JOANA FERNANDES DA FONSECA DA COSTA MARTINS OSSWALD

ESTUDO DA TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DA ALBUFEIRA DO MARANHÃO (PORTUGAL)

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

Porto, Janeiro de 2002

JOANA FERNANDES DA FONSECA DA
COSTA MARTINS OSSWALD

ESTUDO DA TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DA ALBUFEIRA DO MARANHÃO (PORTUGAL)

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

Porto, Janeiro de 2002

Resumo

Efectuou-se o isolamento e cultivo de 12 estirpes cianobacterianas (géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*) dulciaquícolas diazotróficas, provenientes da albufeira do Maranhão (Sul de Portugal) e estudou-se a presença de toxinas em extractos celulares obtidos por liofilização de culturas unialgais. Utilizaram-se vários métodos laboratoriais: isolamento e cultivo das cianobactérias em meio de cultura artificial (meio Z8), identificação, classificação taxonómica e caracterização morfométrica por microscopia óptica das estirpes e, para a análise de toxicidade, utilizaram-se as técnicas, ELISA, HPLC, MALDI-TOF-MS e bioensaio com murganhos (observados durante 60 h após injecção i.p.).

Foram detectados efeitos tóxicos causados por seis das estirpes isoladas; (uma estirpe *Anabaena* spp. revelou-se neurotóxica), mas não foi possível, apesar das várias técnicas utilizadas, identificar as cianotoxinas responsáveis por essa toxicidade. Conclui-se que os métodos mais utilizados para rastreio de cianotoxinas (ELISA e HPLC) não são sempre suficientemente elucidativos e que para além do género *Microcystis*, existem outros tóxicos em Portugal, nomeadamente os diazotróficos.

Abstract

Twelve diazotrophic strains of freshwater Cyanobacteria (genera *Anabaena*, *Aphanizomenon* and*Cylindrospermopsis*) were isolated from Maranhão reservoir (South of Portugal) and cultivated. Toxicity of their cellular extracts, obtained from freeze-dried unialgal cultures, was studied. In this work different methods were applied: isolation, culturing in artificial media (Z8 media), identification, taxonomic classification and morphometric characterization, using optical microscopy. Toxicity analyses of the strains was done by, ELISA, HPLC, MALDI-TOF-MS and bioassay in mice (observed during 60 h after i.p. injection). Six strains caused toxic effects (one *Anabaena* spp. was neurotoxic) but it was not determined which type of cyanotoxin was involved. It was concluded that the most used methods in monitoring (ELISA and HPLC) are not always sufficiently elucidating and that there other toxic genera than *Microcystis* in Portugal, namely the diazotrophic ones.

Agradecimentos

Dra. Maria Antónia Ceia, da Administração Regional de Saúde do Alentejo, pelo envio das amostras de água conjuntamente com os dados físico-químicos e de fitoplâncton.

Doutora Ana Castro, pela ajuda durante os bioensaios.

Dra. Elisa Pereira, pela realização dos testes ELISA.

Tec..Emanuel e Tec. Alexandrina, do Instituto Abel Salazar, pela preparação dos cortes histológicos.

Doutora Jutta Fastner, Technical University Berlin, pela realização de análises MALDI.

Prof. Doutor Michio Namikoshi, Tokyo University of Fisheries, pela realização da análise FAB-MS.

Engº. João Claro, da Universidade do Porto (I.N.E.T.I.)., pela ajuda na análise estatística.

Prof. Doutor Vítor Vasconcelos e Doutor Martin Saker, pela excelente orientação deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o apoio do projecto europeu CYANOTOX (ENV4-CT98-0802).

Abreviaturas

ARS . . . . . Administração Regional de Saúde
WHO . . . . . World Health Organization, o mesmo que OMS (Organização Mundial de Saúde)
B . . . . . Ponto de amostragem Benavila
CIIMAR . . . . . Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental
CN . . . . . Ponto de amostragem Clube Náutico
CL50 . . . . . Concentração letal, capaz de matar 50% dos indivíduos expostos
DL50 . . . . . Dose letal, capaz de matar 50% dos indivíduos expostos
ELISA . . . . . Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMPK . . . . . EnviroGard® Microcystins Plate Kit
FAB-MS . . . . . Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
HPLC . . . . . Cromatografia de Fase Líquida de Alta Resolução
i.p. . . . . . Intraperitonial
i.v. . . . . . Intravenosa
LPS . . . . . Lipopolissacarídeos
MALDI-TOF MS . . . Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectroscopy
MiliQ . . . . . Aparelho de desionização e esterilização de água (Millipore)
PSP . . . . . Paralytic Shellfish Poisoning
UV . . . . . Ultra Violeta
Z8 . . . . . Nome do meio de cultura utilizado (Kotai,1972)

