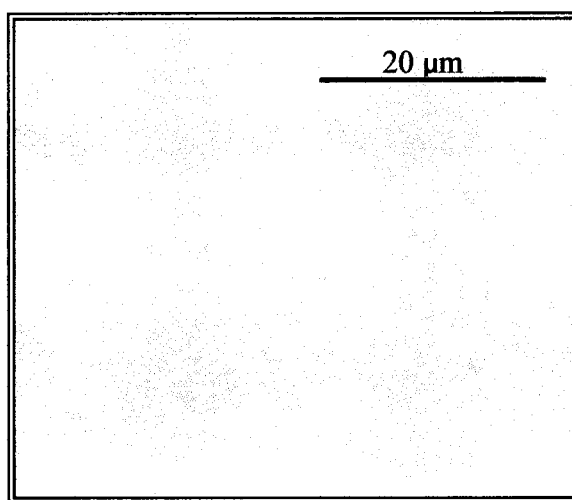


Figura 3.12 – *Spirulina* sp. encontrada na amostra E-15.

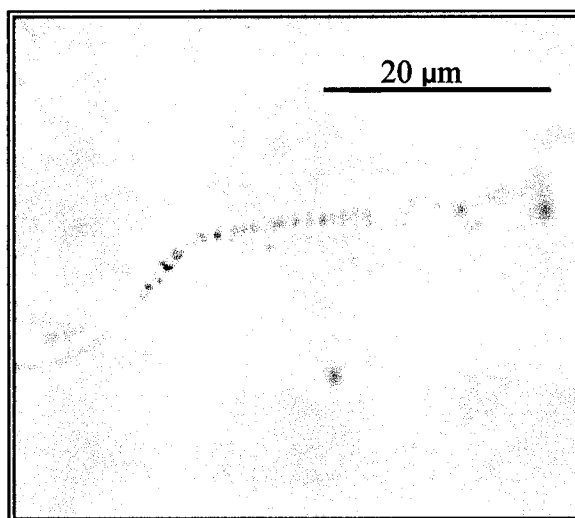


Figura 3.13 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-18.

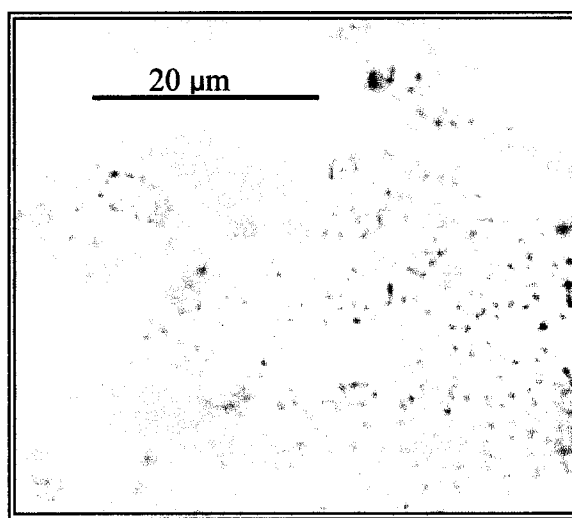


Figura 3.14 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-18.

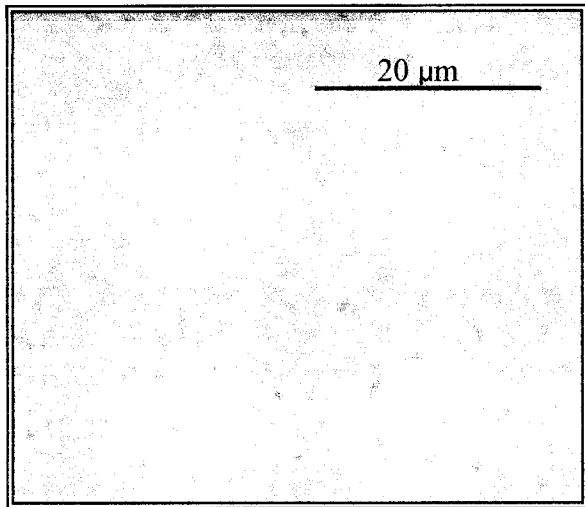


Figura 3.15 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-24.

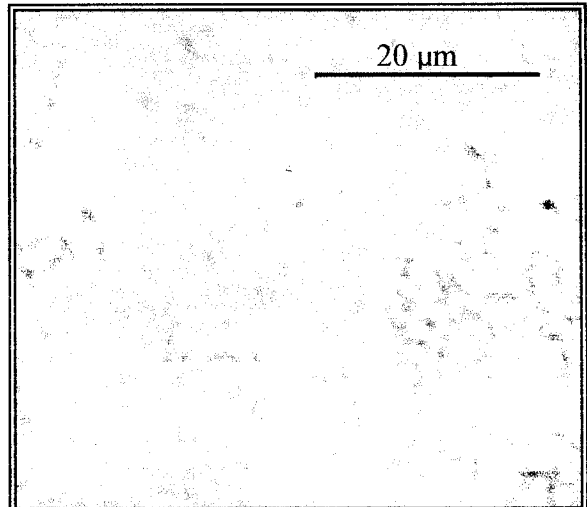


Figura 3.16 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra E-30.

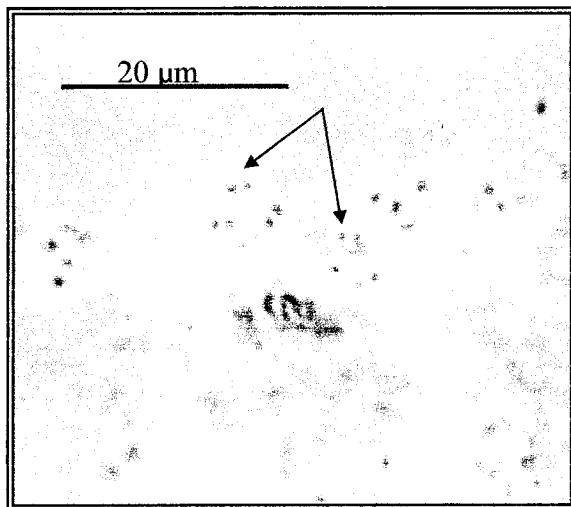


Figura 3.17 – Cianobactéria da ordem Chroococcales (setas) encontrada na amostra E-32.

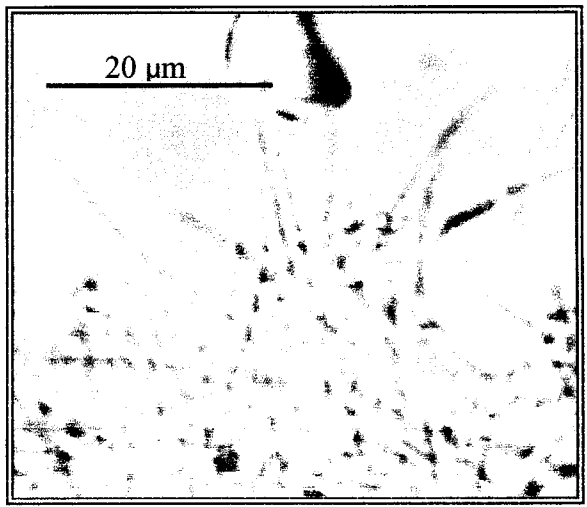


Figura 3.18 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra E-32.

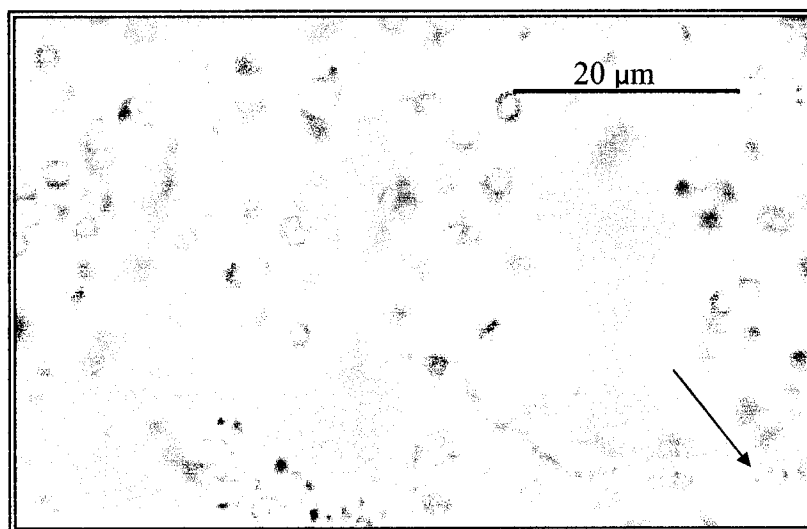


Figura 3.19 – Cianobactérias das ordens Chroococcales e Oscillatoriales (seta) encontradas na amostra E-33.

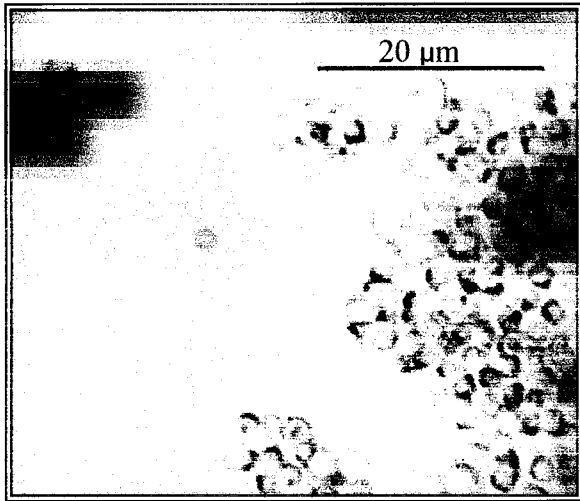


Figura 3.20 – Cianobactérias da ordem Chroococcales encontradas na amostra E-36.

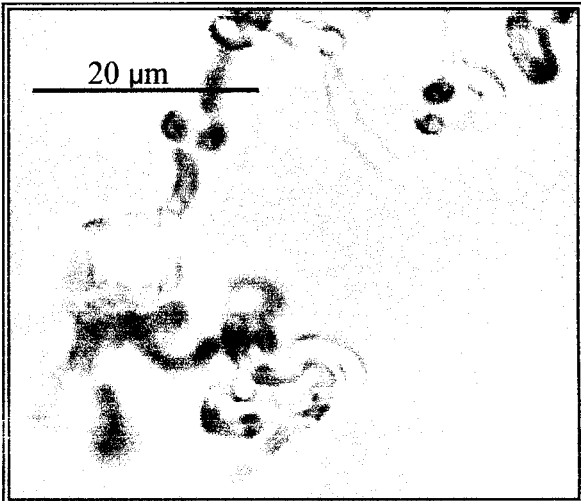


Figura 3.21 – Cianobactérias da ordem Oscillatoriales encontradas na amostra E-39.

Tabela 3.3 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia de Mira (12/09/99).

CÓDIGO	MATERIAL RECOLHIDO	LOCAL DE RECOLHA	CIANOBACTÉRIA IDENTIFICADA
M-1	Raspagem de rocha	V.N.	—
M-2	Raspagem de rocha	V.N.	—
M-3	Raspagem de rocha	V.N.	—
M-4	Raspagem de rocha	V.N.	—
M-5	Raspagem de rocha	V.N.	Oscillatoriales e <i>Chroococcus</i> sp.
M-6	Raspagem de rocha	V.N.	Oscillatoriales
M-7	Raspagem de rocha	V.N.	Oscillatoriales
M-8	Raspagem de rocha	V.N.	Oscillatoriales
M-9	Raspagem de rocha	V.S.	—
M-10	Raspagem de rocha	V.S.	Oscillatoriales
M-11	Raspagem de rocha	V.S.	Oscillatoriales
M-12	Raspagem de rocha	V.S.	Oscillatoriales
M-13	Raspagem de rocha	V.S.	Oscillatoriales
M-14	Raspagem de rocha	V.S.	—
M-15	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	V.S.	Oscillatoriales
M-16	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	V.S.	Oscillatoriales (2 tipos) e Chroococcales
M-17	Alga verde incrustada	V.S.	Chroococcales
M-18	(Mexilhão) <i>Mytilus</i> sp.	V.S.	Oscillatoriales
M-19	Alga castanha incrustada	V.S.	—
M-20	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	V.S.	Chroococcales
M-21	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	V.S.	—
M-22	(Mexilhão) <i>Mytilus</i> sp.	V.S.	—
M-23	Percebe (<i>Lepas</i> sp.)	V.S.	—
M-24	Alga castanha Incrustada	V.N.	—
M-25	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	V.N.	—
M-26	Percebe (<i>Lepas</i> sp.)	V.N.	—
M-27	(Mexilhão) <i>Mytilus</i> sp.	V.N.	Oscillatoriales (2 tipos) e <i>Spirulina</i> sp.
M-28	Alga verde incrustada	V.N.	—
M-29	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	V.N.	Oscillatoriales e Chroococcales
M-30	<i>Mytilus</i> sp. incrustado em seixo	V.N.	Oscillatoriales
M-31	Raspagem de rocha (pequena)	V.N.	—
M-32	Água do mar	V.N.	—

Observações – A temperatura do ar no dia da amostragem era amena, notando-se um ligeiro vento de norte. A ondulação era de cerca de 2 metros. (—) não foram detectadas cianobactérias.

Através da análise sumária da tabela 3.3 constata-se que, por um lado, não se detectaram cianobactérias planctónicas e por outro, foram detectadas cianobactérias em todos os tipos de amostras recolhidas.

Verifica-se também que as cianobactérias bentónicas detectadas provieram de amostras de rochas (Figuras 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29 e 3.30), algas verdes (Figuras 3.35), *Balanus* sp (Figuras 3.31, 3.41 e 3.42), recifes de *Sabellaria alveolata* (Figuras 3.32, 3.33, 3.34, 3.37) e *Mytilus* sp. (Figuras 3.36, 3.38, 3.39, 3.40 e 3.43).

Foram detectadas dezassete estirpes pertencentes à ordem Oscillatoriales, da qual se destaca uma pertencente ao Género *Spirulina* sp. e cinco à Chroococcales.

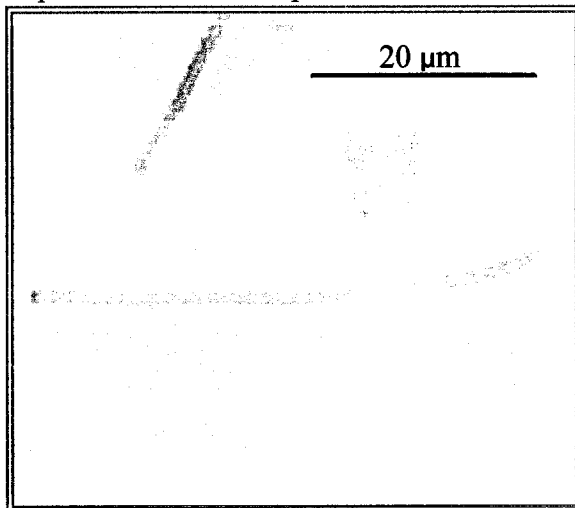


Figura 3.22 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-5.

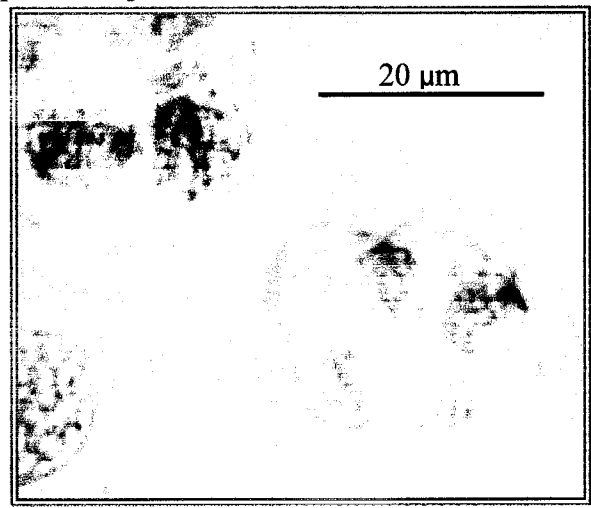


Figura 3.23 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra M-5.

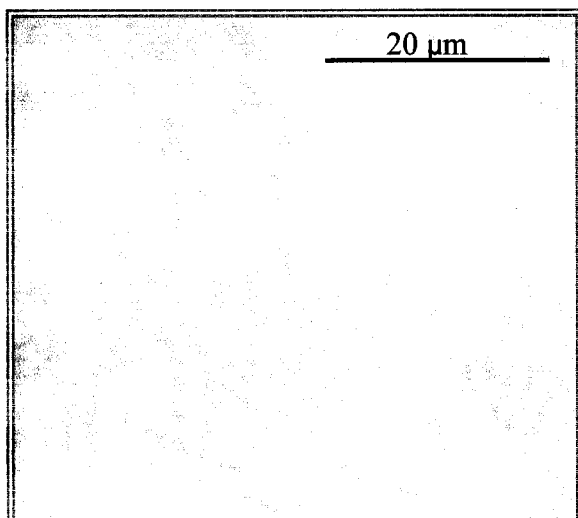


Figura 3.24 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-6.

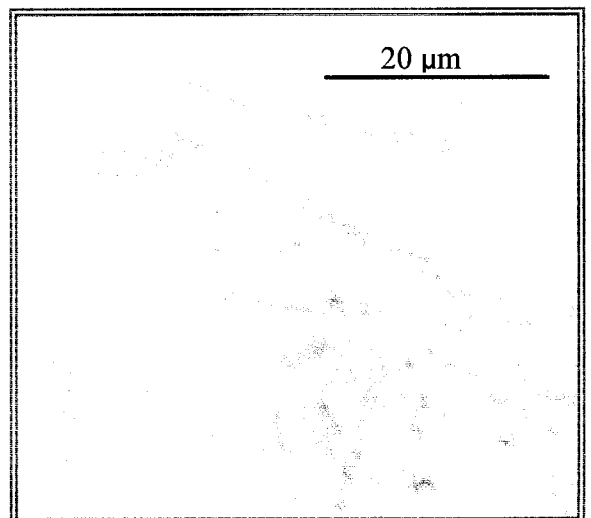


Figura 3.25 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-7.

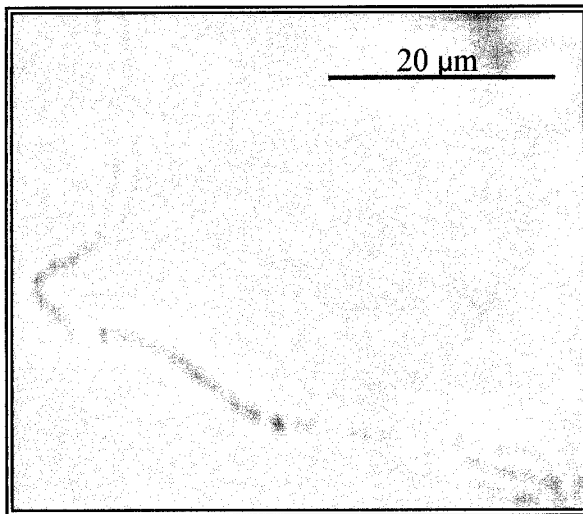


Figura 3.26 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-8.

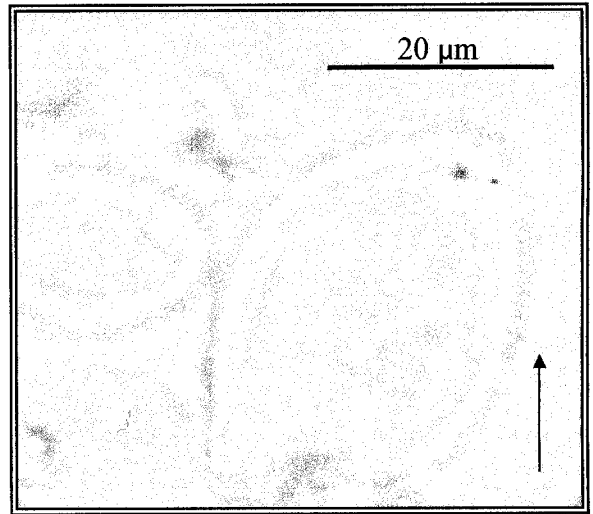


Figura 3.27 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-10.

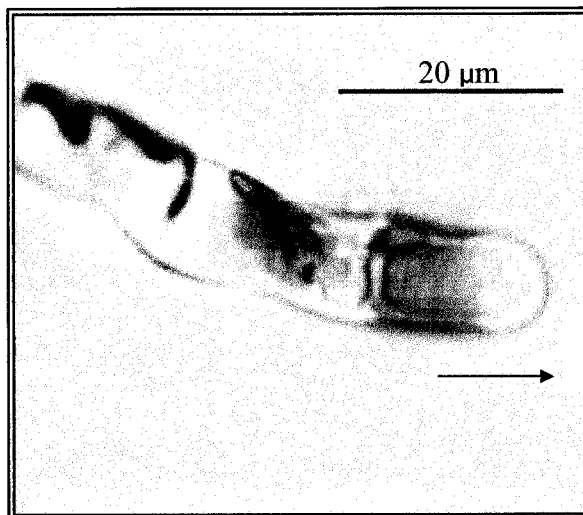


Figura 3.28 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-11.

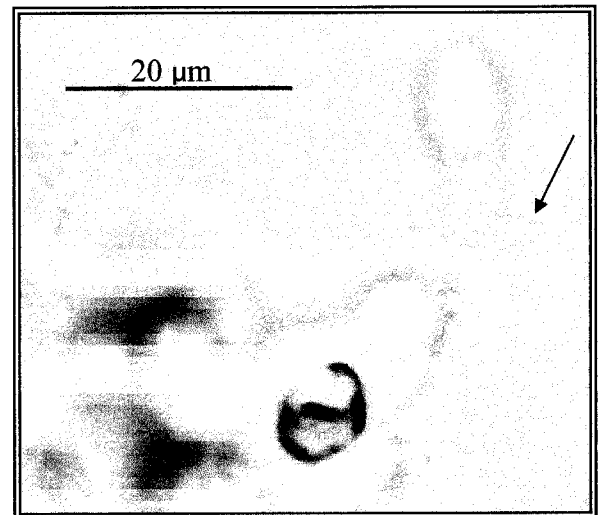


Figura 3.29 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-12.



Figura 3.30 – Cianobactérias da ordem Oscillatoriales (seta) possivelmente em simbiose com uma alga verde encontrada na amostra M-13.

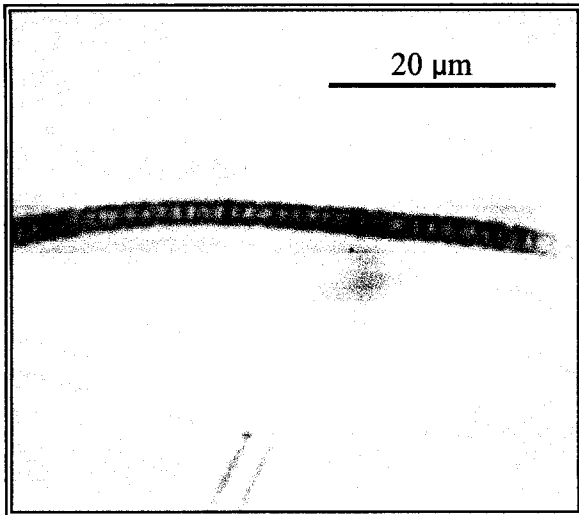


Figura 3.31 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-15.