ÍNDICE

p. 11

1. Introdução

1.1. Cianobactérias: biologia, taxonomia e ecologia

1.2. Ocorrências cianobacterianas em água doce e suas consequências

1.2.1. Consequências ecológicas

1.2.2. Consequências na saúde pública

1.3. Cianotoxinas

1.3.1. Tipos de cianotoxinas produzidas por cianobactérias diazotróficas

1.3.2. Modo de acção das cianotoxinas em animais

1.3.3. Métodos de detecção e análise das cianotoxinas

1.4. Cianobactérias tóxicas em Portugal

1.4.1. Ocorrências tóxicas e estudo das cianotoxinas em Portugal

1.5. Objectivos deste trabalho

p. 33

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

2.2. Isolamento e cultura das cianobactérias

2.3. Classificação taxonómica das estirpes isoladas

2.4. Estudo da toxicidade das estirpes cultivadas

2.4.1. ELISA

2.4.2. HPLC

2.4.3. MALDI–TOF MS

2.4.4. Bioensaios com ratinhos

p. 39

3. Resultados e discussão

3.1. Estirpes cianobacterianas isoladas e cultivadas

3.2. Análise da toxicidade das estirpes cianobacterianas cultivadas: ELISA, HPLC e MALDI–TOF MS

3.3. Bioensaios com ratinhos

p. 57

4. Considerações finais

p. 59

5. Referências bibliográficas

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cianobactérias: biologia, taxonomia e ecologia

As cianobactérias, também referidas como algas azuis-verdes, são organismos procarióticos unicelulares, coloniais ou multicelulares filamentosos que apresentam algumas características do grupo Algae: parede celular, pigmentos e capacidade de realizar a fotossíntese oxigénica (Chorus, 2001) *(fig.1)*.

A denominação algas azuis-verdes, provem da sua pigmentação verde azulada, conferida pelos vários pigmentos incluindo a clorofila-a e a ficocianina (Whitton & Potts, 2000). São organismos ubíquos (desde o Ártico ao Antártico), aquáticos ou terrestres que podem viver livremente ou estabelecer relações simbióticas com outros seres vivos (Bothe, 1982; Adams, 2000). Segundo alguns autores, a grande capacidade para viverem em todos os habitats é-lhes conferida pela a sua longa história evolutiva, havendo registos fósseis de cianobactérias com 3500 milhões de anos (Shopf, 1993; Whitton & Potts, 2000).

As cianobactérias são microorganismos que requerem apenas água, CO_2, alguns minerais e luz, para viverem (Mur, *et al.*, 1999). Algumas têm a capacidade de fixar o azoto atmosférico, através da redução do N_2 a NH_4^+, tornando os seus requisitos ambientais ainda mais simples. Por conseguinte, estas cianobactérias apresentam vantagens competitivas quando o azoto se torna factor limitante para outras algas. Esta capacidade de fixação do azoto atmosférico (diazotrofia) manifesta-se em algumas espécies de cianobactérias unicelulares, filamentosas, com e sem heterocistos (células diferenciadas, especializadas na fixação do azoto em meio aeróbio) (Bothe, 1982). Os géneros aquáticos diazotróficos mais referidos na literatura são os filamentosos com heterocistos: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* e *Nostoc*.

Os heterocistos são células especializadas para a fixação do azoto que se distinguem ao microscópio óptico pelo facto de terem um revestimento celular mais espesso (formado por camadas de glicolípidos e polissacarídeos) do que as outras células vegetativas. Estas camadas parecem criar no interior do heterocisto as condições de anaerobiose, necessárias à actividade da nitrogenase que é a enzima catalizadora da fixação de azoto (N_2) em amónia (NH_4^+). Outras características morfológicas que distinguem os heterocistos das outras células é o facto de aqueles terem um citoplasma mais hialino e apresentarem duas estruturas polares (microplasmodesmata) que fazem a ligação às células vizinhas para trocas metabólicas (Bothe, 1982; Wolk, 1982) *(fig. 1)*.

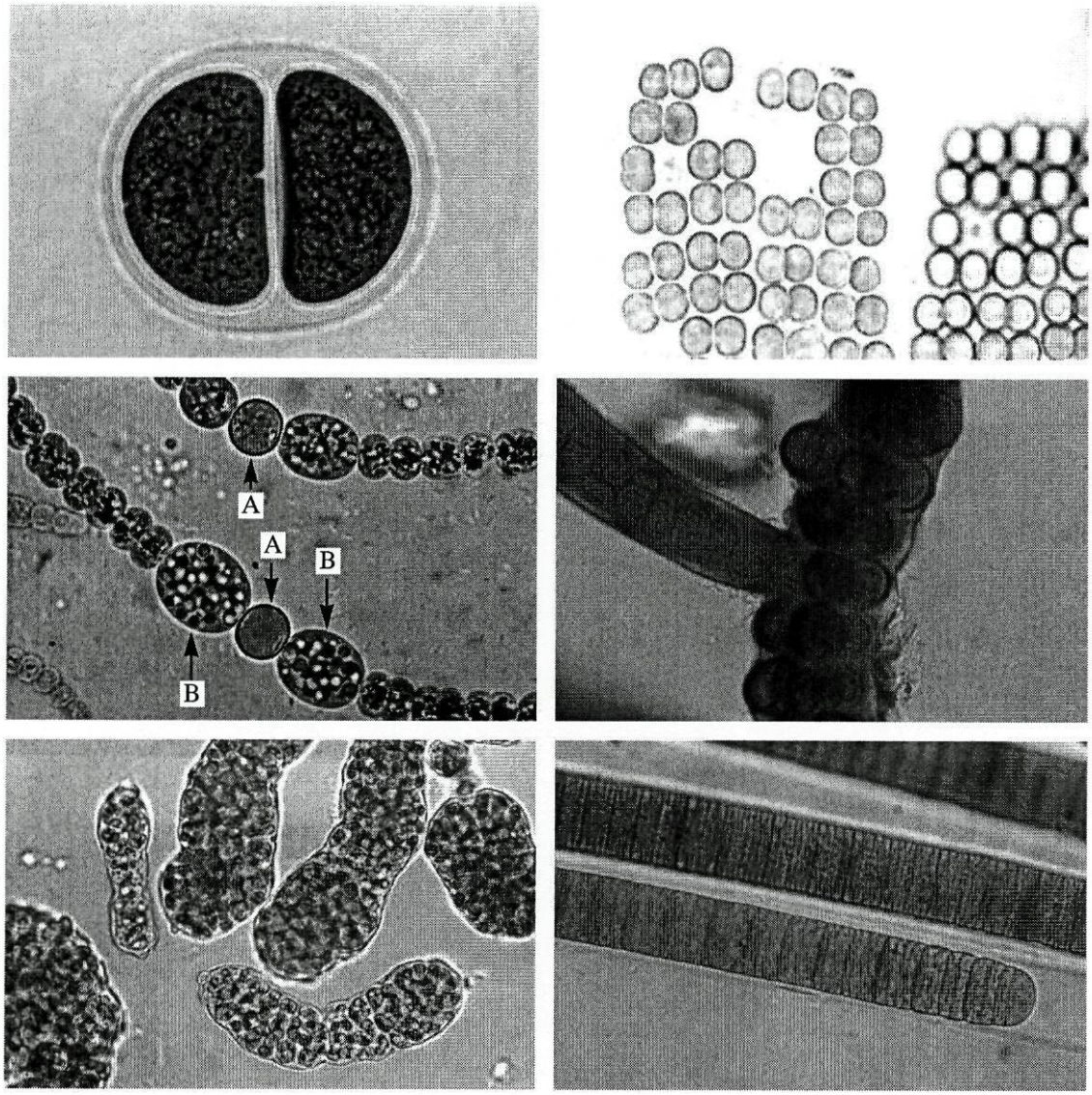


Figura 1 - *[continua na página seguinte]*
Alguns exemplos de tipos morfológicos diferentes, presentes no grupo Cyanobacteria (as seis primeiras imagens foram retiradas de Whitton & Potts, 2000*).*
A-heterocisto. B-acineto.
Da esquerda para a direita e de cima para baixo:
Chroococcus sp; Merismopedia sp; Anabaena sp; Stigonema sp; Nostoc sp; Lyngbia sp.

A única forma de reprodução no grupo Cyanobacteria é a assexual. A fissão binária é o método mais comum, podendo ser complementada pela produção de esporos nas ordens Chamaesiphonales e Pleurocapsales. Os planos de divisão celular condicionam a forma do agrupamento celular. Nas espécies filamentosas, as divisões celulares dão-se de modo a formar cadeias de células denominadas tricomas; os tricomas podem ser rectos, curvos ou helicoidais, como demontrado na figura 1 (Nichols & Adams, 1982; Wolk, 1982; Mur *et al.*, 1999).