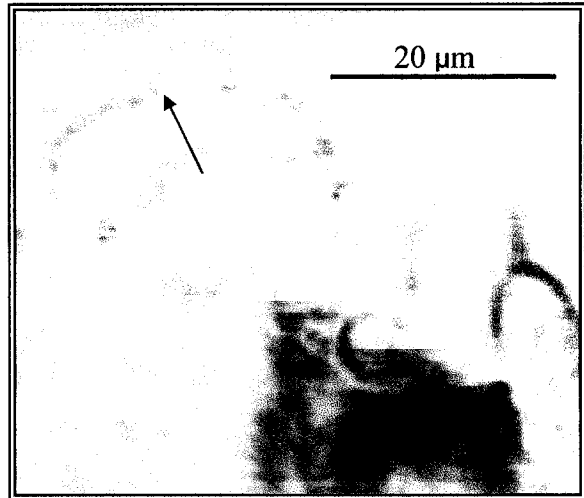


Figura 3.32– Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra M-16.

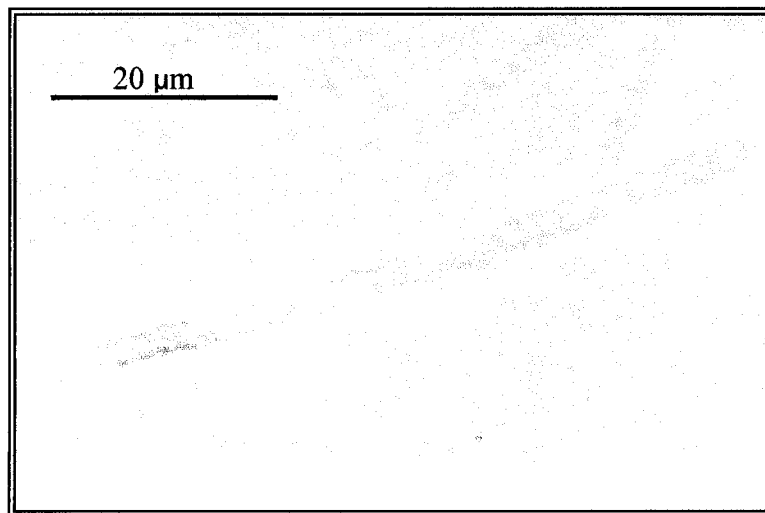


Figura 3.33 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-16.

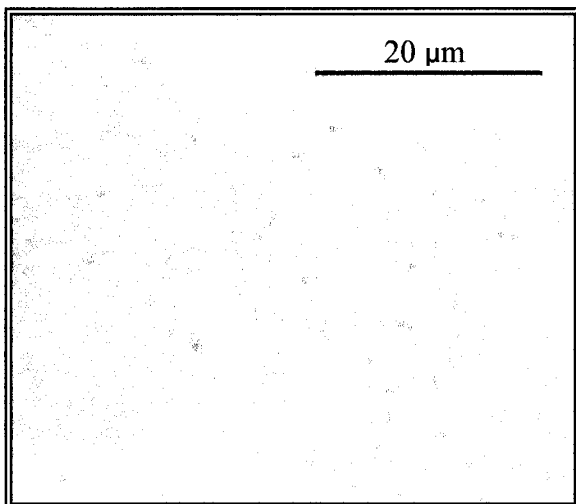


Figura 3.34 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-16.

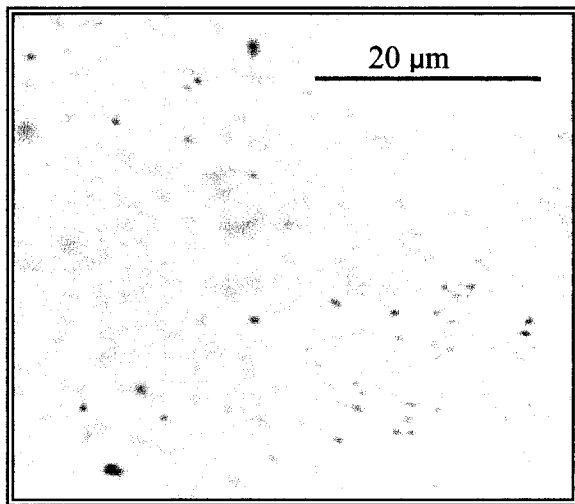


Figura 3.35 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-17.

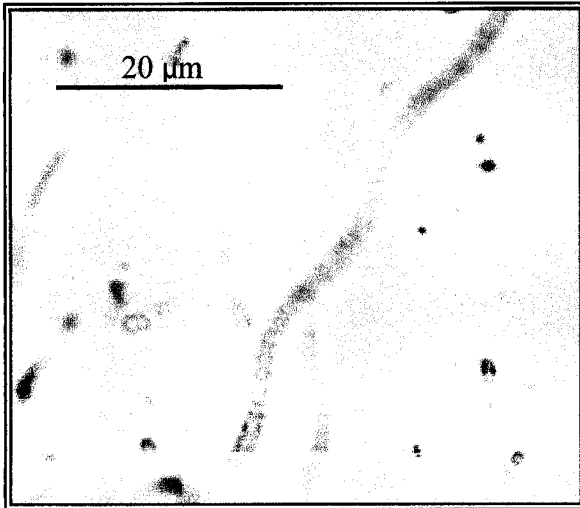


Figura 3.36 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-18.

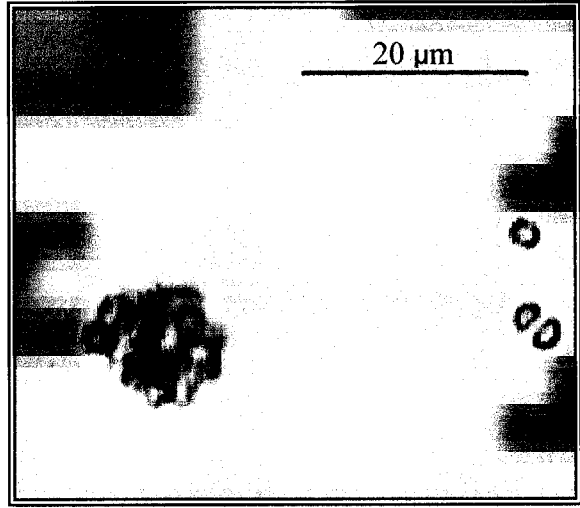


Figura 3.37 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-20.

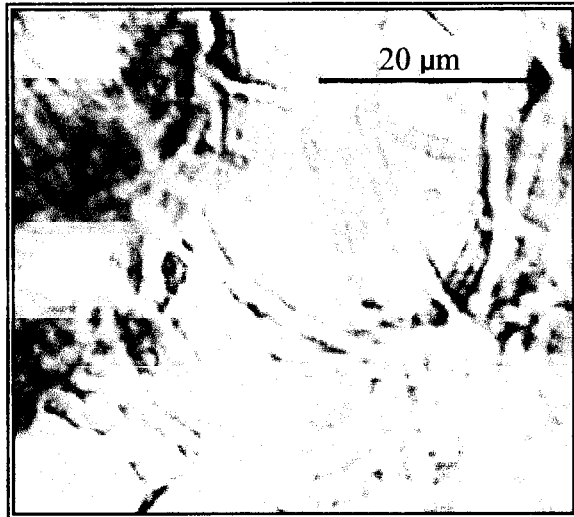


Figura 3.38 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-27.

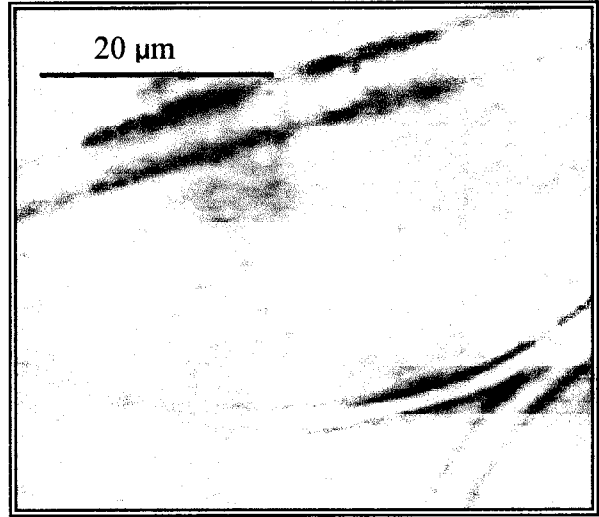


Figura 3.39 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-27.

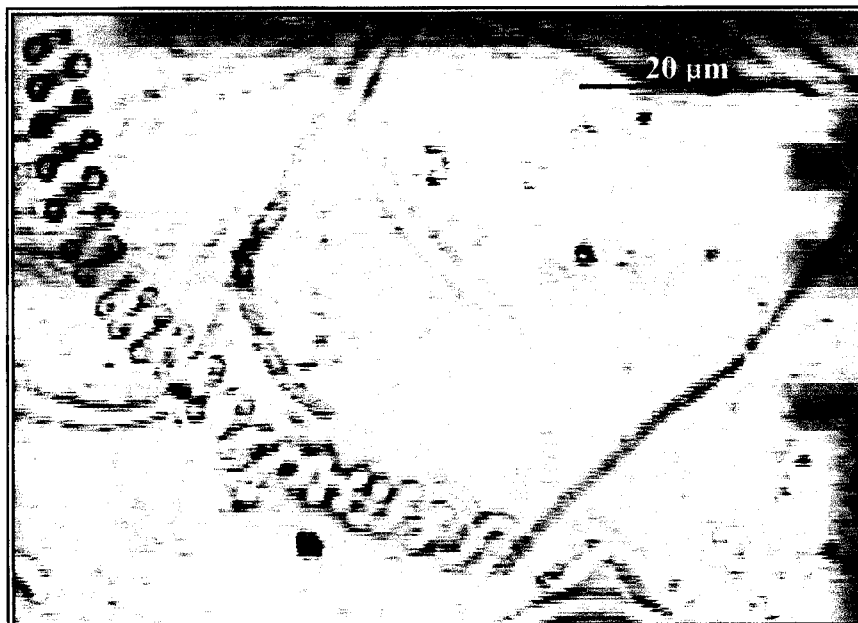


Figura 3.40 – *Spirulina* sp. (seta) encontrada na amostra M-27.

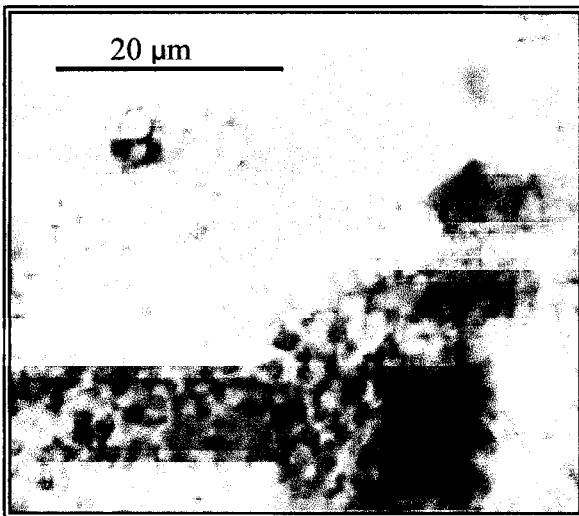


Figura 3.41 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra M-29.

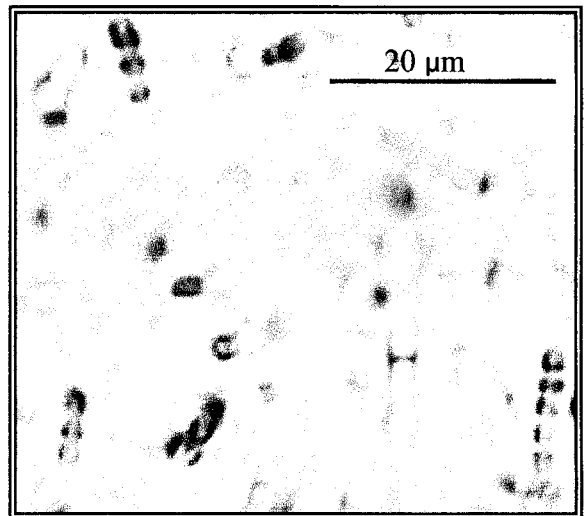


Figura 3.42 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-29.

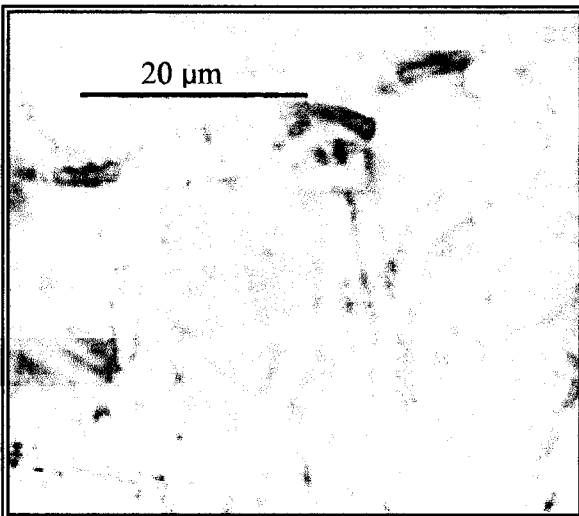


Figura 3.43 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra M-30.

Tabela 3.4 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia da Figueira da Foz (Cabedelo e Cabedelinho) (24/08/99).

CÓDIGO	MATERIAL	LOCAL	CYANOBACTÉRIA
	RECOLHIDO	RECOLHA	IDENTIFICADA
FF-1	Raspagem de rocha	P.F-V.S	—
FF-2	Raspagem de rocha	P.F-V.S	Chroococcales
FF-3	Raspagem de rocha	P.F-V.S	Oscillatoriales
FF-4	Raspagem de rocha	P.F-V.S	Chroococcales
FF-5	Raspagem de rocha	P.F-V.S	—
FF-6	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	P.F-V.S	—
FF-7	Mexilhão (<i>Mytilus</i> sp.)	P.F-V.S	Oscillatoriales
FF-8	Rec. de <i>Pomatoceros triqueter</i>	P.F-V.S	—
FF-9	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	P.F-V.S	<i>Synechocystis</i> sp.
FF-10	Pedaço de concha	P.F-V.S	—
FF-11	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	P.F-V.S	—
FF-12	Percebe (<i>Lepas</i> sp.)	P.F-V.S	—
FF-13	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	P.F-V.S	—
FF-14	Alga verde incrustada	P.F-V.S	—
FF-15	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	P.F-V.S	<i>Synechocystis</i> sp.
FF-16	Raspagem de rocha	P.F-V.P	—
FF-17	Raspagem de rocha	P.F-V.P	Oscillatoriales
FF-18	R. cal (<i>Pomatoceros triqueter</i>)	P.F-V.P	—
FF-19	Cracas	P.F-V.P	—
FF-20	Algas cast (<i>Fucus vesiculosus</i> .)	P.F-V.P	Oscillatoriales
FF-21	Raspagem de rocha	P.F-V.P	<i>Phormidium</i> sp.
FF-22	Alga verde	P.F-V.P	—
FF-23	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	P.F-V.P	—
FF-24	Mexilhão (<i>Mytilus</i> sp.)	P.F-V.P	—
FF-25	Búzios (<i>Littorina</i> sp.)	P.F-V.P	—
FF-26	Raspagem de rocha	P.E-V.S	—
FF-27	Raspagem de rocha	P.E-V.S	—
FF-28	Raspagem de rocha	P.E-V.S	—
FF-29	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	P.E-V.S	—
FF-30	Mexilhão (<i>Mytilus</i> sp.)	P.E-V.S	Chroococcales
FF-31	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	P.E-V.S	—
FF-32	Algas Castanhas	P.E-V.S	—
FF-33	Alga verde	P.E-V.S	—
FF-34	Rec. de <i>Pomatoceros triqueter</i>	P.E-V.S	Chroococcales (2 tipos) e Oscillatoriales
FF-35	Raspagem de rocha	P.E-V.S	—
FF-36	Água do mar	P.E-V.S	<i>Phormidium</i> sp.
FF-37	Água do mar	P.F-V.P	Chroococcales
FF-38	Água do mar	P.F-V.S	Oscillatoriales e Chroococcales

Observações – A temperatura do ar no dia da amostragem era amena, notando. Vento fraco. A ondulação era de meio metro no Cabedelo (P.F-V.S.) e praticamente inexistente no Cabedelinho (P.F-V.N e P.E-V.S). O Cabedelinho é uma pequena praia que fica entre a foz do rio Mondego e a praia do Cabedelo. (—) não foram detectadas cianobactérias.

Analisando a tabela 3.4, constata-se que todas as amostras recolhidas foram positivas para cianobactérias planctónicas (Figuras 3.57, 3.58 e 3.59). Verifica-se também que as cianobactérias foram detectadas nas amostras de rocha (Figuras 3.44, 3.45, 3.46, 3.50 e 3.52) *Fucus vesiculosus* (Figuras 3.51), recife de *Sabellaria alveolata* (Figuras 3.48 e 3.49), recife de *Pomatoceros triqueter* (Figuras 3.54, 3.55 e 3.56) e *Mytilus* sp. (Figuras 3.47 e 3.53). Salienta-se ainda que o local onde se encontraram mais estirpes de bentónicas cianobactérias foi a vertente sul (P.F-V.S) do paredão que

separa o Cabedelinho do Cabedelo (6 estirpes em 15 amostras). Foram detectadas oito estirpes pertencentes à ordem Oscillatoriales e nove à Chroococcales.

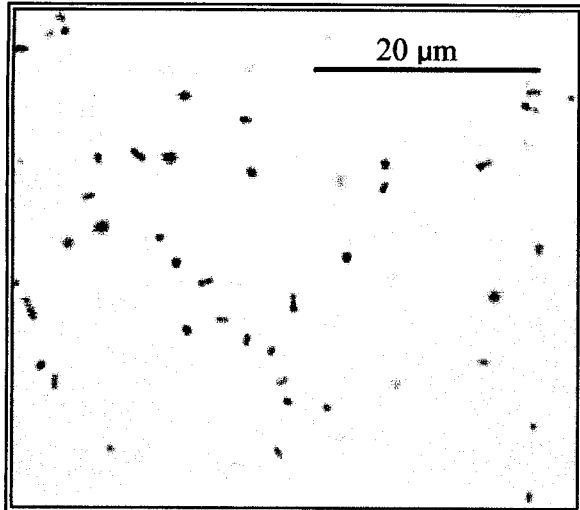


Figura 3.44 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-2.

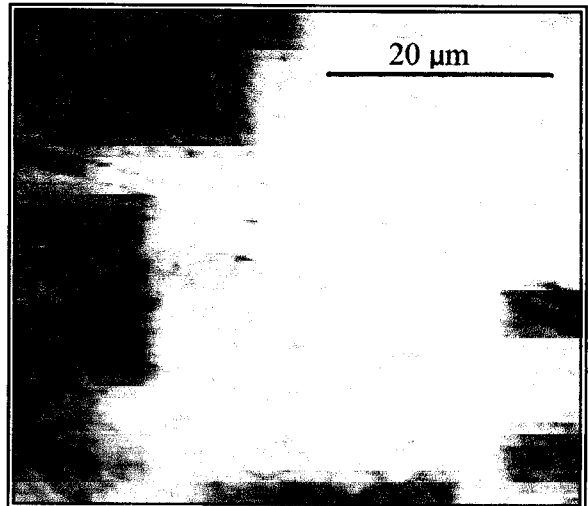


Figura 3.45 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-3.

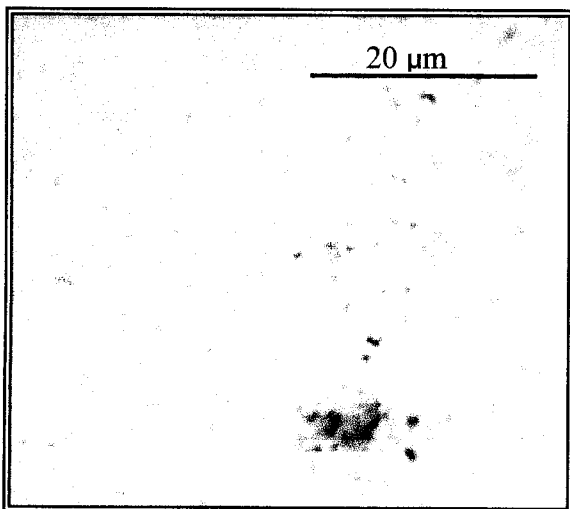


Figura 3.46 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-4.

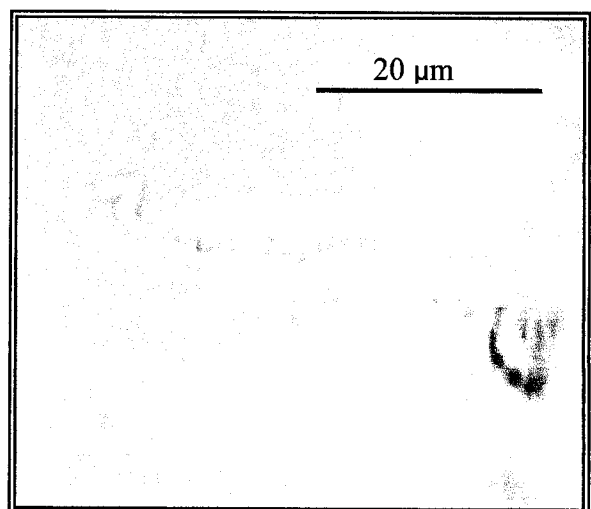


Figura 3.47 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-7.

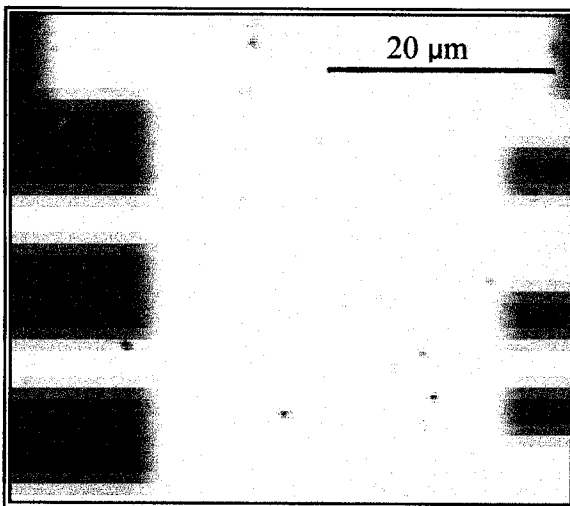


Figura 3.48 – Cianobactéria do gênero *Synechocystis* sp. encontrada na amostra FF-9.

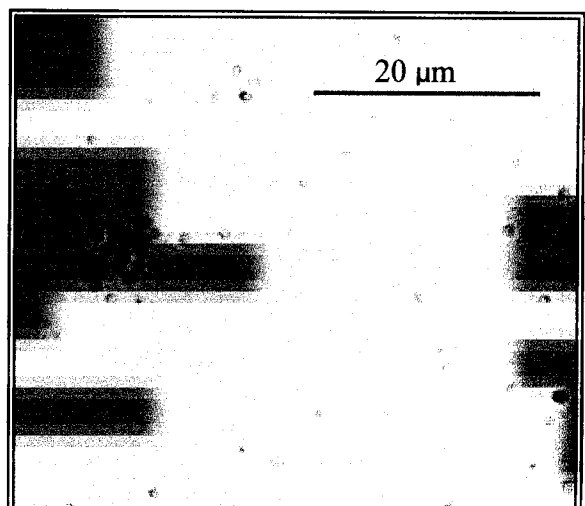


Figura 3.49 – Cianobactéria do gênero *Synechocystis* encontrada na amostra FF-15.