Em algumas cianobactérias, a reprodução em condições adversas é assegurada através de células de resistência denominadas acinetos que se dividem quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis. Os acinetos são facilmente reconhecidos ao

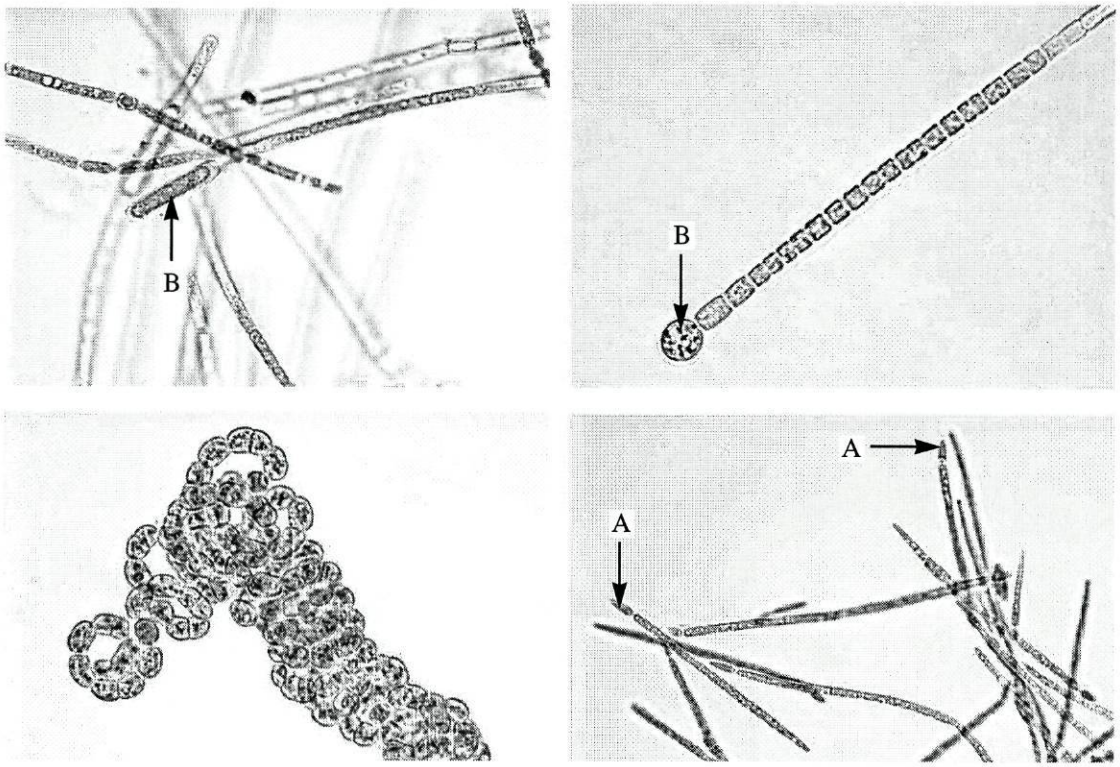


Figura 1 - *[continuação da página anterior]*
Alguns exemplos de tipos morfológicos diferentes, presentes no grupo Cyanobacteria (as seis primeiras imagens foram retiradas de Whitton & Potts, 2000*).*
A-heterocisto. B-acineto.
Da esquerda para a direita e de cima para baixo:
Aphanizomenon sp; Anabaena sp; Anabaena sp; Cylindrospermopsis sp.

microscópio óptico pelas suas maiores dimensões em relação às células vegetativas, pela sua parede celular mais espessa e pelo seu citoplasma que é mais granuloso devido à presença de grânulos de cianoficina *(fig. 1)* (Nichols & Adams, 1982; Wolk, 1982).

A grande diversidade morfológica das cianobactérias, bem como a sua antiguidade e, mais recentemente, o desenvolvimento da biologia molecular, tornam a taxonomia deste grupo bastante complexa. Durante os séculos XIX-XX desenvolveu-se um sistema taxonómico baseado no Código Internacional de Nomenclatura Botânica, denominando estes organismos Cianofíceas (Cyanophyceae). O facto destes organismos serem procariotas levou ao ajustamento da sua classificação, passando a ser utilizado o código Internacional de Nomenclatura Bacteriano, resultando daí a denominação Cianobactérias. Ripka *et al.* (1979) fizeram então a classificação dos principais géneros cianobacterianos, os quais se encontram descritos em anexo (anexo I).