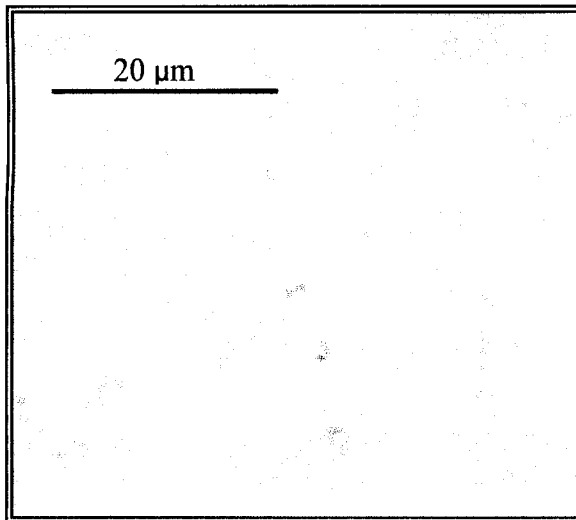


Figura 3.50 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-17.

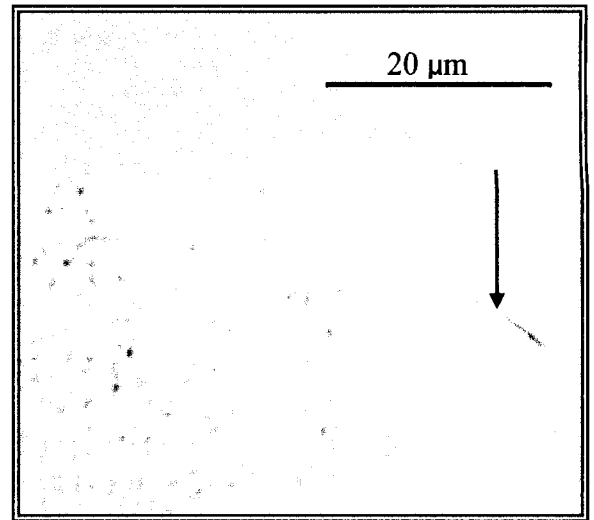


Figura 3.51 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra FF-20.

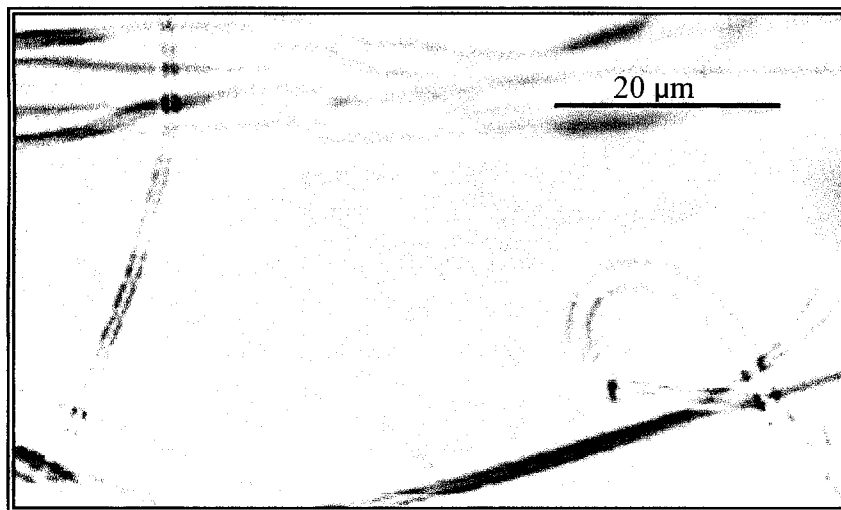


Figura 3.52 – Cianobactéria do gênero *Phormidium* sp. encontrada na amostra FF-21.

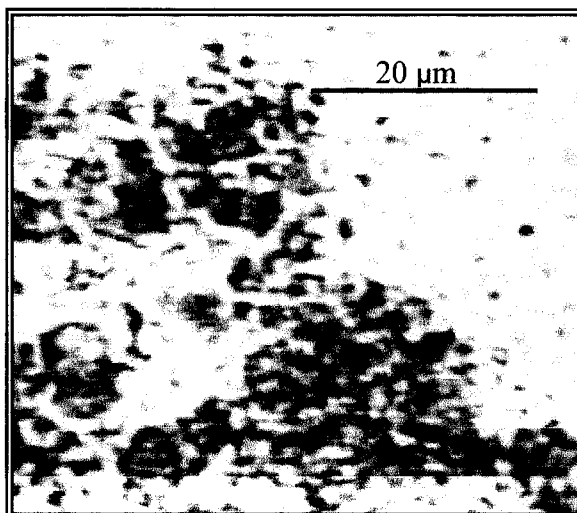


Figura 3.53 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-30.

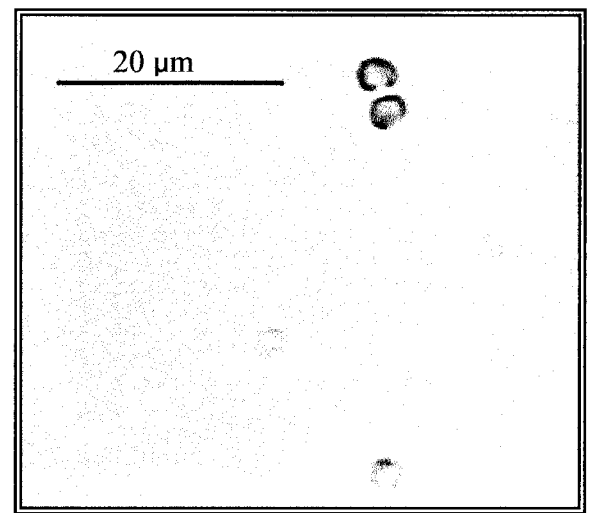


Figura 3.54 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra FF-34.

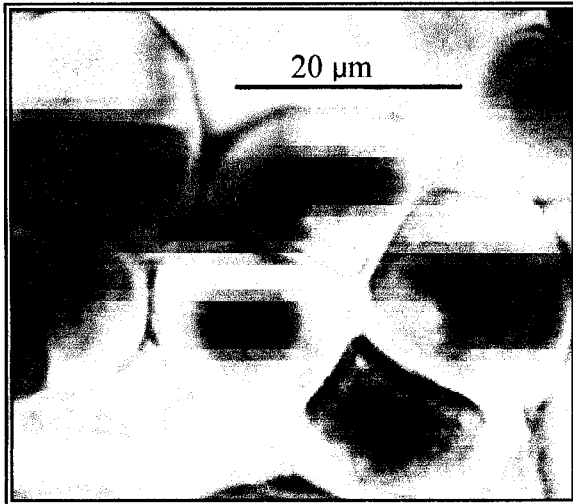


Figura 3.55 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra FF-34.

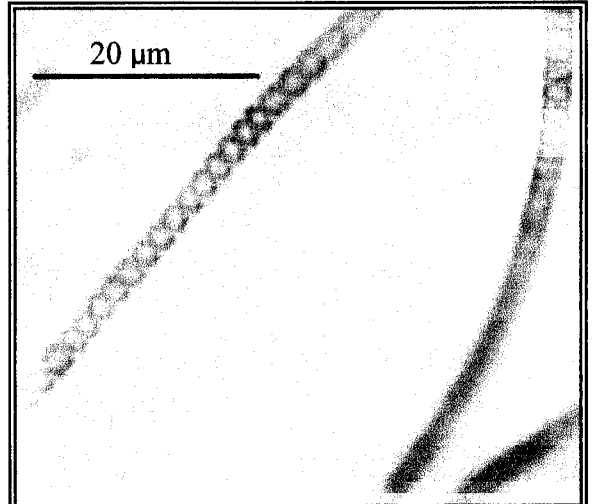


Figura 3.56 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra FF-34.

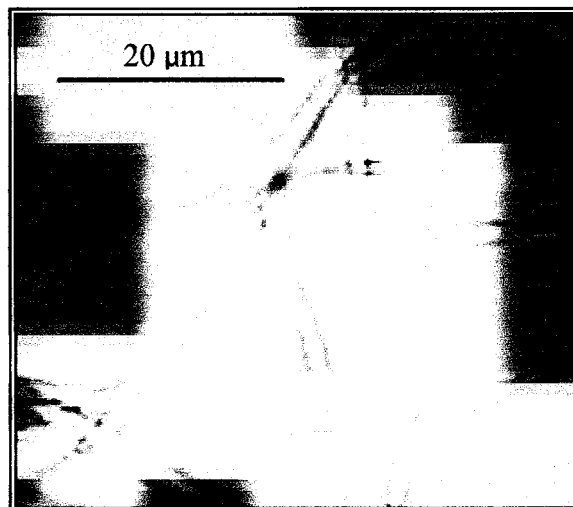


Figura 3.57 – Cianobactéria do género *Phormidium* sp. encontrada na amostra FF-36.

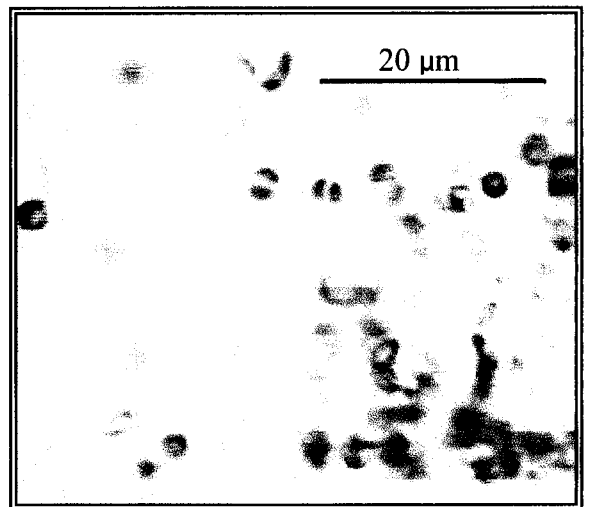


Figura 3.58 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra FF-37.

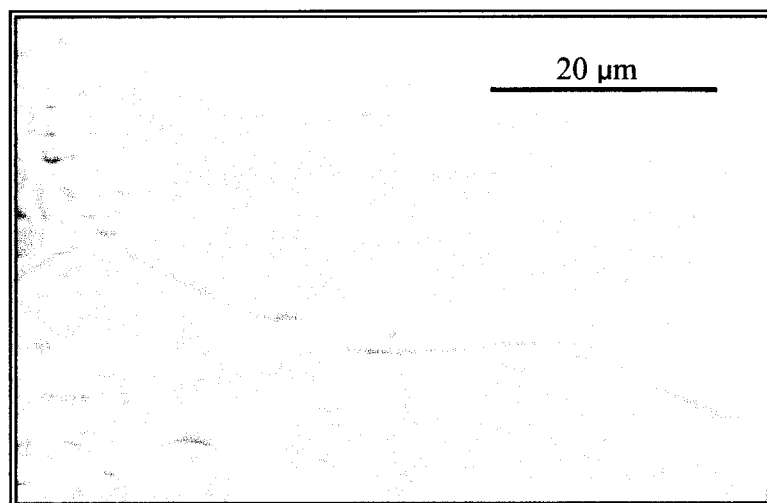


Figura 3.59 – Cianobactérias das ordens Oscillatoriales e Chroococcales encontradas na amostra FF-38.

Tabela 3.5 – Ocorrência de cianobactérias nas amostras recolhidas na Praia de São Pedro de Moel (22/08/99).

CÓDIGO	MATERIAL	LOCAL	CYANOBACTÉRIA
	RECOLHIDO	RECOLHA	IDENTIFICADA
SP-1	Raspagem de rocha	Farol	<i>Chlorogloeopsis</i> sp.
SP-2	Raspagem de rocha	Farol	Oscillatoriales
SP-3	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	Farol	<i>Chlorogloeopsis</i> sp., Chroococcales e <i>Chroococcus</i> sp.
SP-4	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	Farol	Oscillatoriales
SP-5	Mexilhão (<i>Mytilus</i> sp.)	Farol	Oscillatoriales
SP-6	Percebe (<i>Lepas</i> sp.)	Farol	—
SP-7	Água do Mar	Farol	Oscillatoriales e Chroococcales
SP-8	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	Farol	<i>Chlorogloeopsis</i> sp.
SP-9	Aném. (<i>Bunodactis verrucosa</i>)	Farol	—
SP-10	Água do mar	Praia	—
SP-11	Raspagem de rocha	Praia	—
SP-12	Raspagem de rocha	Praia	—
SP-13	Raspagem de rocha	Praia	Oscillatoriales (2 tipos)
SP-14	Raspagem de rocha	Praia	<i>Chroococcus</i> sp.
SP-15	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	Praia	—
SP-16	Mexilhão (<i>Mytilus</i> sp.)	Praia	—
SP-17	<i>Lepidopleurus asellus</i>	Praia	Oscillatoriales e <i>Chroococcus</i> sp.
SP-18	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	Farol	—
SP-19	Anémona verde	Farol	—
SP-20	Anémona (<i>Actinia equina</i>)	Farol	Oscillatoriales
SP-21	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	Farol	Oscillatoriales e <i>Chroococcus</i> sp.
SP-22	Recife de <i>Sabellaria alveolata</i>	Farol	Oscillatoriales
SP-23	Anémona verde	Farol	—
SP-24	Búzio (<i>Littorina</i> sp.)	Farol	—
SP-25	Búzio (<i>Littorina</i> sp.)	Farol	Oscillatoriales
SP-26	Alga castanha	Farol	—
SP-27	Mexilhão (<i>Mytilus</i> sp.)	Farol	Oscillatoriales
SP-28	Lapa (<i>Patella</i> sp.)	Farol	—
SP-29	Percebe (<i>Lepas</i> sp.)	Farol	Oscillatoriales
SP-30	Craca (<i>Balanus</i> sp.)	Farol	—

Observações – A temperatura era amena. Leve brisa marítima. A ondulação era de 1 a 2 metros. Salienta-se que na zona da praia mais concorrida (Praia) a abundância e diversidade de espécies era muito menor do que na zona menos concorrida (Farol.). (—) não foram detectadas cianobactérias.

Na tabela anterior verifica-se que se encontraram cianobactérias planctónicas na água do mar colhida no farol (Figuras 3.67 e 3.68). Pode também constatar-se que, neste local existe uma maior percentagem de amostras com cianobactérias bentónicas (13 amostras em 21) do que na zona da praia (3 amostras em 7), o que está de acordo com o observado em relação à diversidade de espécies nos dois locais. Verifica-se também que as cianobactérias foram detectadas nas amostras de rocha (Figuras 3.60, 3.61, 3.70, 3.71 e 3.72) *Actinia equina* (Figura 3.75), recife de *Sabellaria alveolata* (Figuras 3.76, 3.77 e 3.78), *Balanus* sp. (Figuras 3.62, 3.63, 3.64 e 3.69), *Mytilus* sp. (Figuras 3.66 e 3.80), *Patella* sp. (Figuras 3.65), *Lepidopleurus asellus* (Figuras 3.73 e 3.74), *Littorina* sp. (Figura 3.79) e *Lepas* sp. (Figura 3.81). Destaca-se, ainda, que apenas não foram detectadas cianobactérias bentónicas nas amostras de algas castanhas.

Foram detectadas treze estirpes pertencentes à ordem Oscillatoriales, seis à Chroococcales e três à Nostocales (pertencentes ao género *Chlorogloeopsis*).

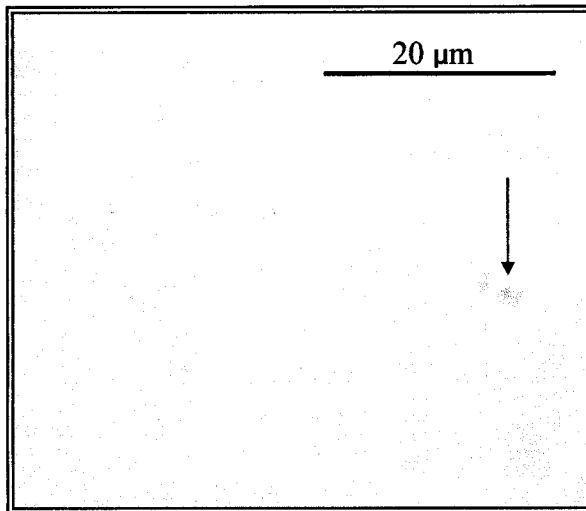


Figura 3.60 – Cianobactéria possivelmente do género *Chlorogloeopsis* sp. (seta) encontrada na amostra SP-1.

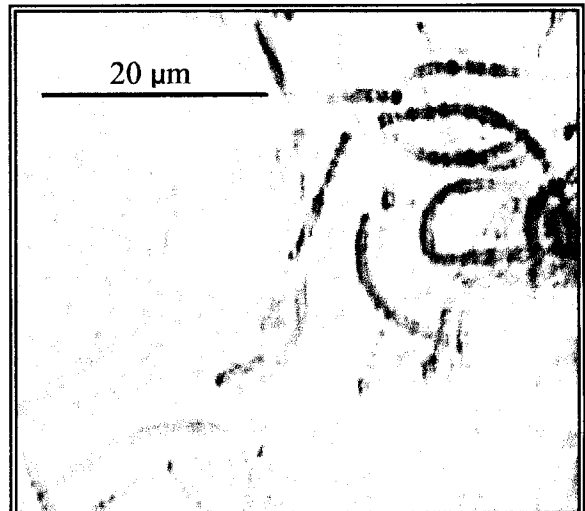


Figura 3.61 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-2.

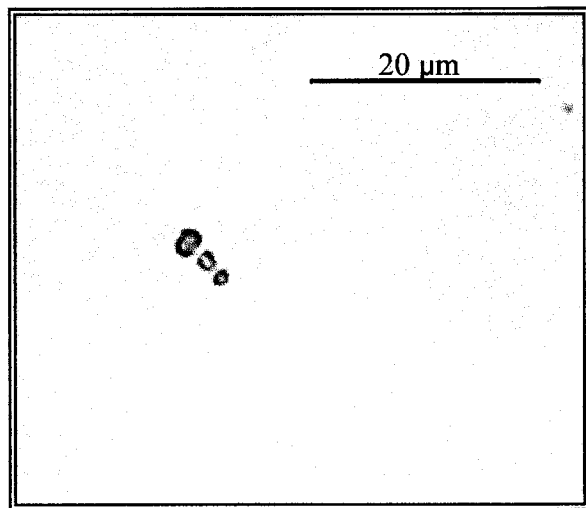


Figura 3.62 – Cianobactéria possivelmente do género *Chlorogloeopsis* sp. encontrada na amostra SP-3.

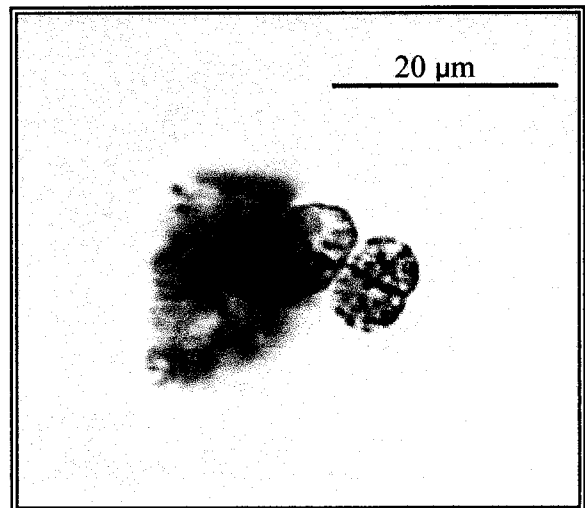


Figura 3.63 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra SP-3.

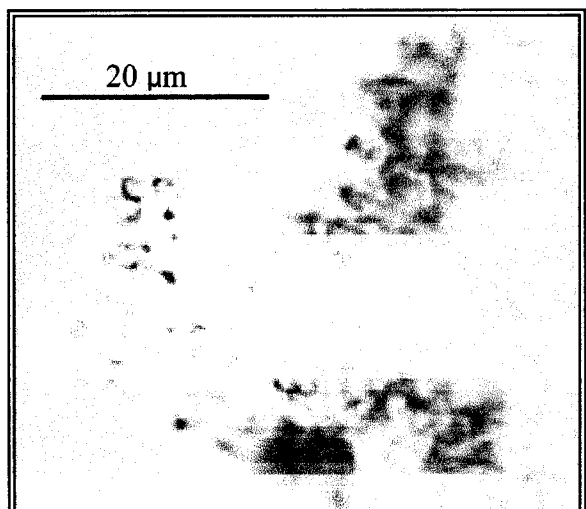


Figura 3.64 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra SP-3.

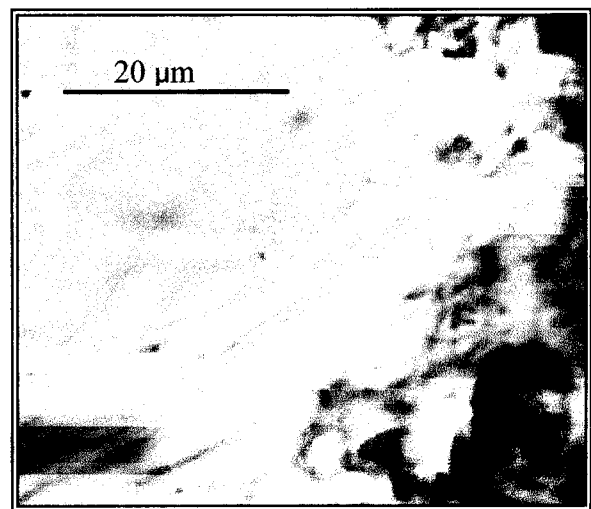


Figura 3.65 – Cianobactérias das ordens Oscillatoriales na amostra SP-4.

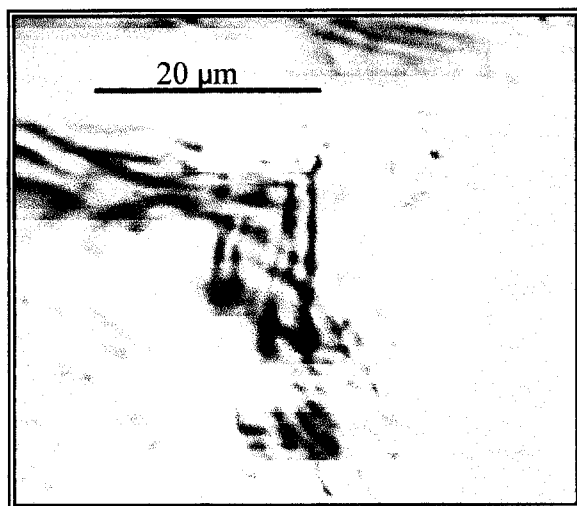


Figura 3.66 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-5.