O elevado número de tipos celulares cianobacterianos, associado à sua grande diversidade morfológica e ecológica, tem feito surgir várias propostas de classificação, baseadas em características morfológicas diversas (*e.g.*: tipo de filamentos, presença de células especializadas, plano de divisão celular, mucilagem). Em 1991, Paerl descreveu

Géneros Filamentosos:

diazotróficos com heterocistos	*Anabaena* *Anabaenopsis* *Aphanizomenon* *Calotrix* *Gloeotrichia* *Nodularia* *Nostoc* *Rivularia* *Scytonema* *Tolypotrix*
diazotróficos sem heterocistos	*Lyngbya* *Microcoleus* *Oscillatoria* *Plectonema* *Phormidium*
não diazotróficas	*Artrospira* *Spirulina*

Géneros não-Filamentosos:

coloniais diazotróficos	*Gloecapsa*
coloniais não diazotróficos	*Chroococcus* *Gomphosphaeria* *Microcystys*
unicelulares:	*Synechococcus*

***Figura 2** - Principais géneros cianobacterianos de água doce (adaptado de Paerl, 1991).*

as características dos principais géneros cianobacterianos de água doce, baseando-se na sua morfologia, e principais habitats *(fig. 2)*.

Pode-se considerar esta divisão proposta por Paerl satisfatória para o presente trabalho. No entanto, é de referir também trabalhos mais recentes como dos autores Whitton (1992), Komárek & Agnostidis (1999) e Whitton *et al.* (2000).

Com o desenvolvimento da Biologia Molecular, novas técnicas têm alargado as bases de classificação taxonómica das cianobactérias aos ácidos nucleicos (Rasmussen & Svenning, 1998; Zehr *et al.*, 1998; Fergusson & Saint, 2000; Semenova *et al.*, 2001).

A diversidade taxonómica das cianobactérias é, obviamente, reflexo da sua diversidade morfológica, estrutural e ecológica. A longa história evolutiva destes organismos é causa, ou consequência, da sua elevada adaptabilidade ecológica.

Nos ecossistemas de água doce, a maioria das cianobactérias faz parte do fitoplâncton, são produtores primários, contribuindo assim para a produtividade primária e, no caso das espécies diazotróficas, contribuem para a entrada de azoto no ecossistema.

Em climas temperados como o nosso, verifica-se a seguinte progressão do fitoplâncton: (1) diatomáceas na Primavera; (2) algas verdes no início da estratificação da coluna de água; (3) cianobactérias e dinoflagelados durante o Verão (Oliver & Ganf, 2000). Com o aumento da poluição, tem-se vindo a verificar um aumento de densidade populacional das cianobactérias cada vez mais frequente, em todo o mundo e ao longo do ano. Estes fenómenos têm causado, por vezes, desiquilíbrios ecológicos graves como é o caso das florescências ou "blooms" tóxicos que estão muitas vezes associados a situações de eutrofização das massas de água.

As características fisiológicas das cianobactérias que parecem contribuir para o seu sucesso competitivo em relação a outros fitoplanctontes e consequente formação de florescências, são: a presença de vacúolos gasosos que em algumas espécies traz vantagens ecológicas: redução das perdas de biomassa por sedimentação e regulação da profundidade na coluna de água, optimizando condições de luz e nutrientes; a capacidade de fixação de azoto é uma vantagem, especialmente quando a relacção N:P é baixa; relativamente ao fósforo, em algumas cianobactérias parece haver uma maior capacidade de acumulação de polifosfatos do que a que se verifica nas outras microalgas, permitindo a multiplicação das cianobactérias em situações de baixa concentração de fósforo (Sommer, 1985; Oliver & Ganf, 2000).

O facto das ocorrências das cianobactérias estarem a aumentar, podendo haver libertação de toxinas para os sistemas de água doce, é realmente o ponto que tem vindo a impulsionar todo o interesse nesta problemática. Saber quais as consequências destas ocorrências e como evitá-las, são objectivos propostos pela comunidade científica internacional. Isto está bem explicito na quantidade de trabalhos científicos relacionados com este tema que têm surgido ao longo dos últimos anos (*e.g.* Chorus & Bartram, 1999; Whitton & Potts, 2000; Chorus, 2001).