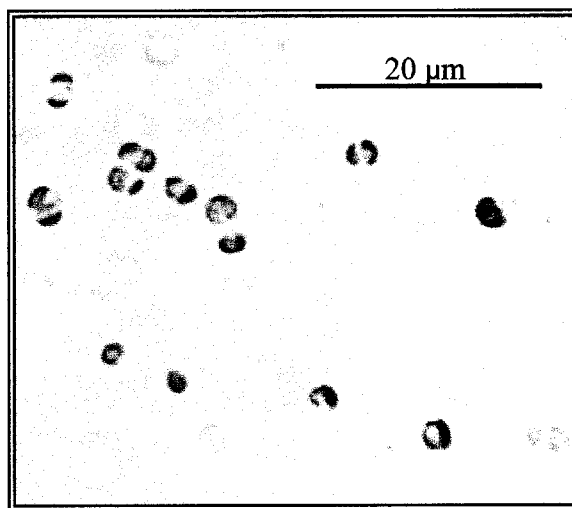


Figura 3.67 – Cianobactéria da ordem Chroococcales encontrada na amostra SP-7.

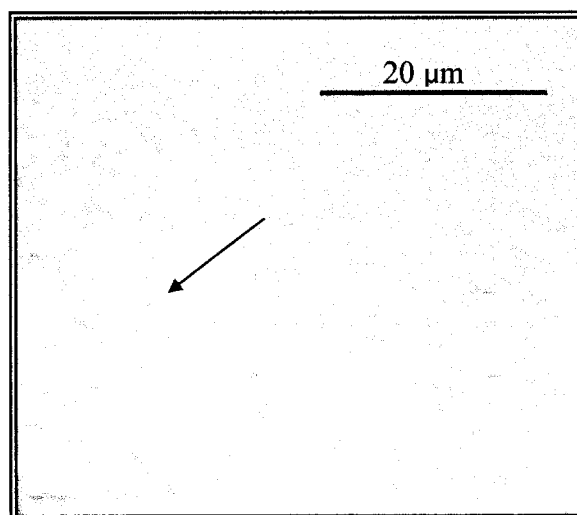


Figura 3.68 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra SP-7.

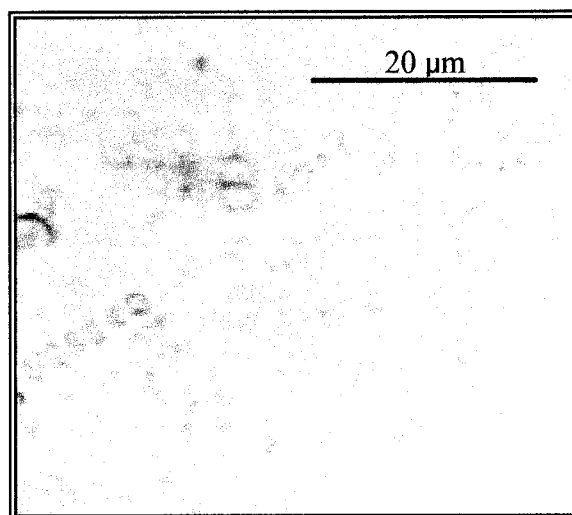


Figura 3.69 – Cianobactéria possivelmente do gênero *Chlorogloeopsis* sp. encontrada na amostra SP-8.

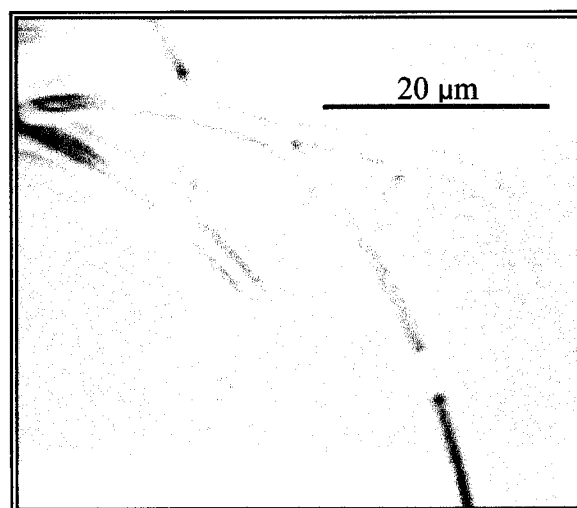


Figura 3.70 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-13.

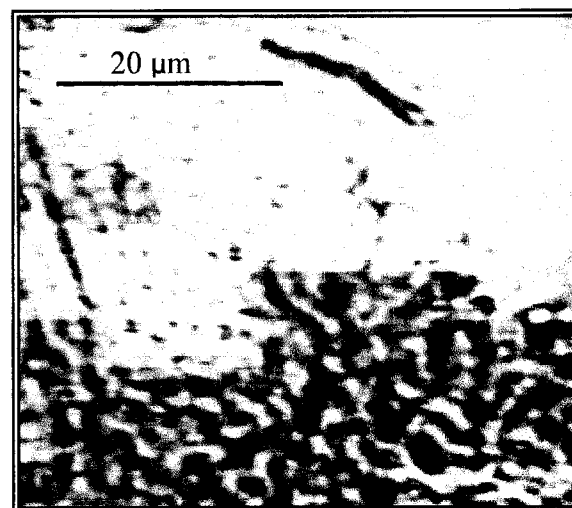


Figura 3.71 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-13.

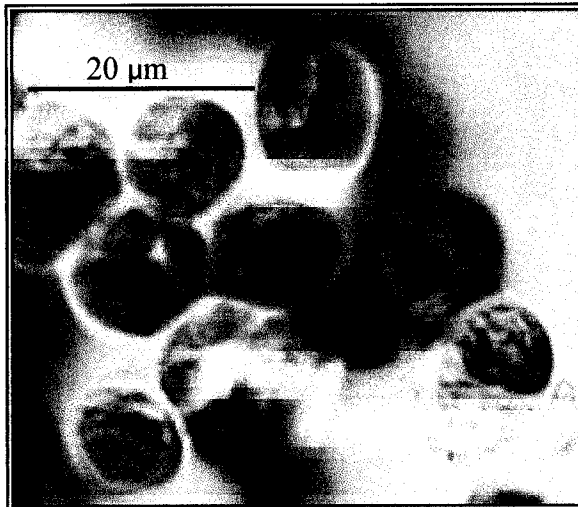


Figura 3.72 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra SP-14.

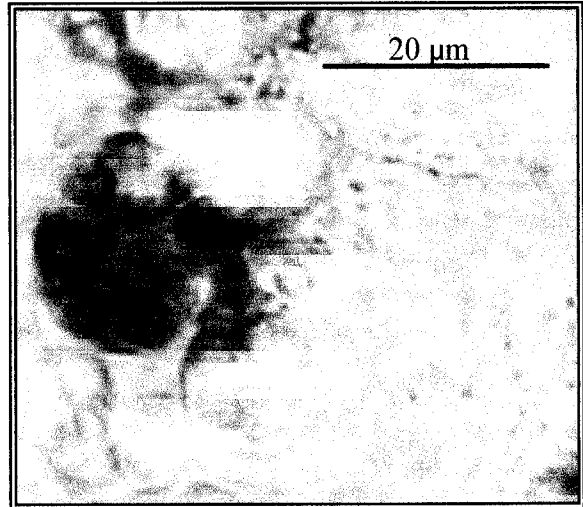


Figura 3.73 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra SP-17.

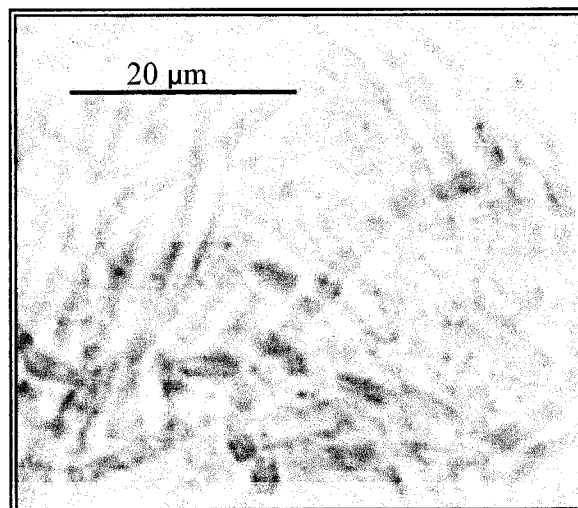


Figura 3.74 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-17.

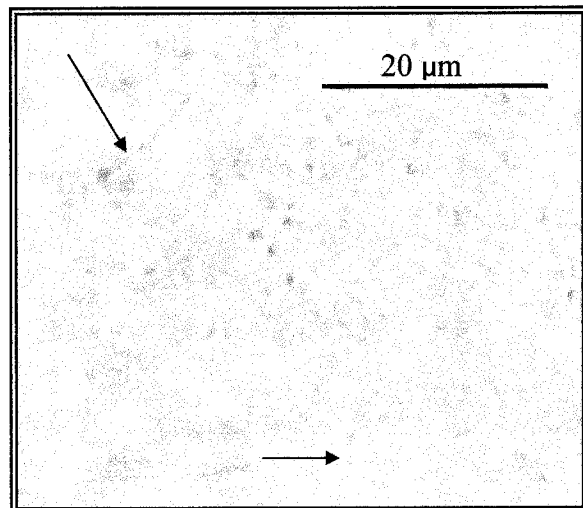


Figura 3.75 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (setas) encontrada na amostra SP-20.

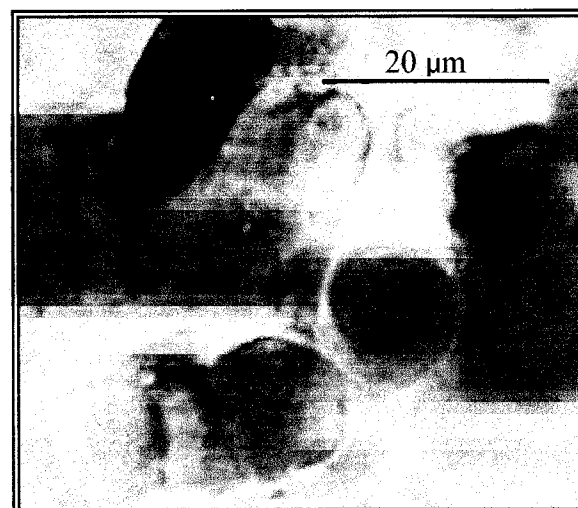


Figura 3.76 – Cianobactéria do género *Chroococcus* sp. encontrada na amostra SP-21.

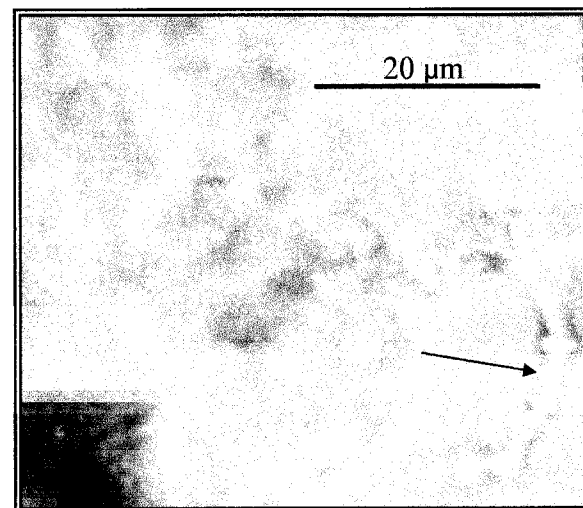


Figura 3.77 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra SP-21.

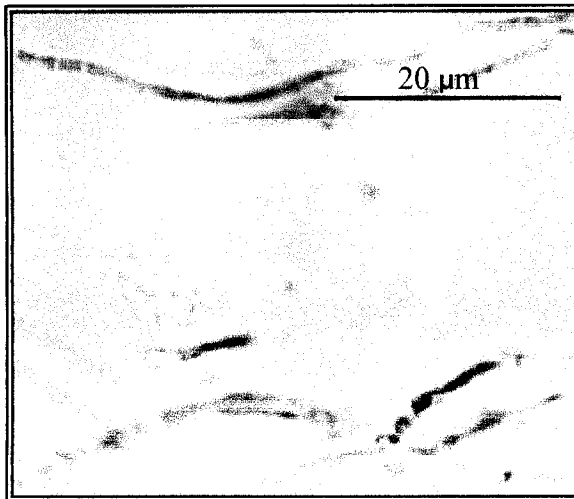


Figura 3.78 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales (seta) encontrada na amostra SP-22.

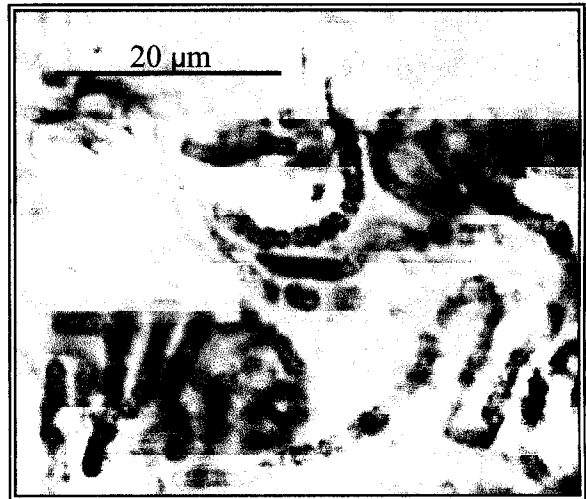


Figura 3.79 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-25.

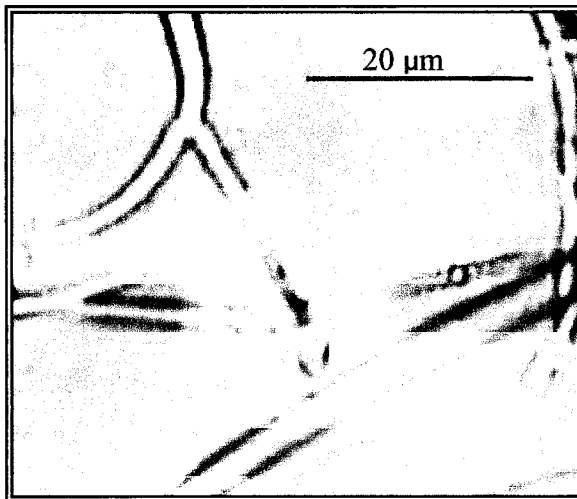


Figura 3.80 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-27.

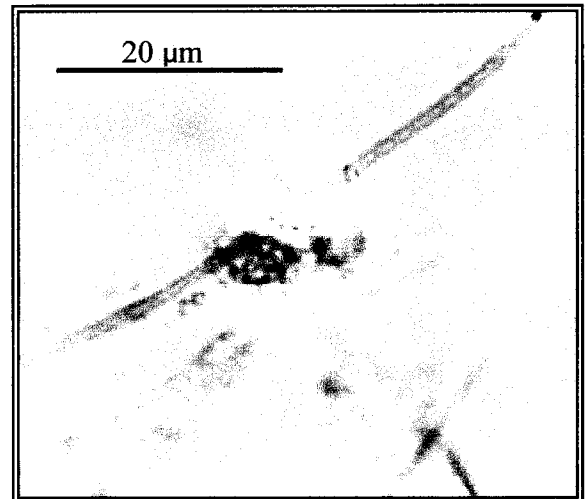


Figura 3.81 – Cianobactéria da ordem Oscillatoriales encontrada na amostra SP-29.

Da análise conjunta destas quatro tabelas ressalta o facto, tal como seria de esperar, tendo em conta as características destes organismos (previamente abordadas no capítulo I, pág. 4 e 5), que lhes permitem colonizar os locais mais inóspitos deste planeta, de terem sido observadas cianobactérias em todas as praias.

Para evitar erros, procedeu-se à identificação destes microorganismos até à ordem. Este procedimento teve em conta os recursos existentes para este tipo de investigação nos laboratórios utilizados e, o facto de, para a maioria das estirpes, se ter feito a identificação a partir de culturas, o que segundo RIPPKA *et al.*, (1979), pode levar a muitas ambiguidades e dificuldades. Por isso, essas identificações não são reconhecidas pelo Código de Nomenclatura Botânica. Um outro factor importante para

uma identificação rigorosa é a detecção do composto 2-O- α -D-glucopyranosylglycerol (glucosilglicerol), que é o principal composto osmorregulatório sintetizado e acumulado pelas cianobactérias marinhas (MACKAY *et al.*, 1983), detecção essa que não foi efectuada.

Assim, e de acordo com o atrás exposto, constata-se que todas as cianobactérias bentónicas detectadas pertencem às ordens Chroococcales e Oscillatoriales e Nostocales. No entanto, dentro das primeiras foi possível identificar os géneros, *Synechocistis*, e *Chroococcus*, da segunda conseguiu distinguir-se os géneros, *Phormidium*, e *Spirulina* e da terceira o género *Chlorogloeopsis*.

Tendo em conta as suas características, as amostras recolhidas podem ser agrupadas em três grupos distintos: material inorgânico (rochas), organismos vivos com concha, ou que constróem recifes para a sua protecção, fixos a um substrato (lapas, cracas, mexilhões, *Lepidopleurus asellus*, percebes, búzios, recife de *Sabellaria alveolata* e *Pomatoceros triqueter*) e organismos vivos moles sem concha (algas, anémonas e esponjas). Verifica-se que os materiais com maior percentagem de colonização são os pertencentes ao primeiro grupo (51,2 %), seguido dos pertencentes ao segundo (43,1 %) e por fim dos pertencentes ao terceiro (23,8 %).

Tal constatação, no caso do primeiro grupo, é corroborada por WHITTON e POTTS (1982). Segundo estes autores uma grande variedade de cianobactérias epilíticas e endolíticas são comuns em praias rochosas de todo o mundo, particularmente naquelas que apresentam substratos mole e porosos. É o caso das praias escolhidas para este estudo, como foi abordado no capítulo I, páginas 22 a 26 (excepção feita à praia de Espinho). Para além disso a maioria das rochas escolhidas estavam abrigadas da acção das ondas que parece ser outro factor importante para a fixação destes microorganismos.

Os componentes do segundo grupo revelam também alta taxa de colonização por estes microorganismos, porque as suas conchas ou os seus recifes possuem substâncias carbonatadas que são substratos de eleição para a fixação de cianobactérias endolíticas (*vide* capítulo I, pág. 12 a 14). Dentro deste grupo salienta-se o caso dos recifes de *Sabellaria alveolata* uma vez que, em todas as amostras deste tipo de substrato, foram detectadas cianobactérias. Esta constatação já era esperada porque estes recifes, constituídos por grãos de areia e por sedimento orgânicos, proporcionam um local

abrigado da ondulação, da dessecação e da luminosidade intensa, sendo por isso locais preferenciais para a fixação destes organismos.

O facto do terceiro grupo constituir um suporte pouco estável e como tal inadequado à fixação destes organismos, pode justificar a fraca colonização das cianobactérias nestes substratos. Neste tipo de substrato, detectaram-se cianobactérias apenas em algas verdes (E-10 e E-18), *Fucus vesiculosus* (FF-20) e em *Actinia equina* (SP-20). Estes casos, tal como foi referido no capítulo I, páginas 14 e 15, podem estar relacionados com associações simbióticas.

Nas amostras de água do mar foram detectadas as ordens Oscillatoriales e Chroococcales, que segundo FOGG (1982), são as mais representativas das cianobactérias marinhas.

3.2 – ESTIRPES DE CIANOBACTÉRIAS CULTIVADAS

Embora todas as cianobactérias detectadas tenham sido isoladas com o maior dos cuidados, apenas sete conseguiram desenvolver-se de forma satisfatória, ou seja, cresceram sem contaminação dando origem a uma massa algal que permitiu a realização de todos os testes toxicológicos previamente idealizados. Na tabela 3.6, apresentam-se as estirpes cultivadas tendo em conta a praia e a amostra de onde foi recolhida, a sua identificação e a designação atribuída.

Tabela 3.6 – Estirpes de cianobactérias cultivadas.

Praia	Amostra	Estirpe	Foto	Designação
Mira	M-27	Oscillatoriales	Figura 3.38	B1
Figueira da Foz	FF-15	Chroococcales	Figura 3.49	B2
Espinho	E-36	Chroococcales	Figura 3.20	B5
Espinho	E-8	Chroococcales	Figura 3.4	B8
Mira	M-20	Chroococcales	Figura 3.37	B9
Figueira da Foz	FF-36	Oscillatoriales	Figura 3.57	B10
Figueira da Foz	FF-9	Chroococcales	Figura 3.48	B11

Constata-se que apenas uma das estirpes é planctónica (FF-36), sendo todas as outras bentónicas. Torna-se ainda evidente, da análise da tabela, que a percentagem de estirpes pertencentes à ordem Chroococcales é bastante superior (71,5 %) à das

pertencentes à Oscillarioriales (28,5 %). É curioso que cinco destas estirpes (71, 4 %) são provenientes de recifes de *Sabellaria alveolata*, sendo as outras duas provenientes da raspagem de *Mytilus* sp.(14, 3 %) e de água do mar (14,3 %).

Também se constata que a maioria das amostras provieram da praia da Figueira da Foz (42,8 %), sendo as outras provenientes da praia de Mira (28,6 %) e da praia de Espinho (28,6 %). Salienta-se que nenhuma das estirpes são oriundas da praia de São Pedro de Moel que, no entanto, apresenta percentagens de colonização superiores às das outras praias.

Noutra vertente as estirpes B2 e B11 foram classificadas como pertencentes ao género *Synechocystis*, em virtude de apresentarem células esféricas de pequenas dimensões, solitárias, sem mucilagem ou invólucro envelope mucilaginoso muito fino (KOMAREK e ANAGNOSTIDIS, 1999). A estirpe B10 pertence ao género *Phormidium*, que é caracterizada por apresentar tricomas delgados direitos ou encurvados, envolvidos por uma bainha transparente que apenas se torna visível quando vazia, não apresentando ramificações. O hormogónio é libertado sem formação de necrídios e com movimentação lenta (WILMOTTE, 1991).

Na tabela 3.7 encontram-se registados o aspecto de cada estirpe em cultura, os tempos de isolamento (desde o início do isolamento até à obtenção da biomassa), bem como os dias em que se mantiveram em 500 ml e 4000 ml de meio, a biomassa obtida e para o caso das cianobactérias da ordem Chroococcales, o diâmetro médio das células, que poderia ser importante para a identificação destes organismos.

Tabela 3.7 – Tempo médio e tipo de crescimento da cultura, biomassa obtida e diâmetros médio das células pertencentes à ordem Chroococcales.

Estirpe	Cultura Em 500 ml (dias)	Cultura Em 4000 ml (dias)	Tempo Total de Isolamento (dias)	Tipo De Crescimento Em Cultura	Biomassa Obtida (mg)	Diâmetro Das Células (µm)		
						M	D.P.	E.P.
B1	39	30	285	Cor verde azulada clara. Crescem fixas às paredes do recipiente formando pequenos aglomerados que se tornam mais compactos quando raspados.	796			
B2	43	36	197	Cor verde azulada claro. Apresenta um aspecto homogêneo, sem qualquer aglutinação.	494	1,10	0,17	0,05
B5	30	36	190	Cor verde azulada escura. Apresentam um aspecto homogêneo, verificando-se aglomerações que se acumulam principalmente na base do recipiente.	353	2,35	0,19	0,06
B8	35	30	217	Cor verde azulada escura. Apresentam um aspecto homogêneo, verificando-se aglomerações que se acumulam principalmente na base do recipiente.	866	1,34	0,17	0,05
B9	24	40	120	Cor verde azulada clara. Apresenta um aspecto homogêneo. Crescem fixas às paredes do recipiente	627	2,36	0,31	0,10
B10	24	30	93	Cor verde azulada clara. Crescem formando uma massa homogênea que se acumula no fundo do recipiente	456			
B11	20	38	98	Cor verde azulada claro. Apresentam um aspecto homogêneo, sem qualquer aglutinação.	532	1,12	0,17	0,06

Legenda – M – média; D.P. – desvio padrão; E.P. – erro padrão.

Da análise da tabela 3.7, constata-se que o diâmetro das células da estirpe B2 (1,10 µm), B8 (1,34 µm) e B-11 (1,12 µm), são muito semelhantes, o mesmo se verificando para as estirpes B5 (2,35 µm) e B9 (2,36 µm).

No que respeita ao aspecto macroscópico da cultura verificou-se que tanto a estirpe B2 como a B9 e a B11 apresentaram uma cor verde azulada clara com um aspecto homogéneo, não se denotando qualquer aglutinação, apresentando, no entanto, a B9 a particularidade de as células crescerem fixas à parede do recipiente. Já as estirpes B5 e B8 apresentam uma cor verde azulada mais clara e um aspecto homogéneo, destacando-se aglomerações no fundo do recipiente.

No caso das estirpes pertencentes à ordem Oscillatoriales, B1 e B10, ambas apresentam uma cor verde azulada clara. No entanto a B1 forma pequenos aglomerados fixos à parede que se tornam mais compactos, e por conseguinte mais escuros quando raspados, enquanto a B10 forma uma massa homogénea que se acumula no fundo do recipiente.

Ressalta ainda que o desenvolvimento destes organismos marinhos em laboratório, desde a sua detecção até à obtenção massa algal para os ensaios, foi extremamente moroso, variando entre 93 dias (B10) e 285 dias (B1), e que a biomassa obtida foi baixa quando comparada com as obtidas para cianobactérias de água doce. Este facto pode ser explicado por não terem sido criadas condições laboratoriais ideais para o desenvolvimento correcto de cada estirpe. No caso da biomassa essa discrepância pode resultar ainda, para o caso das Chroococcales, do método de concentração utilizado não ter sido o mais eficiente, e para o caso das Oscillatoriales pelo facto, como foi referido na tabela 3.7, destes organismos formarem pequenos aglomerados o que dificulta o crescimento, pois as células que ficam no meio dos aglomerados têm dificuldade em desenvolver-se (MARTINS, 1999).

3.3 – TOXICIDADE DAS ESTIRPES CULTIVADAS

3.3.1 – Ensaios de toxicidade com murganhos

Para servir de controlo a estes ensaios foram utilizados apenas dois murganhos, evitando-se desta forma, o sacrificio de animais bem como gastos desnecessários. Na tabela 3.8 estão registados os pesos dos animais, a percentagem do peso do fígado, o tempo de sobrevivência e observações feitas após a injeccção.

Tabela 3.8 – Peso do murganho, percentagem do peso do fígado e tempo de sobrevivência dos murganhos utilizados como controlo.

Murganho	Peso do murganho (g)	Percentagem do peso do fígado (%)	Tempo De sobrevivência (h)	Observações
Controlo				
A	24	7,8	Sacrificado após 48	Após a ingestão apresentaram uma certa letargia, retomando a actividade normal ao fim de poucos minutos
B	23,4	7,6	Sacrificado após 48	Após a ingestão apresentaram uma certa letargia, retomando a actividade normal ao fim de poucos minutos

Analizando a tabela 3.8 verifica-se, tal como era esperado, que nenhum dos murganhos controlo morreu, no período de 48 horas que durou a experiência. Assim, após esse período procedeu-se ao sacrificio dos animais por asfixia pelo éter. Nos primeiros minutos que se seguiram à injeccção os dois murganhos revelaram uma certa apatia, tendo no entanto recuperado rapidamente ao fim de poucos minutos. No decorrer da autópsia todos os órgãos revelaram um aspecto macroscópico perfeitamente normal.

Constata-se ainda que percentagem do peso do fígado relativamente ao peso total do animal foi muito semelhante nos dois casos, 7,8 % no murganho-A e 7,6 % no murganho-B, valores esses normais para este tipo de animal, como se pode comprovar através de trabalhos onde foi utilizada esta técnica.

A análise histológica do fígado controlo vem comprovar a observação macroscópica feita durante a autópsia. O fígado apresenta uma estrutura normal, sem alteração dos hepatócitos (ou dos seus núcleos), nem vestígios de hemorragias (Figuras 3.82 e 3.83).

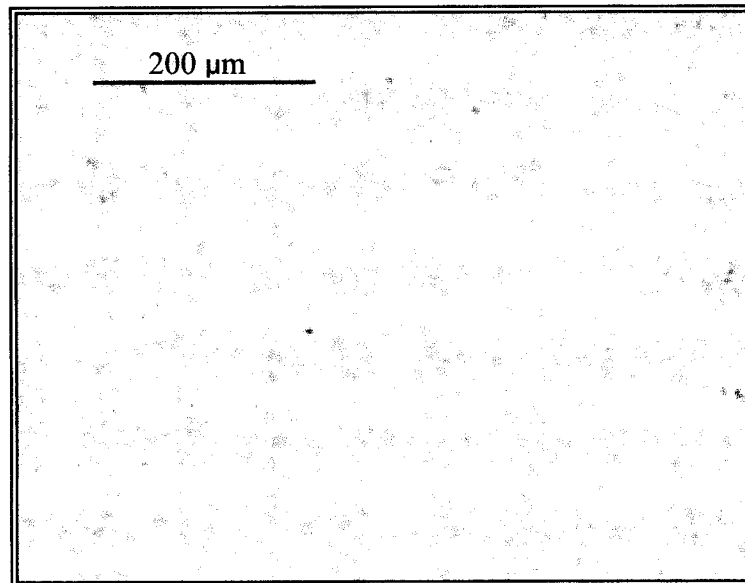


Figura 3.82 – Corte histológico de fígado de murganho utilizado como controlo.

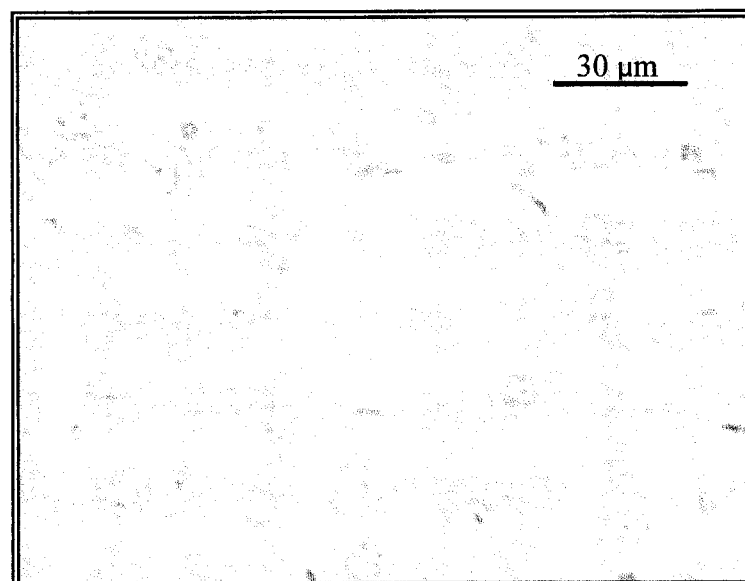


Figura 3.83 – Corte histológico de fígado de murganho utilizado como controlo.

A análise das figuras 3.84 e 3.85 comprova o estado normal do intestino anterior deste murganho. Observam-se as células epiteliais das vilosidades intestinais perfeitamente definidas sem núcleos picnóticos. Não se denota qualquer vestígio de hemorragia nem infecção.

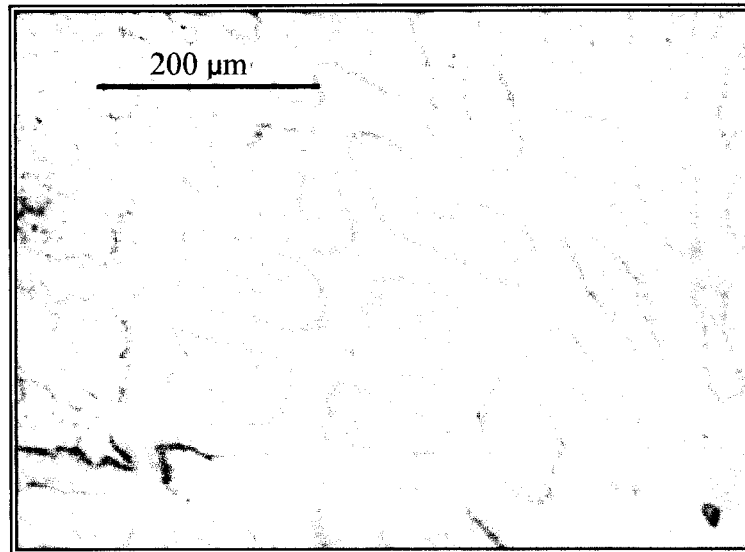


Figura 3.84 – Corte histológico de intestino anterior de murganho utilizado como controlo.

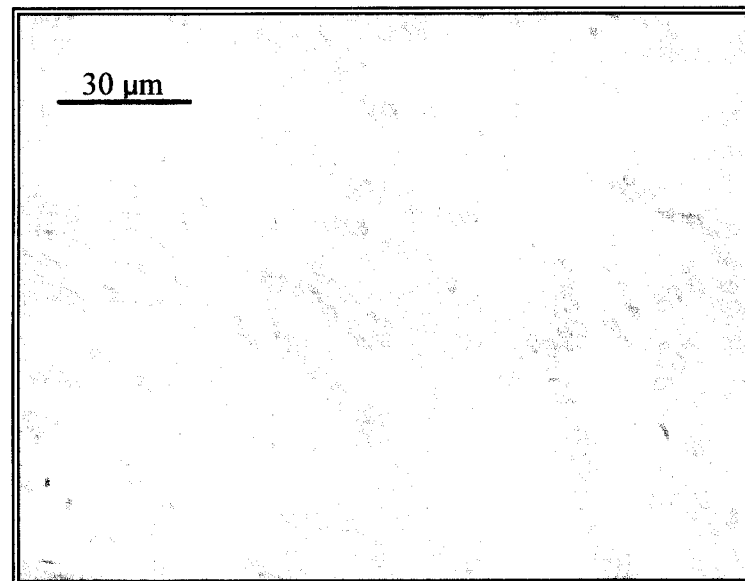


Figura 3.85 – Corte histológico de intestino anterior de murganho utilizado como controlo.

As figuras 3.86 e 3.87 permitem visualizar um corte do intestino posterior (Figura 3.86) e um corte do pulmão (Figura 3.87) com a sua estrutura inalterada e sem hemorragias.

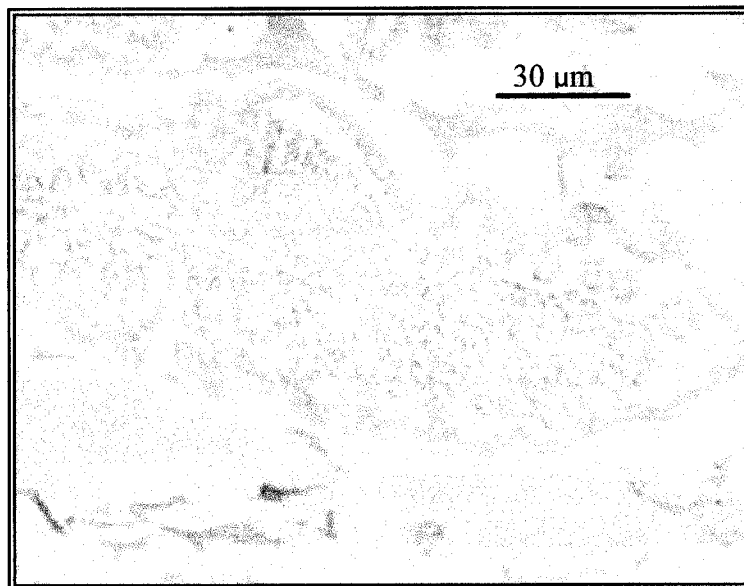


Figura 3.86 – Corte histológico de intestino posterior de murganho utilizado como controle.

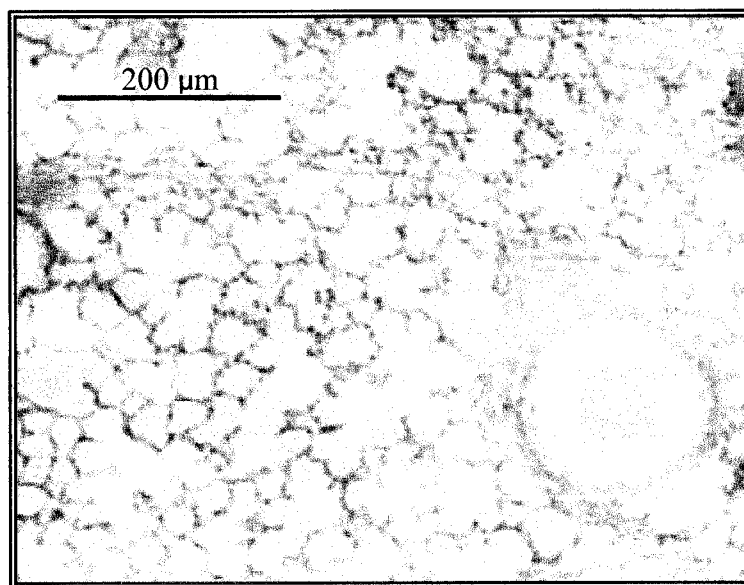


Figura 3.87 – Corte histológico de pulmão de murganho utilizado como controle.

As figuras 3.88 e 3.89 revelam um rim saudável não se detectando hemorragias, e observando-se os túbulos e os glomérulos sem qualquer retracção (Figuras 3.88 e 3.89).

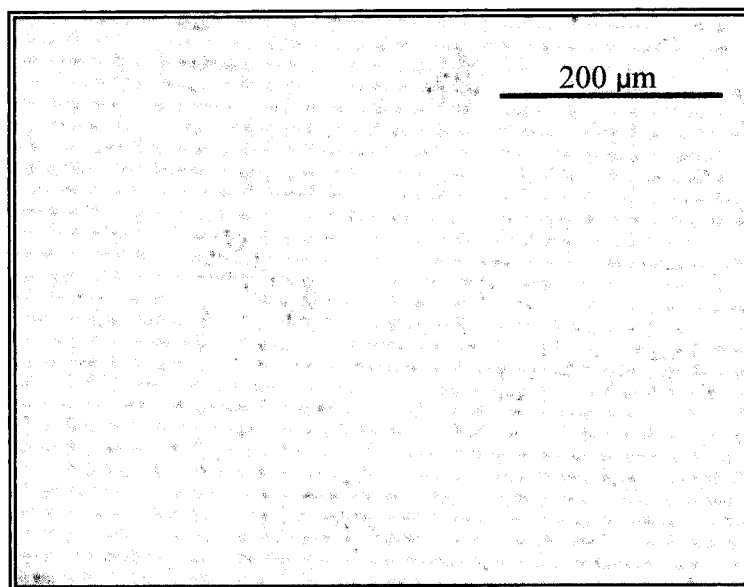


Figura 3.88 – Corte histológico de rim de murganho utilizado como controlo.

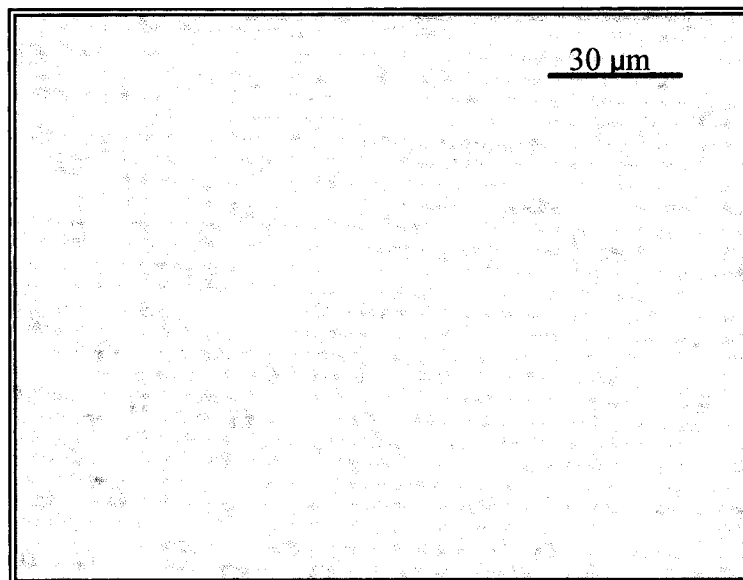


Figura 3.89 – Corte histológico de rim de murganho utilizado como controlo.

Nas tabela 3.9 a 3.11 são apresentados os resultados do ensaio de toxicidade com murganhos com as diferentes estirpes cultivadas. Após cada tabela descreve-se o aspecto macroscópico dos vários órgãos observados após a autópsia, e procede-se à análise histológica dos que apresentaram histopatologia.

Tabela 3.9 – Peso do murganho, volume injectado, concentração da solução injectada, percentagem do peso do fígado, tempo de sobrevivência dos murganhos e observações feitas após a injeccção com as estirpes recolhidas na praia de Espinho.

estirpe inject.	murg.	Vol. Inj. (ml)	Concent. (mg/Kg)	Peso Do Murg. (g)	% do peso do Fígado	Tempo De Sobrev.	Observações
B-5	A	1	1500	38,20	5,0	26:10 h	Após a injeccção revelou uma respi- ração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia e olhos semicerrados durante a experiência.
B-5	B	1	1500	37,10	4,6	Entre 26:10 e 26:40 h	Após a injeccção revelou uma respi- ração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia e olhos semicer- rados no decorrer da experiência.
B-8	A	1	1500	26	7,4	Sacrifi- cado após 48h	Apresentou poucas dificuldades embora o abdómen se revelasse um pouco inchado. Olhos semicerrados.
B-8	B	1	1500	26,8	7,2	30:50 e 32 h	Apresentou uma certa letargia e olhos semicerrados durante a experiência.

Os dois murganhos injectados com a estirpe B-5, morreram aproximadamente 26 horas após a injeccção. Macroscopicamente, o intestino anterior revelou um certo congestionamento e todos os outros órgãos apresentaram um aspecto normal. Após a pesagem dos fígados constatou-se que a percentagem destes órgãos em relação ao peso corporal, apesar de apresentar um valor dentro dos parâmetros normais, era em média, menor 2% do que o dos os murganhos controlo.

Histologicamente, todos os órgãos foram afectados. A nível do intestino anterior verificou-se nos dois murganhos um aumento do volume de gânglios ou placas de Meyer que pode resultar de uma possível infecção a nível deste órgão (Figura 3.90). Verificou-se também a presença de núcleos picnóticos nas células epiteliais das vilosidades (Figura 3.91).

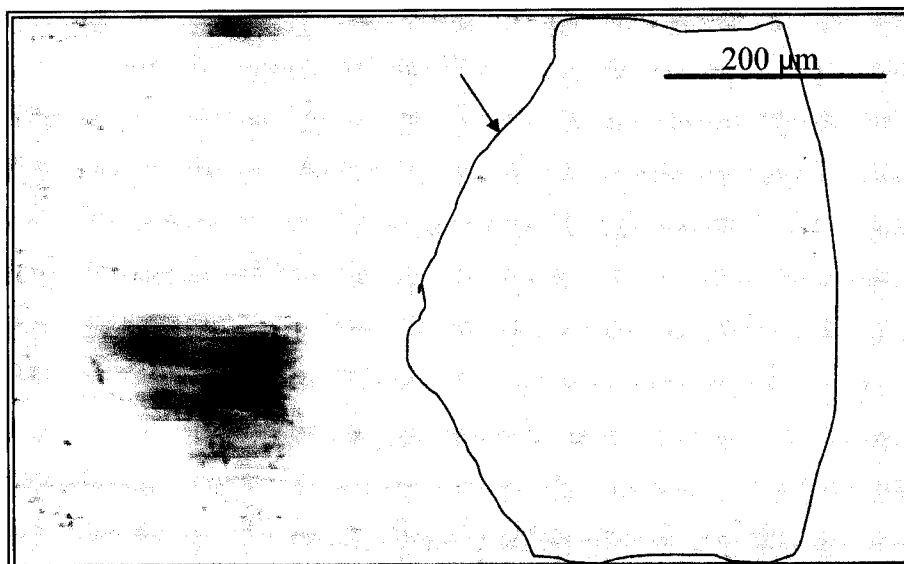


Figura 3.90 – Corte histológico do intestino anterior do murgancho-B injectado com a estirpe B-5. Destaca-se o desenvolvimento anormal das placas de Peyer (área apontada pela seta).

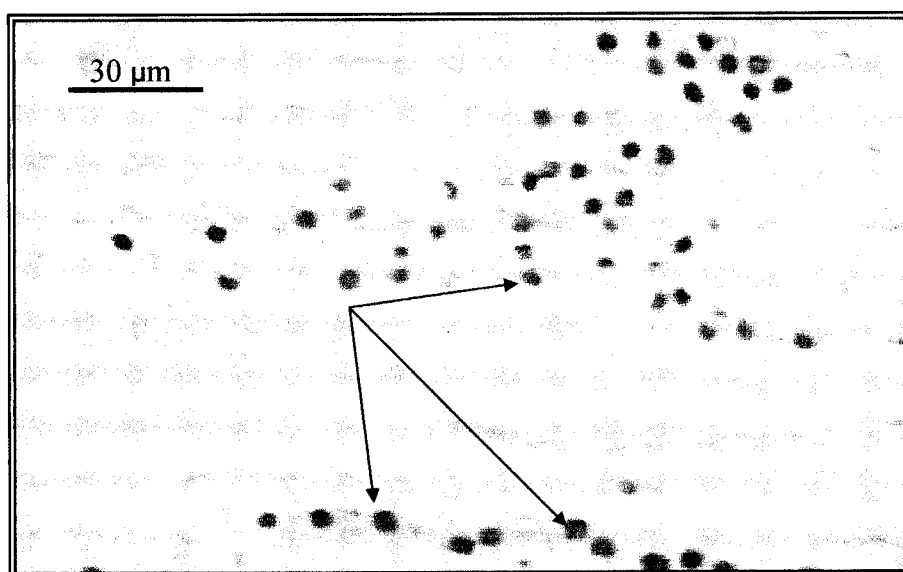


Figura 3.91 – Corte histológico de intestino anterior do murgancho-A injectado com a estirpe B-5, onde se denotam os núcleos picnóticos (setas).

Na análise histológica dos pulmões dos dois murganchos observou-se a perda da organização tecidular na periferia do órgão e algumas hemorragias (Figura 3.92).