1.2. Ocorrências cianobacterianas em água doce e suas consequências

Devido à crescente eutrofização dos meios dulciaquícolas, as ocorrências cianobacterianas em rios, albufeiras, lagos e lagoas, aumentou desde os anos 80, estando documentados vários casos de florescências em todo o mundo, incluindo Portugal (*e.g.* Costa & Azevedo, 1994; Vasconcelos, 1994a; Henriksen, 1996). Isto associado ao desenvolvimento científico, contribuiu para uma melhor compreensão das causas e consequências dos florescências de cianobactérias. A palavra inglesa "bloom" (em português: florescência) refere-se às ocorrências de populações fitoplanctónicas em densidades superiores à média em determinado local (*ca.* 20 000 cel./ml em águas de recreio e consumo humano) (Oliver & Ganf, 2000).

Para além das consequências ecológicas e sanitárias, as florescências cianobacterianas podem provocar problemas a nível económico, agrícola e turístico. Estes aspectos são importantes quando se avalia o impacto da crescente ocorrência de cianobactérias em todo o mundo.

Embora estejam descritas ocorrências e florescências de vários géneros de cianobactérias, *Microcystis* tem sido o mais estudado em todo o mundo. Isto poderá ser explicado não só pela sua maior frequência mas também pelo facto da primeira cianotoxina (microcistina) ter sido isolada a partir de uma estirpe de *Microcystis aeruginosa* (Carmichael *et al.*, 1988). Assim, desenvolveram-se técnicas de investigação direccionadas para as microcistinas esquecendo-se um pouco as outras cianotoxinas, como as neurotoxinas produzidas por estirpes fixadoras de azoto, também importantes a nível ecológico e de saúde pública.

Quanto aos géneros responsáveis pelos florescências de água doce, Oliver e Ganf (2000) referem os que apresentam vacúolos gasosos como os principais responsáveis. Esta característica permite-lhes formarem mantos à superfície da água, especialmente em condições meteorológicas calmas. Por vezes estas florescências surgem repentinamente devido à migração em massa da população cianobacteriana para a superfície. Na tabela I estão representados os principais géneros que formam florescências.

Tabela I - Principais géneros cianobacterianos responsáveis por florescências em ambientes de água doce (adaptado de Oliver & Ganf, 2000)

Géneros	*Família*	*Ordem*	*Diazotrofia*
Filamentosos			
Anabaena	Nostocaceae	Nostocales	Sim
Anabaenopsis	Nostocaceae		Sim
Aphanizomenon	Nostocaceae		Sim
Nodularia	Nostocaceae		Sim
Cylindrospermopsis	Nostocaceae		Sim
Gloeotrichia	Rivulariaceae		Sim
Oscillatoria	Oscillatoriaceae	Oscillatoriales	por saber
Spirulina	Oscillatoriaceae		não
Não filamentosos			
Microcystis	Chroococcaceae	Chroococcales	não
Gomphosphaeria	Chroococcaceae		não
Coelosphaerium	Chroococcaceae		não

1.2.1. Consequências ecológicas

As florescências de cianobacterias representam riscos ambientais para os ecossistemas dulciaquícolas, não só pelo facto de formarem elevadas biomassas, ou seja grande concentração de matéria orgânica (produção de amónia e sulfitos), mas também por poderem libertar para o meio metabolitos tóxicos denominados cianotoxinas e lipopolissacarídeos (LPS). Embora os estudos nesta área tenham vindo a aumentar, a importância e o papel ecológico destas toxinas ainda não é bem conhecido (Kaebernick & Neilan, 2001).

Para além da libertação de cianotoxinas, os efeitos nefastos das florescências de cianobactérias são: formação de tapetes na superfície da água, dificultando trocas na interface ar/água, alteração da viscosidade do meio, diminuição da zona eufótica, libertação de odores, alteração do aspecto e do sabor da água e situação de anoxia, devido à morte massiva das cianobactérias.

O efeito das cianotoxinas no biótopo aquático tem sido alvo de alguns estudos. Tal como se verifica para outras substâncias, as cianotoxinas são também bioacumuláveis podendo ser bioamplificadas ao longo da cadeia alimentar. Este processo ficou demonstrado em trabalhos laboratoriais efectuados com moluscos e lagostins, onde se verificou a acumulação de cianotoxinas (microcistinas e nodularinas) depois de alimentar os animais com estirpes tóxicas de cianobactérias (Eriksson *et al.*, 1989; Lindholm *et al.*, 1989; Falconer, *et al.*, 1992; Vasconcelos, 1995, 1999; Amorim & Vasconcelos, 1999). O facto das cianotoxinas serem acumuladas nestes organismos sem lhes provocarem

efeitos letais, torna-os vectores de intoxicação para os níveis tróficos superiores, incluindo o Homem.