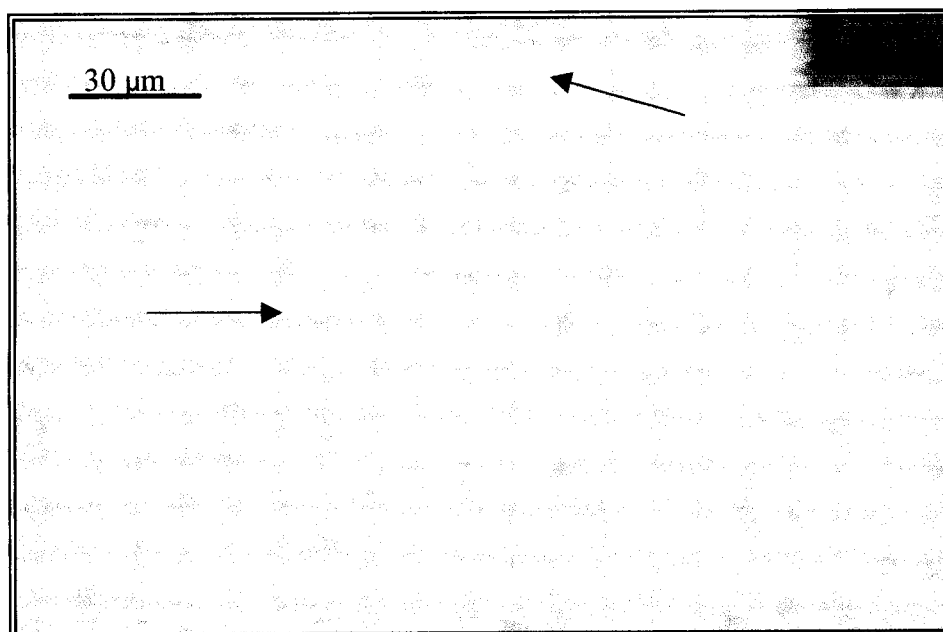


Figura 3.92 – Corte histológico de pulmão do murganho-B injectado com a estirpe B-5, onde se notam várias hemorragias (setas).

A análise histológica do fígado dos dois murganhos, revelou hemorragias, retracção de alguns hepatócitos bem como um desenvolvimento anormal de alguns dos seus núcleos (Figura 3.93).

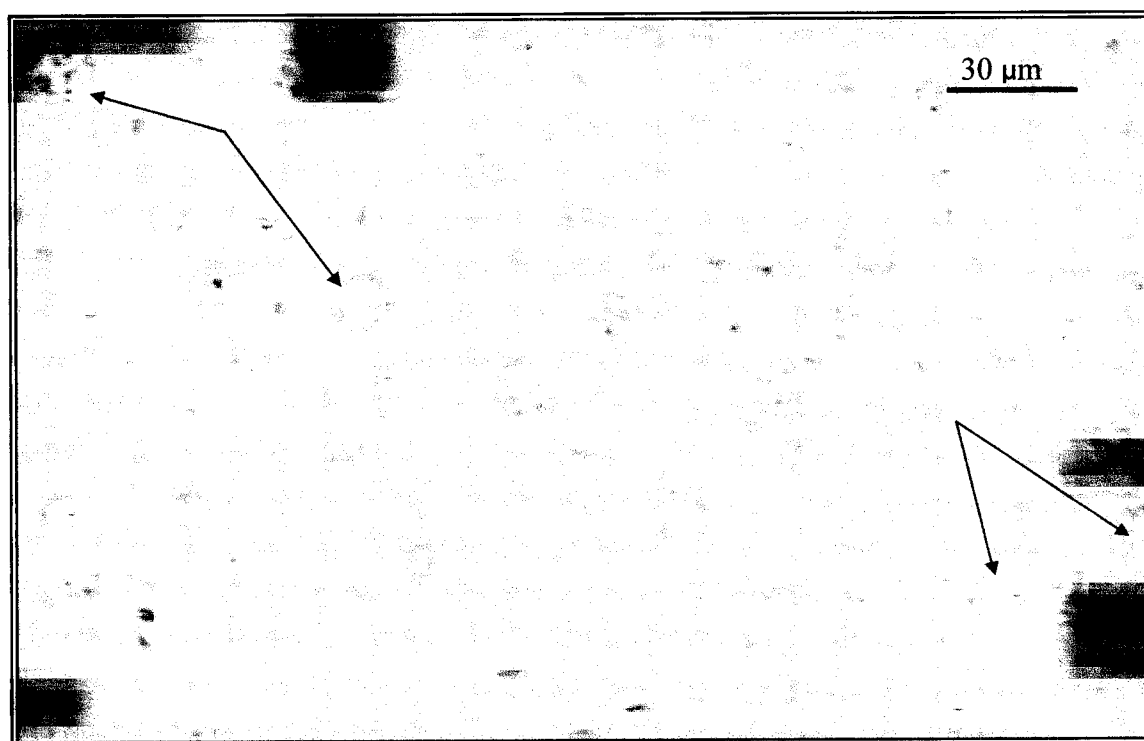


Figura 3.93 – Corte histológico do fígado de murganho-A injectado com a estirpe B-5, onde se notam várias hemorragias (setas azuis), e o desenvolvimento anormal do núcleo dos hepatócitos (setas pretas).

No caso do rim, a histologia revela hemorragias no lúmen dos túbulos e nos glomérulos (Figura 3.94), retracção (Figura 3.96) e picnose nas células dos glomérulos e uma vacuolização das células da periferia. (Figura 3.95).

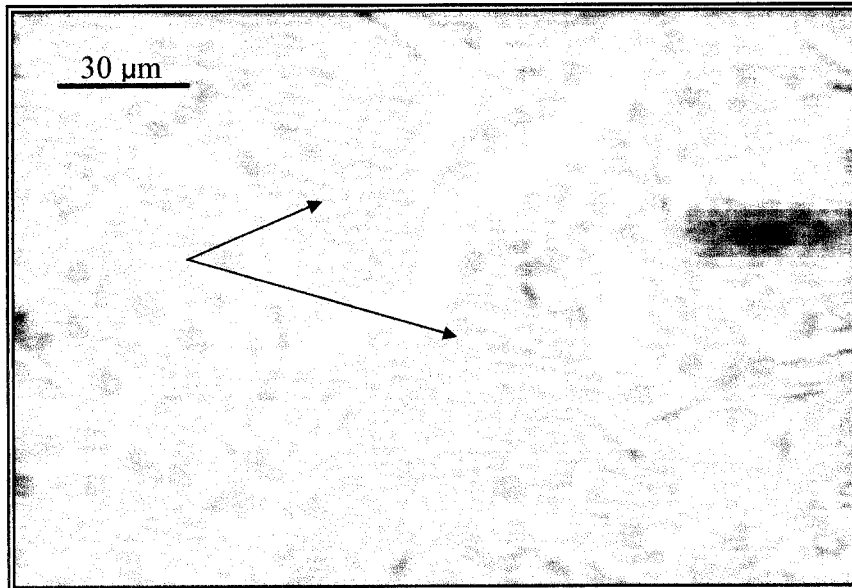


Figura 3.94 – Corte histológico do rim de murganho-B injectado com a estirpe B-5, onde se denotam várias hemorragias (setas pretas).

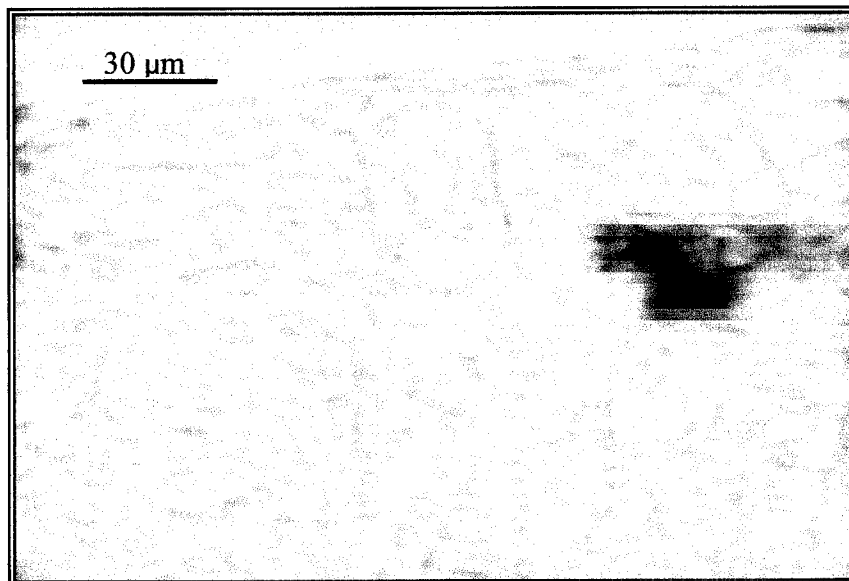


Figura 3.95 – Corte histológico do rim de murganho-B injectado com a estirpe B-5 destacando-se a vacuolização das células da periferia.

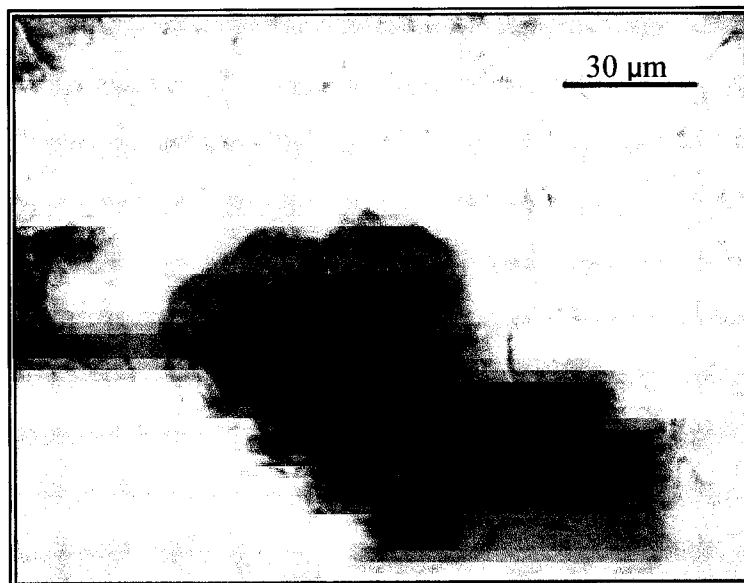


Figura 3.96 – Corte histológico de rim do murgancho-A injectado com a estirpe B-5, onde se salienta a retracção do glomérulo.

No caso dos murganhos injectados com a estirpe B-8, constata-se que um dos murganhos não morreu durante o período da experiência, e o outro morreu aproximadamente 30 horas depois da injeção. A autópsia realizada revelou os intestinos ligeiramente edemaciados, e no caso do murgancho-B foi observado um coágulo no exterior do fígado e hemorragias ligeiras ao longo do abdómen. Todos os outros órgãos alvo deste estudo, apresentaram um aspecto aparentemente saudável.

Constatou-se, após a pesagem do fígado, que a percentagem deste órgão em relação ao peso corporal era muito semelhante aos valores obtidos para os murganhos controlo.

A nível histológico, constatou-se que a estrutura dos pulmões não tinha sido afectada. Nos intestinos notavam-se algumas hemorragias no interior do lúmen das vilosidades (Figura 3.97) e alguns sinais de picnose dos núcleos das células epiteliais dessas estruturas. Verificou-se também um desenvolvimento anormal das placas de Peyer que, como já foi referido anteriormente, pode ser resultado de uma possível infecção (Figura 3.98).

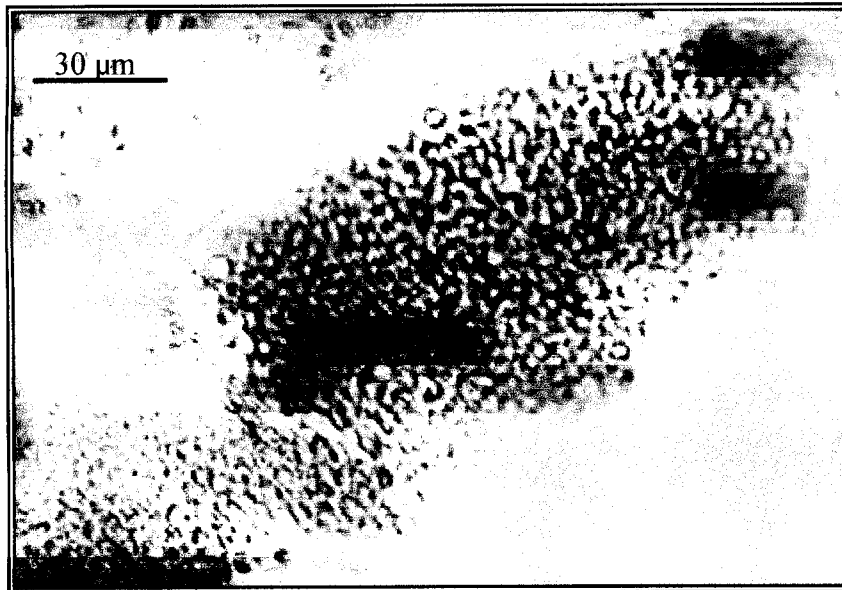


Figura 3.97 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-A injectado com a estirpe B-8, onde se pode observar uma hemorragia no lúmen de uma vilosidade.

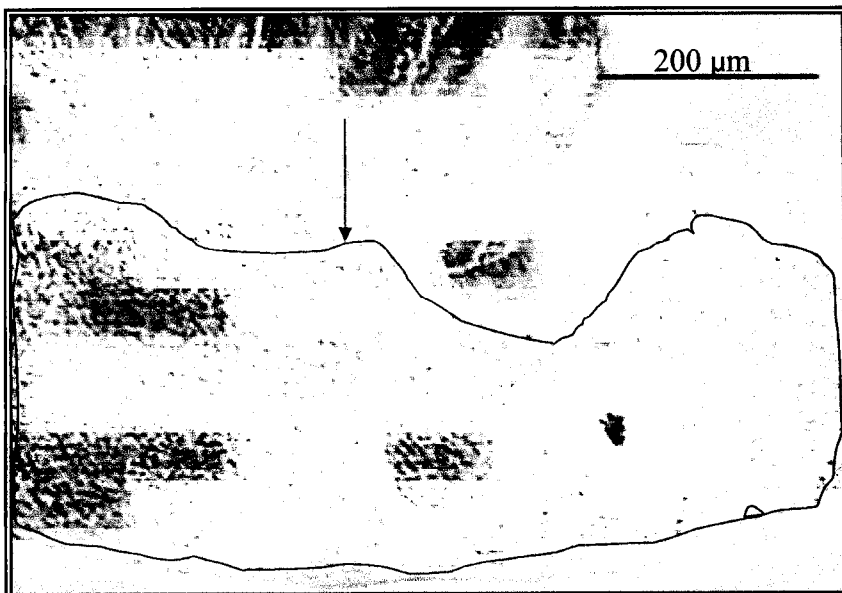


Figura 3.98 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-B injectado com a estirpe B-8, onde se destaca o desenvolvimento anormal das placas de Peyer (área apontada pela seta).

No que diz respeito ao fígado, foram detectadas algumas hemorragias (Figuras 3.99 e 3.100) e um alargamento dos canais sinusoidais (Figura 3.100). Verifica-se ainda a degenerescência dos hepatócitos e um desenvolvimento anormal dos núcleos de algumas destas células.

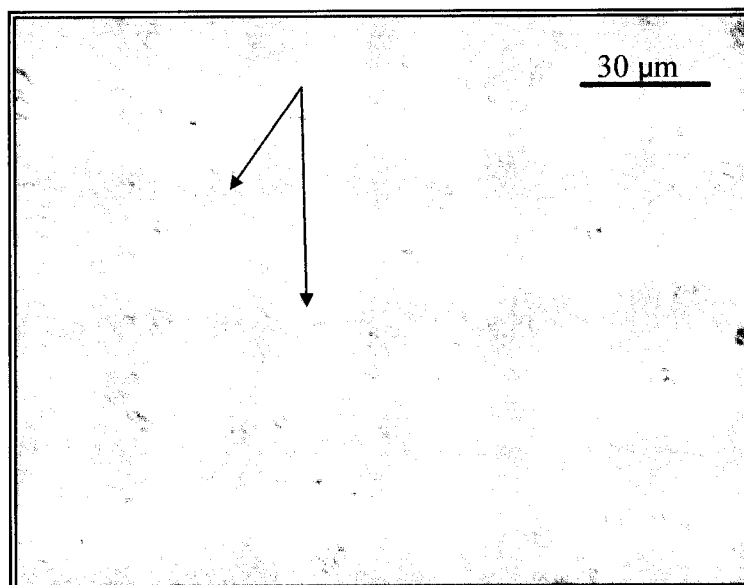


Figura 3.99 – Corte histológico do fígado de murganho-B injectado pela estirpe B-8, observando-se hemorragias (setas).

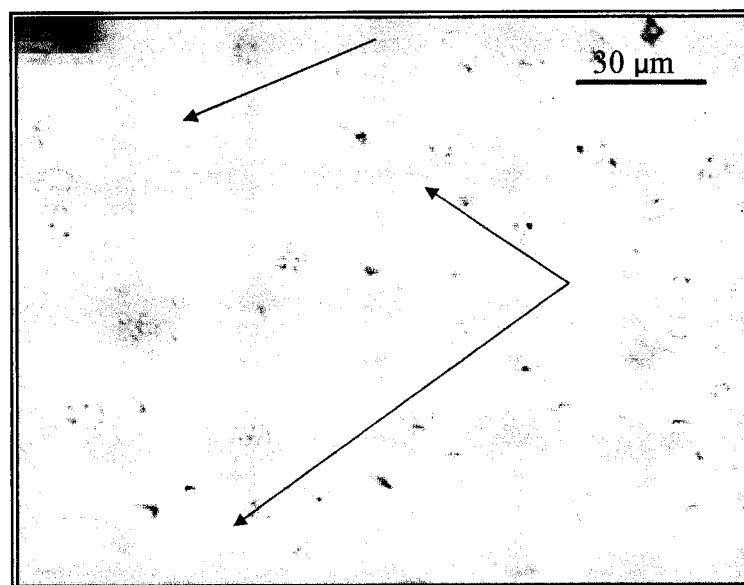


Figura 3.100 – Corte histológico do fígado de murganho-B injectado pela estirpe B-8, revelando a retracção dos hepatócitos (setas azuis) e hemorragias (setas pretas).

A análise histológica do rim revelou uma degenerescência das células dos túbulos situados nas zonas periféricas, próximo da cápsula (Figura 3.101) e algumas hemorragias.



Figura 3.101 – Corte histológico do rim de murgancho-B injectado com a estirpe B-8, salientando-se a degenerescência das células dos túbulos da periferia.

Tabela 3.10 – Peso do murgancho, volume injectado, concentração da solução injectada, percentagem do peso do fígado, tempo de sobrevivência dos murganchos e observações feitas após a injeção com as estirpes recolhidas na praia de Mira.

Estirpe inject.	murg.	Vol. Inj. (ml)	Concent. (mg/Kg)	Peso Do Murg. (g)	% do peso do Fígado	Tempo De Sobrev.	Observações
B-1	A	1	1500	23,7	8,05	Sacrificado após 48h	Apresentou uma certa letargia e olhos semicerrados. Sem vestígios de diarreia.
B-1	B	1	1500	26,5	6,26	Sacrificado após 48h	Apresentou uma certa letargia e olhos semicerrados. Sem vestígios de diarreia.
B-9	A	1	1500	25,7	5,3	34 e 34:30 h	Revelou uma certa apatia (prostração) e respiração ofegante. Intestino anterior e estômago dilatados.
B-9	B	1	1500	28	6,21	45 e 45:30 h	Revelou uma certa apatia (prostrado) e respiração ofegante. Intestino anterior e estômago dilatados.

Para o caso dos murganchos injectados com a estirpe B-1, verifica-se que nenhum morreu no decorrer do ensaio, razão porque foram sacrificados 48 h após a injeção. Macroscopicamente todos os órgãos se apresentaram aparentemente normais. Após a pesagem do fígado constatou-se que a percentagem deste órgão em relação ao peso corporal, no caso do murgancho-A era ligeiramente superior aos dos animais controlo, enquanto que do murgancho-B, apresentava um valor ligeiramente menor. No entanto, são valores que se encontram dentro dos parâmetros normais.

Histologicamente, não se verificaram quaisquer alterações a nível dos intestinos e dos pulmões. Nos rins apenas se observaram alguns sinais de hemorragia (Figura 3.102).

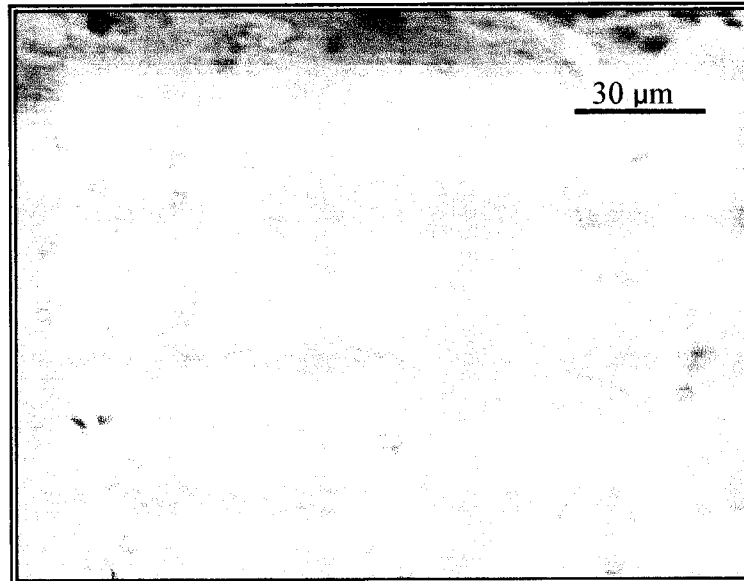


Figura 3.102 – Corte histológico do rim de murganho-A injectado pela estirpe B-1, revelando hemorragias.

A nível do fígado verificou-se a presença de canais sinusóideis dilatados e a destruição de alguns hepatócitos (Figura 3.103).

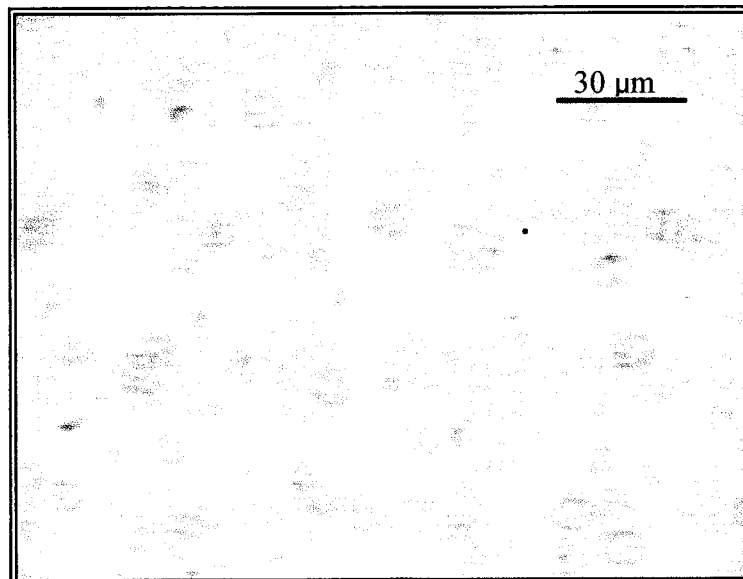


Figura 3.103 – Corte histológico do fígado de murganho-B injectado pela estirpe B-1, onde se notam os canais sinusóideis dilatados.

Nos animais injectados com a estirpe B-9, verifica-se que o murganho-A, resistiu mais tempo (cerca de 34 h após a injeccção) do que o B (cerca 45 h após a injeccção). Macroscopicamente todos os órgãos estavam aparentemente normais, à excepção dos intestinos, que se apresentavam bastante dilatados em ambos os murganhos. Em relação ao peso do fígado, a percentagem deste órgão em relação ao peso corporal foi, no caso do murganho-A cerca de 2% inferior às dos valores obtidos para os murganhos controlo, enquanto que o do murganho-B, apresentou um valor cerca de 1% inferior, não deixando de ser valores dentro dos parâmetros normais.

Histologicamente, não se verificaram quaisquer alterações a nível dos pulmões e dos intestinos. No fígado apenas se observam que alguns vasos sanguíneos congestionados. A nível dos rins detectam-se vacuolizações e degenerescências das células dos túbulos nas zonas periféricas (Figura 3.104).

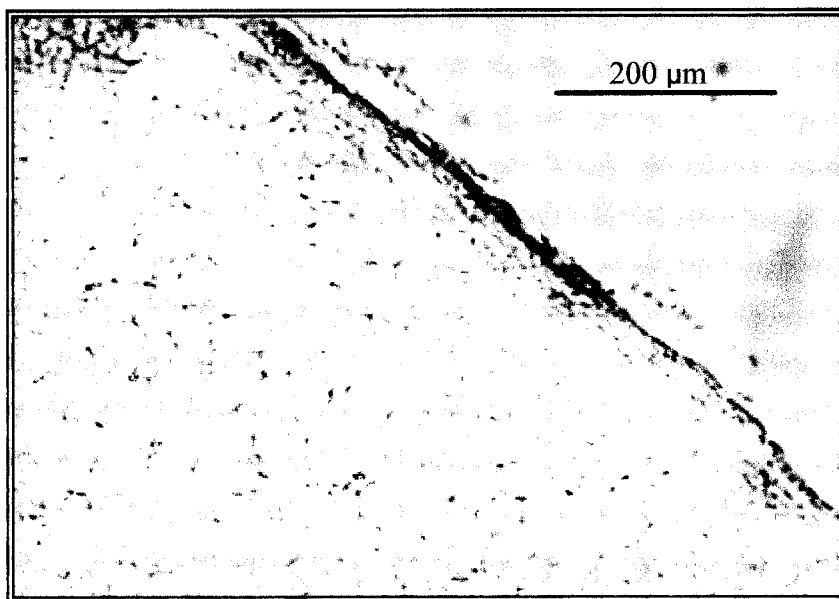


Figura 3.104 – Corte histológico do rim do murganho-B injectado com a estirpe B-9, onde se destaca a vacuolização das células dos túbulos da periferia.

Tabela 3.11 – Peso do murganho, volume injectado, concentração da solução injectada, percentagem do peso do fígado, tempo de sobrevivência dos murganhos e observações feitas após a injeção com as estirpes recolhidas na praia de Figueira da Foz.

estirpes inject.	murg.	Vol. Inj. (ml)	Concent. (mg/Kg)	Peso Do Murg. (g)	% do peso do Fígado	Tempo De Sobrev.	Observações
B-2	A	1	1500	38,4	4,4	Entre 16:30 e 20 h	Após a injeção revelou uma respiração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia ao longo da experiência, bem como os olhos semi-cerrados. Apresentou diarreia.
B-2	B	1	1500	37,9	4,7	Entre 16:30 e 20 h	Após a injeção revelou uma respiração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia ao longo da experiência, bem como os olhos semi-cerrados. Três horas após a injeção denotava princípios de diarreia.
B-10	A	1	1500	22,6	5,79	Entre 17:20 e 21:20 h	Após a injeção revelou uma respiração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia ao longo da experiência, bem como os olhos semi-cerrados.
B-10	B	1	1500	26,1	6,89	26:15 h	Após a injeção revelou uma respiração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia ao longo da experiência, bem como os olhos semi-cerrados.
B-11	A	1	1500	24,7	7,08	Sacrifi- cado após 48 h	Após a injeção revelou uma respiração mais ofegante. Apresentou uma certa letargia ao longo da experiência, bem como os olhos semi-cerrados.
B-11	B	1	1500	24,5	7,6	Sacrifi- cado após 48 h	Após a injeção revelou uma respiração mais ofegante e uma certa letargia. A partir das 6 horas após a injeção, passou a ter um comportamento normal.

No que diz respeito aos murganhos injectados com a estirpe B-2, verifica-se que ambos morreram entre 16:20 h e 20 h após a injeção. Macroscopicamente apenas os intestinos se apresentaram congestionados, tendo todos os outros órgãos apresentado um aspecto saudável. Após a pesagem do fígado constatou-se que a percentagem deste órgão em relação ao peso corporal - apesar de ser um valor que se encontra dentro dos parâmetros normais - era, em média, 2% menor do que os valores obtidos para os murganhos controlo.

Não se verificou patologia histológica a nível dos pulmões e do fígado. Nos intestinos, observou-se que muitas das vilosidades estavam destruídas (principalmente

no murganho-A) e que os núcleos das células epiteliais dessas estruturas se apresentavam picnóticos (Figura 3.105).

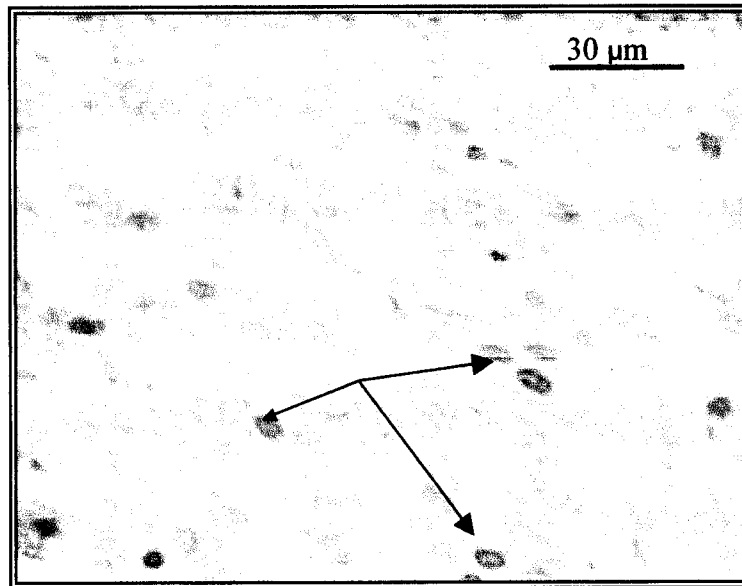


Figura 3.105 – Corte histológico do intestino anterior do murganho-B injectado pela estirpe B-2, onde se evidenciam os núcleos picnóticos das células epiteliais das vilosidades (setas).

Nos rins constatou-se uma retracção dos glomérulos (Figura 3.107) e uma degenerescência do citoplasma das células dos túbulos, bem como picnose dos seus núcleos (Figura 3.106).

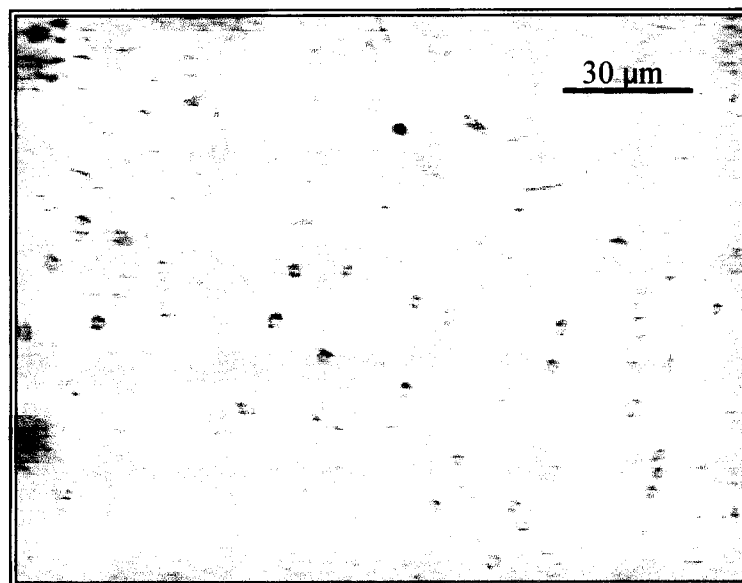


Figura 3.106 – Corte histológico do rim do murganho-A injectado com a estirpe B-2, onde se destaca a picnose dos núcleos e a degenerescência do citoplasma das células dos túbulos.

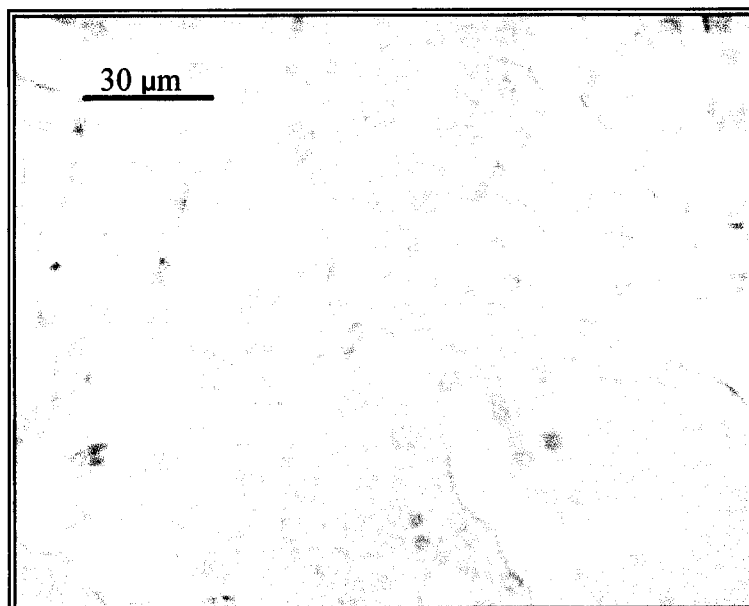


Figura 3.107 – Corte histológico do rim do murgancho-B injectado com a estirpe B-2, salientando-se a retracção dos glomérulos.

Para o caso dos murganhos injectados com a estirpe B-10, o designado por A morreu entre as 17:20 h e 21:20 h após a injeção enquanto que o murgancho-B morreu após 26:15 h. Macroscopicamente os pulmões e os rins não apresentavam aspecto que revelasse qualquer patologia. O fígado apresentou-se pálido e o intestino avermelhado e congestionado e no murgancho-B constatarem-se ainda, hemorragias ligeiras a nível torácico.

Após a pesagem do fígado constatou-se que a percentagem deste órgão em relação ao peso corporal, no caso do murgancho-B era muito semelhante aos dos murganhos controlo, enquanto que o murgancho A apresentava um peso cerca de 2% menor, valores dentro dos parâmetros normais.

Histologicamente, não se observaram alterações a nível dos pulmões. No intestino anterior verificou-se uma destruição completa de toda a estrutura tecidular (Figura 3.108) destacando-se a destruição física das vilosidades e das glândulas de Lieberkühn.

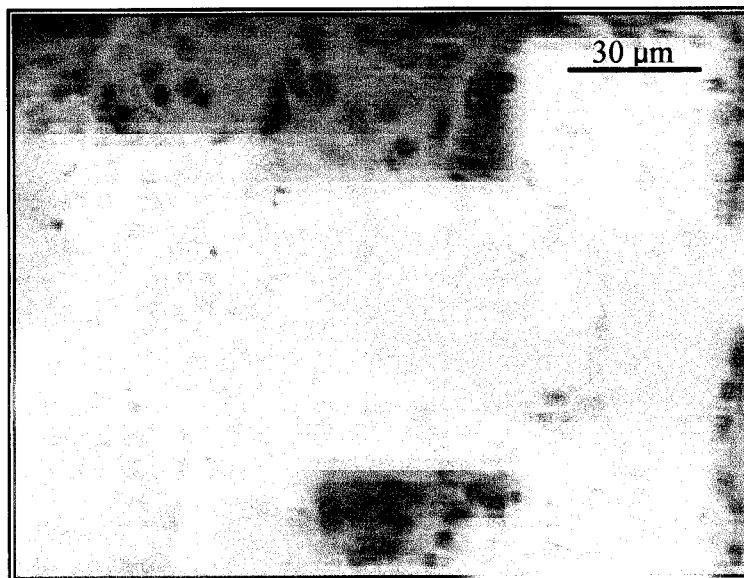


Figura 3.108 – Corte histológico do intestino do murganho-B injectado com a estirpe B-10, salientando-se a destruição de toda a estrutura tecidual.

O fígado apresentou uma degenerescência generalizada do citoplasma dos hepatócitos que aumentou o espaço dos canais sinusóideais (Figura 3.109).

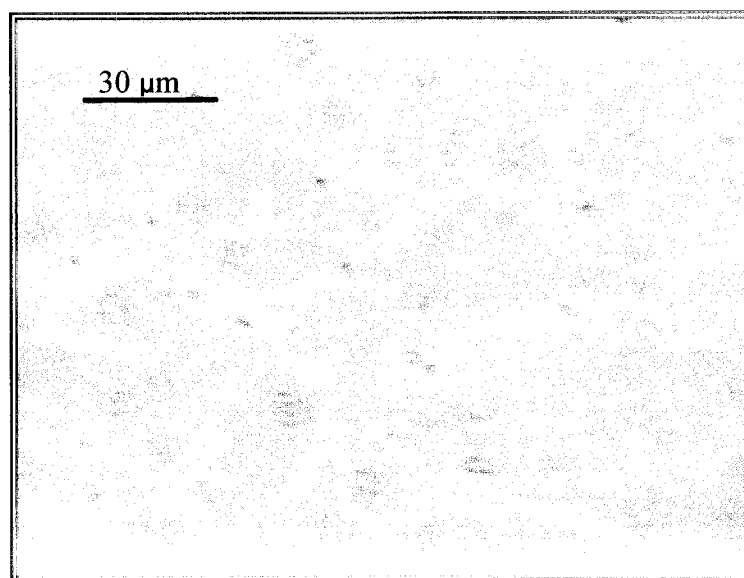


Figura 3.109 – Corte histológico do fígado do murganho-A injectado com a estirpe B-10, salientando-se o aumento do espaço dos canais sinusóideais.

Nos rins observaram-se hemorragias, a separação dos túbulos, a retracção dos glomérulos e picnose dos núcleos das suas células (Figura 3.110).

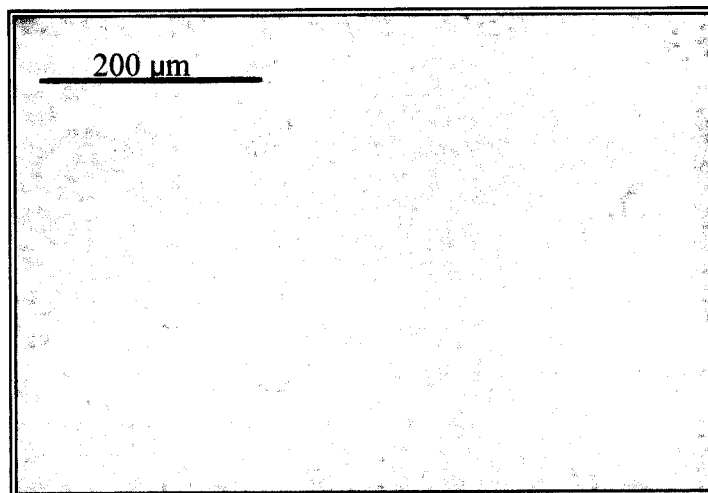


Figura 3.110 – Corte histológico do rim do murgancho-A injectado com a estirpe B-10, salientando-se a separação dos túbulos.

Nenhum dos murganhos injectados com a estirpe B-11, morreu no decorrer do ensaio, razão porque foram sacrificados 48 h após a injeccção. Macroscopicamente todos os órgãos se apresentaram aparentemente normais. Após a pesagem do fígado constatou-se que a percentagem deste órgão em relação ao peso corporal, era muito semelhante à dos murganhos controlo.

Histologicamente, não se verificaram alterações a nível dos intestinos e dos pulmões. O fígado apresentou uma ligeira degenerescência dos hepatócitos. O órgãos mais afectados foram os rins que se apresentaram com algumas hemorragias (Figura 3.111).

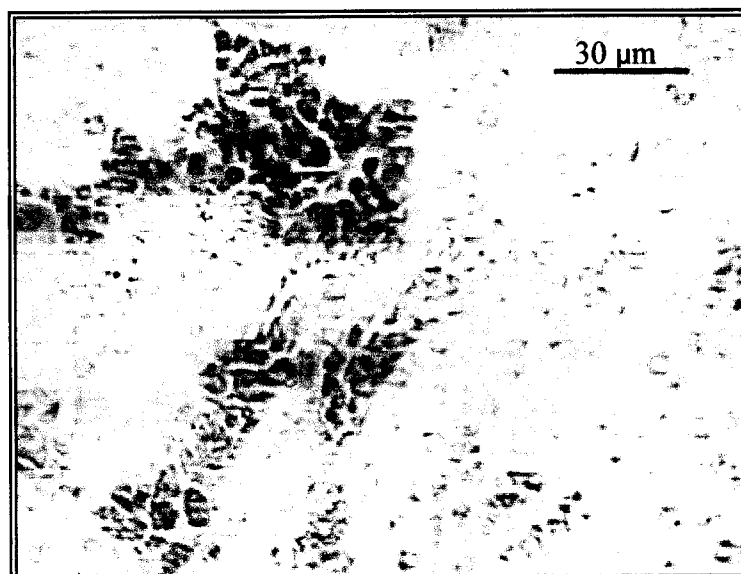


Figura 3.111 – Corte histológico do rim do murgancho-B injectado com a estirpe B-11, salientando-se as hemorragias.

Da análise conjunta dos resultados constata-se que todas as estirpes cultivadas evidenciaram, com maior ou menor intensidade, toxicidade para o murganho, a qual teve por consequência, nos casos mais graves, a morte, e nos casos mais ligeiros, alterações histopatológicas a nível dos rins, do fígado, do intestino anterior, num caso, dos pulmões.

Após a administração dos extractos de cianobactérias, todos os murganhos manifestaram quadros sintomatológicos semelhantes, que se caracterizaram por apatia, respiração ofegante, olhos semicerrados, e nalguns casos, evidência de diarreia.

A apatia, que nalguns casos se traduziu em inanição, sugere a possibilidade de as toxinas responsáveis serem do tipo hepatotóxico, uma vez que, como foi referido no capítulo I, página 20, os sintomas de envenenamento por estas substâncias são: prostração, anorexia, vômitos, dores abdominais e diarreia. No entanto, a análise histopatológica não revela efeitos provocados por este tipo de toxinas, que afectam preferencialmente o fígado, uma vez que os órgãos mais afectados são os intestinos e os rins.

Os fenómenos de diarreia podem indiciar a actuação de substâncias do tipo da lyngbiatoxina-A, aplisiatoxina ou debromoaplsiatoxina, que são conhecidas por provocarem, em casos de intoxicação, graves problemas gastrointestinais.

A análise dos cortes histológicos do rim revelou, de forma geral, retracção dos glomérulos, picnose, hemorragia e degenerescência das células epiteliais dos túbulos. Segundo Lambert *et al.* (1994), nos casos de intoxicação por microcistinas, apesar de se notarem maiores danos no fígado, também foram detectadas alterações no rim. Subsiste, no entanto, a dúvida de saber se estas alterações estão relacionadas com a acção directa das toxinas ou se resultam das lesões hepáticas (MARTINS, 1999).

Na observação histológica do fígado detectaram-se efeitos tóxicos que se traduzem no aumento do tamanho do núcleo de alguns hepatócitos, e em alguns casos, na degenerescência tecidular. Esta situação não está descrita para intoxicações por microcistinas ou nodularinas em mamíferos, mas foi relacionada com a acção de outras hepatotoxinas naturais com as aflatoxinas (Wales, 1967, *in* MARTINS, 1999).

Uma outra observação que vem de acordo ao atrás descrito é o facto de não se ter observado em nenhum murganho o aumento do peso do fígado que é um dos sintomas mais evidentes em caso de intoxicações por microcistinas ou nodularinas.

No que respeita ao intestino, as histopatologias mais frequentes foram, hemorragias, picnose do núcleo das células epiteliais das vilosidades, edemas das vilosidades, picnose, e para alguns casos, a destruição de toda a estrutura tecidular. Segundo Hamano *et al.* (1986) e Lange *et al.* (1990), as toxinas do tipo DSP, nomeadamente o ácido ocadáico, actuam destruindo o epitélio do intestino delgado, com edema da lâmina própria e das vilosidades (MARTINS, 1999). Também segundo ITO e NAGAI (1999), intoxicações por aplisiatoxina causam histopatologias ao nível do intestino.

Por fim verificou-se que a estirpe B-5, causou histopatologias a nível dos pulmões, que se traduziram por algumas e a perda da organização tecidular. ITO e NAGAI (1999), constataram que a aplisiatoxina causa danos a nível dos pulmões, originando hemorragias.

3.3.2 – Ensaio com artémia

Na tabela que se segue estão expressos os resultados obtidos a partir dos ensaios em artémia.

Tabela 3.12 – Resultados dos ensaios com artémia ao fim de 48 h de exposição aos extractos de cianobactérias.

Conc. Est. Cult.	100 %	10 %	1 %	0;1 %	0;01 %
	% m.	% m.	% m.	% m.	% m.
B1	25	0	0	0	0
B1	23	0	0	0	0
B1	27	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0
Controlo	0				
Controlo	0				
Controlo	0				

Analisando a tabela 3.12, verifica-se logo à partida que não ocorreu mortalidade nos poços controlo, e que apenas a estirpe B-1 (concentração 100%) provocou mortalidade nas artémias.

Os microcrustáceos, pela sua posição trófica - alimentando-se de detritos, bactérias, protozoários, rotíferos e fitoplâncton, e por sua vez, servindo de alimento a insectos, macroinvertebrados e peixes - têm-se revelado bons indicadores ecológicos, pois reflectem as alterações sofridas pelo meio designadamente os resultados da presença de agentes poluidores (COELHO, 1993).

Tendo em consideração o atrás expresso, não admira o crescente interesse, por parte comunidade científica, em estudos que abordam a influência das cianobactérias sobre o zooplâncton. Neste trabalho, como foi referido, vai dedicar-se mais atenção à influência das cianobactérias na artémia.

Têm sido realizados testes com estes organismos, no intuito de poderem constituir métodos rápidos para detectar a possível hepatotoxicidade e neurotoxicidade de florescências de cianobactérias em águas doces. Estudos de Campbell *et al.* (1994), mostraram haver uma boa correlação entre a concentração da hepatotoxina microcistina-LR e a mortalidade de artémia. Lathi *et al.* (1995), mostraram existir uma boa correlação entre a concentração de hepatotoxinas e a mortalidade de larvas de artémia, tendo também demonstrado a sensibilidade destes organismos a neurotoxinas (MARTINS, 1999).

Também existem trabalhos em que foi testada a possível toxicidade de cianobactérias de origem marinha face a artémia, como por exemplo o efectuado por SMITH (1996), no qual o autor verificou que florescências de Oscillatoriales eram tóxicas para artémia, ou os realizados por HAWSER *et al.* (1992), que lhe permitiram verificar a toxicidade de *Trichodesmium thiebautii* para artémia.

Da análise dos resultados pode inferir-se que apenas a estirpe B-1 é ligeiramente tóxica para artémia em situações agudas, originando uma mortalidade média de 25 % para concentrações de 10 mg/ml. Tal permite corroborar os estudos Campbell *et al.* (1994) e de Lahti *et al.* (1995), atrás referidos, uma vez que a estirpe acima referida foi a que apresentou valores mais elevados de microcistina através do método E.L.I.S.A. (tabela 3.13).