As cianobactérias também são reponsáveis por alterações nas populações de peixes, tendo-se registado casos de morte em massa aquando o aparecimento de florescências (Codd & Roberts, 1991; Oliveira, 1991). Na maior parte das vezes é difícil saber qual a razão dessas mortandades de peixes: intoxicação por cianotoxinas, por amónia ou morte por asfixia (anoxia). Estudos laboratoriais de vários autores demonstram que os peixes manifestam sintomas de intoxicação por microcistinas semelhantes àqueles manifestados nos mamíferos: alterações histológicas do tracto gastrointestinal e das brânquias e necrose hepática e renal (Tencalla *et al.*, 1994; Råbergh *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1993; Carbis *et al.*, 1997). Está também demonstrado que a sensibilidade dos peixes e anfíbios em estado de desenvolvimento inicial é superior à dos organismos juvenis e adultos, podendo assim afectar a dinâmica populacional (Oberemm, 2001).

Relativamente aos níveis tróficos mais baixos, existem vários estudos laboratoriais com zooplanctontes (e.g. *Daphnia spp*) que revelam dados pouco consistentes em que a sensibilidade às cianotoxinas difere consoante o género, a espécie e até mesmo o clone (Sivonen & Jones, 1999). A diferença na resposta à contaminação cianobacteriana dentro da mesma comunidade, poderá levar a uma pressão selectiva em determinados grupos de zooplancton, alterando assim a estrutura da comunidade em questão.

O facto dos animais superiores como aves e mamíferos não serem capazes de distinguir uma florescência tóxica, torna-os suseptíveis a intoxicações por ingestão e banho em águas contaminadas. Foram já publicados casos de morte animal por intoxicação cianobacteriana, alguns dos quais foram enumerados por Kuiper-Goodman *et al.* (1999) e Falconer (2001) *(tab. II)*.

Beasley e outros autores (1989) descrevem num artigo os aspectos clínicos importantes que distinguem uma cianotoxicose em animais, com o intuito de alertar médicos veterinários para estas ocorrências.

As cianotoxinas provocam efeitos adversos na saúde humana, os quais estão evidenciados em estudos epidemiológicos e toxicológicos. Estes efeitos têm repercussões no estado de saúde das populações e consequentemente, nos recursos dispendidos com a investigação, prevenção e tratamento de casos de intoxicações. Para além do risco de consumo de alimentos contaminados, o maior risco de intoxicação humana prende-se com as águas para consumo, uma vez que na maioria das vezes a água é captada superficialmente em sistemas de albufeiras, locais estes com características propícias para o desenvolvimento de cianobactérias. Caso não haja sistemas de prevenção e detecção de cianotoxinas, as águas contaminadas podem levar a uma exposição crónica das populações consumidoras que poderão sofrer efeitos crónicos como é o caso do tumor hepático (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Tabela II - *Exemplos de morte animal por intoxicação com cianotoxinas (adaptado de Kuiper-Goodman et al., 1999)*

País	Vítima	Patologia	Cianobactéria responsável	Referência bibliográfica
Argentina	gado	hepatotoxicidade	*Microcystis aeruginosa*	Odriozola *et al.*, 1984
Austrália	gado	hepatotoxicidade	*Microcystis aeruginosa*	Jackson *et al.*, 1984
Austrália	gado	neurotoxicidade	*Anabaena circinalis*	Negri *et al.*, 1995
Canadá	gado	neurotoxicidade	*Anabaena flos-aquae*	Carmichael & Gorham, 1978
Canadá	aves aquáticas	neurotoxicidade	*Anabaena flos-aquae*	Pybus & Hobson, 1986
Finlândia	cães	hepatotoxicidade	*Nodularia spumigena*	Pearson *et al.*, 1984
Finlândia	aves aquáticas, peixes, rato almiscarado	hepatotoxicidade	*Planktothrix agardhii*	Eriksson *et al.*, 1986
Noruega	gado	hepatotoxicidade	*Microcystis aeruginosa*	Skulberg, 1979
Inglaterra	cães	hepatotoxicidade	*Microcystis aeruginosa*	Pearson *et al.*, 1990
Escócia	cães	neurotoxicidade	*Oscillatoria spp*	Gunn *et al.*, 1992
Escócia	peixes	danos na brânquias	*Microcystis aeruginosa*	Bury *et al.*, 1995
E.U.A.	cães	neurotoxicidade	*Anabaena flos-aquae*	Mahmood *et al.*, 1988

1.2.2. Consequências na saúde pública

Alguns casos históricos, entre muitos outros, evidenciam o risco que as cianotoxinas representam para a saúde humana:

Na Austrália, em 1979, 140 crianças e 10 adultos tiveram de ser hospitalizados por ingestão de água contaminada com *Cylindrospermopsis raciborskii,* tendo manifestado hepatoenterite seguida de fortes diarreias sanguinolentas (Byth, 1980).