3.3.3 – Ensaio imunológico E.L.I.S.A.

Na tabela 3.13, estão discriminados os resultados do ensaio imunológico E.L.I.S.A..

Tabela 3.13 – Resultados obtidos através do ensaio E.L.I.S.A. das estirpes de cianobactérias cultivadas.

CÓDIGO	ESTIRPE	MICROCISTINAS
		(ng/mg)
B1	M-27	0,810
B2	FF-17	0
B5	E-35	0,115
B8	E-8	0
B9	M-20	0,280
B10	FF-36	0
B-11	FF-11	0,670

A tabela 3.13 sintetiza os resultados obtidos na detecção e quantificação de microcistinas pelo método imunológico E.L.I.S.A. Constata-se que não foram encontradas microcistinas nas estirpes B-2, B-8, B-10, tendo os valores encontrados nas outras estirpes variado entre 0,115 ng/mg e 0,810 ng/mg.

Os valores encontrados não são muito significativos quando comparados com os trabalhos realizados com cianobactérias de água doce, como por exemplo, os trabalhos de VASCONCELOS (1995), que obteve valores de microcistina que variaram entre os 2,1 µg/mg e 11,3 µg/mg. Tal facto permite inferir que este tipo de toxinas não terão sido as principais responsáveis pelas intoxicações verificadas em murganhos, podendo no entanto ter alguma relação com a mortalidade ocorrida na artémia.

IV - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, durante o período em que decorreu o trabalho, permitem retirar as seguintes conclusões:

As praias de Espinho, Mira, Figueira da Foz e São Pedro de Moel são colonizadas por cianobactérias pertencentes às ordens Chroococcales e Oscillatoriales.

Em todas as praias foram detectadas cianobactérias, com uma taxa de ocorrência de 35,9 % para a Praia de Espinho; 50,0 % para a Praia de Mira; 36,8 % para a Praia da Figueira da Foz e de 56,6 % para a Praia de São Pedro de Moel.

Nas praias estudadas, com excepção da Praia de Mira, foram detectadas cianobactérias planctónicas, com particular relevo para a Praia da Figueira da Foz onde a percentagem de ocorrência ascendeu aos 100%.

Os materiais recolhidos para detecção de cianobactérias bentónicas podem ser agrupados em três grupos distintos: material inorgânico (rochas); organismos vivos com concha ou que constroem recifes para sua protecção, fixos a um substrato (lapas, cracas, recifes de *sabellaria*, etc.); organismos vivos sem concha (algas, anémonas, etc.).

O primeiro grupo apresentou as taxas de ocorrência mais elevadas porque constitui o substrato ideal para a fixação destes microorganismos, por um lado, pela sua natureza calcária, e por outro, devido ao facto de as rochas escolhidas se encontrarem ao abrigo da ondulação.

No segundo grupo destacam-se os recifes de *sabellaria* que apresentaram uma taxa de ocorrência de 100%, em virtude de este tipo de substrato, constituído por areias e sedimentos orgânicos, proporcionarem um local de eleição para as cianobactérias.

Os constituintes do terceiro grupo apresentaram taxas de ocorrência baixa, uma vez que constituem um suporte pouco estável, e portanto inadequado à fixação destes organismos. A presença de cianobactérias em algas e anémonas pode estar relacionado com associações simbióticas.

A cultura destes organismos em laboratório é extremamente difícil e morosa, o que permite concluir que as condições de luminosidade, temperatura e nutritivas proporcionadas não são as ideais.

Todas as estirpes que se conseguiram cultivar e testar mostraram ser tóxicas para os murganhos, causando um quadro sintomatológico – apatia, alterações respiratórias (respiração ofegante), diarreia – que podem levar à morte.

A análise macroscópica dos órgãos, efectuada após autópsia, permitiu constatar que o mais afectado é o intestino, embora tenha sido observado, num caso, alteração do fígado.

Todas as estirpes causaram alterações histopatológicas no intestino, particularmente na região anterior, que se manifestaram, em alguns casos, pela destruição da estrutura tecidual, reacções inflamatórias, aparecimento de núcleos picnóticos nas células epiteliais das vilosidades e hemorragias. Estes distúrbios sugerem a produção de toxinas diarreicas que poderão ser do grupo das DSP, nomeadamente o ácido ocadaico.

No rim, as alterações histopatológicas observadas foram: retracção dos glomérulos, hemorragias, picnose, vacuolização e degenerescência das células epiteliais dos túbulos mais periféricos. Este último efeito evidencia a provável acção das toxinas a partir da periferia do órgão.

Os efeitos histopatológicos a nível do fígado manifestaram-se no aumento do tamanho do núcleo de alguns hepatócitos, na degenerescência destas células e em hemorragias.

O pulmão foi o órgão menos afectado tendo-se, num caso, verificado alterações histopatológicas que se traduziram na perda de organização tecidual periférica e hemorragias.

Apenas uma das estirpes mostrou certo grau de toxicidade para artémia, em concentrações de 10 mg/ml.

Através do ensaio E.L.I.S.A. foram detectadas microcistinas apenas em quatro estirpes. Os valores encontrados são muito inferiores aos obtidos para cianobactérias de água doce.

A sintomatologia apresentada por alguns animais sugerem intoxicação por neurotoxinas. No entanto, estas substâncias parecem ser diferentes das produzidas pelas cianobactérias de água doce, uma vez que se verificaram tempos de sobrevivência superiores.

V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

É do conhecimento comum, tal como foi referenciado no capítulo I, que as cianobactérias são dos seres vivos mais antigos e mais ubíquos do planeta Terra que podem, em especial nas águas doces, formar florescências na presença de grandes cargas orgânicas, principalmente sob a forma azotada ou fosfatada, provenientes de esgotos domésticos ou industriais e da actividade agrícola em condições de temperaturas elevadas e alta luminosidade (VASCONCELOS e ARAÚJO, 1994).

Nestas condições estes microorganismos tornam-se mais competitivos porque possuem a capacidade de fixar azoto atmosférico, e porque evoluíram de modo a controlar a sua flutuabilidade através de vacúolos especiais (aerossomas) que podem encher com azoto para controlar a posição. Esta propriedade permite-lhes movimentarem-se verticalmente de forma a optimizarem o seu desenvolvimento (*in site* http://www.hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/catalogue/generale/votre_sante/algeaf.htm).

O facto de terem sido encontradas cianobactérias em todas as praias amostradas, aliado ao facto de todas as cultivadas e testadas apresentarem toxicidade, revela a importância de possíveis risco para a saúde humana. Embora se saiba que o aparecimento de florescências é mais comum em águas tropicais e sub-tropicais, onde as condições de temperatura e luminosidade são mais favoráveis do que nas águas temperadas, convém não esquecer que, devido à falta de consciência ecológica por parte das potências mundiais, o aumento da temperatura média ambiente é uma realidade que pode alterar as condições climáticas mundiais. Além disso, a qualidade das águas das costas portuguesas, apesar de todas as directivas da U.E. e de todo o “esforço” por parte das entidades responsáveis, continua a diminuir graças ao aumento da carga nutritiva proveniente de esgotos urbanos sem tratamento.

O risco da possível ocorrência de florescências nas águas das praias portuguesas pode causar, por um lado, grandes prejuízos económicos a nível de turismo, pois durante estas florescências o aspecto das águas torna-se pouco atractiva para os

banhistas, por outro, como já foi referido ao longo do sub-capítulo 1.4, as cianobactérias marinhas produzem toxinas que podem causar graves danos à saúde humana (agudos ou crónicos) quer por contacto directo, quer através da ingestão de organismos filtradores ou predadores destes organismos.

Este trabalho prossegue a investigação de MARTINS (1999), que efectuou estudos nas praias da zona norte portuguesa, sugerindo que este tipo de monitorização deveria continuar a ser feito ao longo das praias da zona centro, sul, e ilhas.

Naturalmente dever-se-ia estender este tipo de monitorização a toda a costa portuguesa no intuito de conhecer as estirpes com possível toxicidade, no sentido de prevenir possíveis prejuízos.

Noutra vertente, seria extremamente interessante tentar encontrar as condições ideais ao crescimento em cultura, para cada cianobactéria identificada, no intuito de se obter biomassa para efectuar estes e outros testes toxicológicos, como por exemplo testes com organismos filtradores, predadores, testes de bioacumulação, etc.

Também poderia ser muito interessante efectuar ensaios celulares ou enzimáticos que permitem detectar compostos com actividade farmacológica.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. (2000) – Symbiotic Interactions. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 523-561.

ALMEIDA, A., ANDRÉ, J. & CUNHA, P. (1998) – Visita de Estudo à Zona Costeira entre o Cabo Mondego e São Pedro de Moel. *Seminário Dunas da Zona Costeira de Portugal*, Associação EUROCOAST-PORTUGAL, Leiria, 23 pp.

AL-THUKAIR, A. & AL-HINAI, K. (1993) – Preliminary damage assesement of algal mats sites located in the Western Gulf following the 1991 oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, **27**, 229-238.

AL-THUKAIR, A. & GOLUBIK, S. (1991) – Five new *Hyella* species from the Arabian Gulf. *Algological studies*, **64**, Stuttgart, 167-197.

AMORIM, A. (1997) – *Acumulação e depuração de microcistinas por Mytilus galloprovincialis Lamark*. Dissertação de mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 53 pp.

ANAGNOSTIDIS, K. & ROUSSOMOUSTAKAKI, M. (1991) – *Isocystis halobia* spec. nova, a benthic nostocalean cyanophyte from the heliothermal saltwork mats of Messolongion, Hellas (Greece). *Algological studies*, nº 64, Stuttgart, 299-332.

ARIÑO, X., HERNANDEZ-MARINE, M. & SAIZ-JIMENEZ C. – Colonisation of cryptoendolithic niches in Roman mortars by phototrophic micro-organisms.(ver sites consultados)¹

ATTENBOROUGH, D. (1980) – *A vida na Terra*. Selecções do Reader's Digest, Lisboa, 368 pp.

AZEVEDO, S. (1998) – Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a Saúde Pública. *Medicina On Line*, vol. 1.

BANKER, P., CARMELI, S., HADAS, O., TEILSCH, B., PORAT, R. & SUKENIK, A. (1997) – Identification of cylindrospermopsina in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.*, **33**, 613-616.

BARBOSA, B. (1981) – Carta Geológica de Portugal, notícia explicativa da folha 16-C (Vagos). Serviços Geológicos de Portugal, Lisboa, 60 pp.

BOURRELLY, P. (1970) – Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome III: les Algues Bleues et Rouges, les Eugléniens et Cryptomonadines. Ed. N. Boubée & Cie., Paris, 512 pp.

BROUTIN, J. (2000) – *Quelques grandes étapes évolutives des végétaux. Pour la science*, Dossier hors-série (de la graine à la plante), 16-21.

CAMPBELL, A. (1994) – *Fauna e Flora do Litoral de Portugal e Europa*. Ed. FAPAS, 320 pp

CAPONE, D., ZEHR, J., PAERL, H., BERGMAN, B. & CARPENTER, E. (1997) – *Trichodesmium*, a Globally Significant Marine Cyanobacterium. *Science*, **276**, 1221-1229.

CAPONE, D., SUBRAMANIAM, A., MONTOYA, P., VOSS, M., HUMBORG, C., JOHANSEN, A., SIEFERT, R. & CARPENTER, E. (1998) – An extensive bloom of the N₂-fixing cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the central Arabian Sea. *Marine Ecological Progress Series*, **172**, 281-292.

CARPENTER, E. & ROMANS, K. (1991) – Major role of the cyanobacterium *Trichodesmium* in nutrient cycling in North Atlantic Ocean. *Science*, **254**, 1356-1358.

CARPENTER, E., MONTOYA, J., BURNS, J., MULHOLLAND, M., SUBRAMANIAM, A. & CAPONE, D. (1999) – Extensive bloom of a N₂-fixing diatom/cyanobacterial association in the tropical Atlantic. Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, **185**, 273-283.

CARMICHAEL, W., JONES, C., MAHMOOD, N. & THIES, W. (1985) – Algal toxins and water-based diseases. *CCR Critical Reviews in Environmental Control*, **15** (3), 725-313.

CARMICHAEL, W. (1994) – The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, **270**, (1), 78-86.

CHORUS, I. & BARTRAM, J. (1999) – *Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN SPON, London, 416 pp.

CODD, G. (1998) – Cyanobacterial blooms and toxins in fresh, brackish and marine waters. *Harmful Algae*. Eds B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 13-17.

- COELHO, M. (1993) – A comunidade de crustáceos zooplânctônicos da Albufeira da Venda Nova e a influência do cobre na sua dinâmica populacional. *Actas do 2º Encontro de Plânctologistas Portugueses*. 1, 173-192.
- DOW, C. & SWOBODA, U. (2000) – Cyanotoxins. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 613-632.
- FACCINI, J., ABBOTT, D. & PAULUS, G. (1990) – Mouse histopathology. A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies. Elsevier Science Publisher B. V., 176 pp.
- FALCONER, I. (1993) – Measurement of Toxins from Blue-green Algae in Water and Foodstuffs. In: “Algal Toxins in Seafood and Drinking Water”. Academic Press Ltd., 165-175.
- FOGG, G. (1982) – Marine Plankton. In “*The Biology of Cyanobacteria*” Botanical Monograph. Ed. N.G. Carr, B.A. Whitton. Blackwell Scientific Publ., 491-513.
- FONSECA, C. (1999) – Praias com os dias contados ?. *Fórum Ambiente*, 63, 86-89.
- FOX, D. (1993) – Health Benefits of *Spirulina* and Proposal for a Nutrition Test on Children Suffering from Kwashiorkor and Marasmus. *Spiruline algue de vie*, eds. F. Doumenge, H. Durand-Chastel, A. Toulemont, Musée Océanographique, Monaco, 179-186.
- FRANCA, S., PINTO, L., ALVITO, P., SOUSA, I., VASCONCELOS, V. & DOUCETTE, G. (1996) – Studies on prokaryotes associated with PSP producing dinoflagellates. *Harmful and Toxic Algal Bloom*. Eds T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 347-350.
- FREEMAN, W. & BRACEGIRDLE, B. (1966) – *An Atlas of Histology*. 2ª ed., Heinemann educational., Hong Kong, 140 pp.
- GENESER, F. (2000) – *Histología*. 3ª ed., Ed. Médica Panamericana, S.A., Argentina, 813 pp.
- GERWICK, W., ROBERTS, M., PROTEAU, P. & CHEN, J. (1994) – Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *Journal of Applied Phycology*, Kluwer Academic Publishers, Belgium, 6, 143-149.
- HAWSER, S., O'NEIL, J., ROMAN, M. & CODD, G. (1992) – Toxicity of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium* to zooplankton. *Journal of Applied Phycology*, Kluwer Academic Publishers, Belgium, 4, 79-86.

HENRIQUES, M., REIS, R. & DUARTE, L. (1998) – Locais com interesse geológico da orla costeira portuguesa entre o Cabo Mondego e a Nazaré. *Actas do V Congresso Nacional de Geologia*, **84** (2), Instituto Geológico e Mineiro e Sociedade Geológica de Portugal, Lisboa, 6-9.

HUBER-PESTALOZZI, G. (1938) – Das Phytoplankton des Süßwasser 1: Theil: Allgeminer Teil Blaualgen. Bakterien. Pilze. ed., Die Binnengewasser XVI, Stuttgart, 342 pp.

ITO, E. & NAGAI, H. (1999) – Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning. *Toxicon*, **38**, 123-132.

KAAS, H. (1985) – Algal studies of Danish Wadden Sea. III. Blue-green algae in tidal flat sediments (sand flats and lower salt marsh) at Rejsby; taxonomy and ecology. *Opera Botanica*, **79**, 38-61.

KERR, J. (1999) – *Atlas of Functional Histology*. Ed. Mosby, London, 401 pp.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1999) – Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gartner, H. Heyning, D. Mollenhauer, (Eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/1. Gustav Fischer Verlag, Jena, 548 pp.

LABORATORY FOR BIOLOGICAL RESEARCH IN AQUATIC POLLUTION & LABORATORY FOR MARICULTURE (1981) – Standardized short term toxicity test with *Artemia nauplii* (arc.test). n° 106, 370-376.

MAIA, C. (1939) – O clima da Figueira da Foz. *Climatologia*, **1**, Tipografia da “Atlântida”, Coimbra, 124 pp.

MACKAY, M., NORTON, R. & BOROWITZKA, L. (1983) – Marine Blue-Green Algae Have a Unique Osmoregulatory System. *Marine Biology*, **73**, 301-307.

MARGULIS, L. & SAGAN, D. (1992) – *As origens do sexo*. Edições 70, Lisboa, 326 pp.

MARTINS, M. (1999) – *Ocorrência e Ecotoxicologia de Cianobactérias Marinhas da Região Norte de Portugal*. Dissertação de mestrado em Hidrobiologia apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 129 pp.

MOORE, R. (1981) – Constituents of Blue-Green Algae. *Marine Natural Products. Chemical and Biological Prospectives*, n° 4, 1-52.

MURPHY, L. & HAUGEN, E. (1985) – The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.*, nº 30(1), ed. American Society of Limnology and Oceanography, 47-58.

MYNDERSE, J., MOORE, R., KASHIWAGI, M. & NORTON, T. (1977) – Antileukemia activity in Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science*, **196**, 538-539.

OLSON, R., CHISHOLM, S., ZETTLER, E. & ARMBRUST, E. (1990) – Pigments, size and distribution of *Synechococcus* in North Atlantic and Pacific Oceans. *Limnol. Oceanogr.*, **35**(1), 45-58.

OSBORNE, N., WEBB, P., STEWART, I. & SHAW, G. (2000) – Human Toxicology and Epidemiology of the Marine Blue-Green Alga *Lyngbya majuscula*. (ver sites consultados)²

PAERL, H. (2000) – Marine Plankton. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 121-148.

PENTECOST, A. & WHITTON, B. (2000) – Limestone. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 257-279.

PEREIRA, E. (1998) – *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, Porto, 100 pp.

POTTS, M. (2000) – *Nostoc*. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 465-504.

QUESADA, A., CONTRERAS, M. & VALIENTE, E. (2000) – Ecofisiología de tapetes cianobacterianos de McMurdo Sound (Antártida Continental) Abstracts. *X Congreso de la Asociación Española de Limnología y II Congreso Ibérico de Limnología*. 87.

RADWAN, S. & AL-HASAN, R. (2000) – *Oil pollution and cyanobacteria*. ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 307-319.

ROCHA, R., MANUPPELLA, G., MOUTERDE, R., RUGET, C. e ZBYSZEWSKI, G. (1981) – Carta Geológica de Portugal, notícia explicativa da folha 19-C (Figueira da Foz). Serviços Geológicos de Portugal, Lisboa, 126 pp.

- RÖRIG, L., YUNES, J., KUROSHIMA, K., SCHETINNI, C., PEZZUTO, P., e PROENÇA, L. (1998) – Studies on the Ecology and Toxicity of *Trichodesmium* spp. Blooms in Southern Brazilian Coastal Waters. *Harmful Algae*, Eds B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 22-26.
- RIPPKA, R. DERUELLES, J., WATERBURY, J., HERDMAN, M. & STANIER, R. (1979) – Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**, 1-61.
- SMITH, P. (1996) – Toxic effects of blooms of marine species of oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and brine shrimp (*Artemia salina*). *Toxicon*, **34** (8), 854-869.
- STAL, L. (1991) – The metabolic versatility of the mat-building cyanobacteria *Microleus chthonoplastes* and *Oscillatoria limosa* and its ecological significance. *Algological Studies*, nº 64, 453-467.
- STAL, L. (2000) – Cyanobacterial Mats and Stromatolites. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 61-120.
- TEIXEIRA, C. & PERDIGÃO, J. (1962) – Carta Geológica de Portugal, notícia explicativa da folha 13-A (Espinho). Serviços Geológicos de Portugal, Lisboa, 28 pp.
- VASCONCELOS, V., CAMPOS, T., AMORIM, A & SOARES, A. (1993) – Toxicidade de estirpes de cianobactérias isoladas a partir das lagoas das Braças, Vela e Mira. *Actas do 2º Encontro de Plânctologistas Portugueses*, **1**, 193-201.
- VASCONCELOS, V. (1994) – Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in portuguese fresh waters. *Arch. Hydrobiol.*, **130**, 439-451.
- VASCONCELOS, V. & ARAÚJO, F. (1994) – *Cianobactérias: Um risco para o Ambiente e para a Saúde Humana*. Direcção Geral de Saúde e Instituto da Água, 24 pp.
- VASCONCELOS, V. (1995) – *Toxicologia de Cianobactérias. Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 137 pp.
- VIEIRA, P. (2001) – Toda a verdade sobre as praias. *Fórum Ambiente*. **71**, 26-34.

VONSHAK, A. & TOMASELLI, L. (2000) – *Arthrospira (Spirulina)*: Dystematics and Ecophysiology. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 505-522.

WATERBURY, J., WATSON, S., GUILLARD, R. & BRAND, L. (1979) – Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature*, **277**, 293-294.

WETZEL, R. (1993) – *Limnologia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 919 pp.

WHITTON, B. & POTTS, M. (1982) – Marine litoral. In “*The Biology of Cyanobacteria*” Botanical Monograph. Ed. N.G. Carr, B.A. Whitton. Blackwell Scientific Publ., 515-542.

WHITTON, B. & POTTS, M., (2000) – Introduction to the cyanobacteria. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 1-9.

WILMOTTE, A, (1991) – Taxonomic study of marine oscillatoriacen strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. I. Morphological variability and autecological features. *Algological Studies*, **64**, Stuttgart, 215-248.

WORLD HEALTH ORGANIZATION GENEVA (1988) – Aquatic (Marine and Freshwater) Biotoxin. *Environmental Health Criteria*, **37**, Geneva, 95 pp.

WYNN-WILLIAMS, D. (2000) –Cyanobacteria in deserts-Life at the Limit?. *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. A. Whitton and M. Potts, Netherland, 341-366.

SITES CONSULTADOS NA INTERNET

http://www.geomic.uni-oldenburg.de/projekte/microcore/endreport/chapter_55.htm¹

http://www.utas.edu.au/docs/plantscience/HAB2000/poster_abstracts/docs/osborne_Nic_holas_J_T.html²

<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/www-cyanosite/images/images.html>

<http://www.unex.es/botanica/cyanophy.htm>

<http://www.netpets.org/fish/reference/reefref/cyanobacteria.html>

<http://www.cs.cuc.edu/~tfutcher/Cyanophytalab.html>

<http://www.geocities.com/CollegePark/1306/vida1.htm>

<http://www.botan.su.se/fysiologi/Cyano/Intro.htm>

<http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/cyanofr.html>

Declaração Universal dos Direitos da Água.

(<http://www.ongba.org.br/sindae/pg7a.html>).

<http://www.ceps.ops.oms.org/comum/gestcont/capi6.pdf>

<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>

<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0g.htm>

<http://www.botany.uq.edu.au/research/marine/publication/pdf/literatureandrew.pdf>

http://www.hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/catalogue/generale/votre_sante/algeaf.htm

<http://www.discoverwest.com.au/mapall.html>

http://mollie.berkeley.edu/~volkman/courses/microbial_slides.html

<http://www.ng.hik.se/~njasv/mcb.html>