A elevada taxa de hepatocarcinoma em certas regiões da China, está relacionada com águas de consumo que apresentam contaminação cianobacteriana (Yu, 1995).

No Brazil (Caruaru), em 1996, 117 pessoas hemodializadas sofreram de cianointoxicação, das quais 49 morreram. A clínica de hemodiálise abastecia-se de água proveniente de um sistema com elevadas concentrações de cianobactérias (*Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*). Os doentes apresentaram os seguintes sintomas: distúrbios da visão, náusea e vómitos, hepatomegália com dores fortes e enfraquecimento muscular (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Após as evidências científicas sobre a toxicidade da cianotoxina microcistina-LR, a Organização Internacional de Saúde (WHO), decidiu emitir um valor guia para a concentração de microcistina-LR na água de consumo de 1 µg/l (Gupta, 1998).

A preocupação quanto às consequências das ocorrências cianobacterianas na saúde pública levou também à formulação de graus de risco para águas de recreio. Na tabela que se segue *(tab. III)* estão definidos três graus de risco para a saúde humana, em águas de recreio.

Tabela III *- Graus de risco para a saúde em águas de recreio com cianobactérias (Falconer et al., 1999).*

situação de risco	**nº cel. cianobacterianas / ml**	**µg/L de clorofila a, em caso de florescência cianobacteriana**	**riscos para saúde**
baixo risco	20.000	10	sintomas alérgicos e irritativos, baixa probabilidade de intoxicação por cianotoxina
risco moderado	100.000	50	sintomas irritativos, perigo de doença prolongada, a hipótese de formação de mantos de cianobactérias pode aumentar a quantidade de cianotoxina 1000 ou mais vezes nesses locais, agravando os efeitos
elevado risco	100.000.000	50.000	hipótese de intoxicação aguda, sintomas irritativos, perigo de doença prolongada

1.3. Cianotoxinas

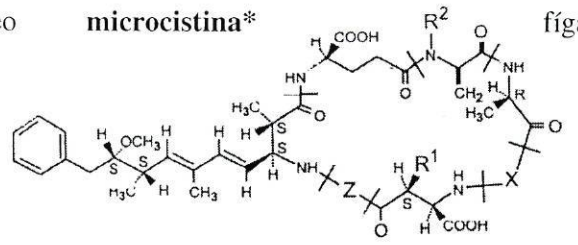
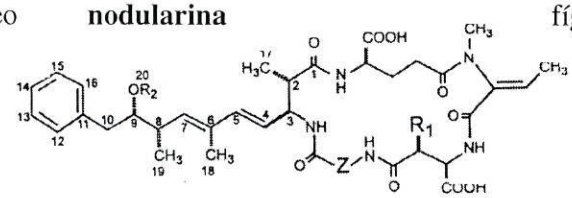
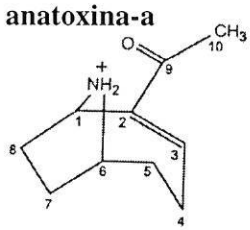
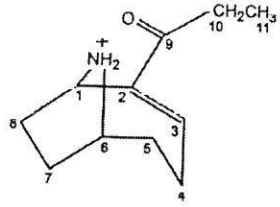
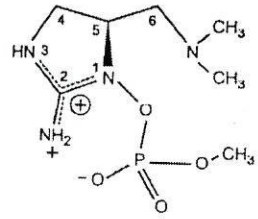
As toxinas de origem bacteriana, onde se inclui as cianotoxinas, são já conhecidas desde há mais de 100 anos. Dividem-se em duas classes: toxinas bacterianas proteicas e lipopolissacarídeos (LPS), estas últimas estão presentes na membrana celular das bactérias Gram-negativas, incluindo as cianobactérias (Alouf, 2000). O primeiro caso documentado de intoxicação por cianotoxinas, foi descrito por Francis (1878) na revista Nature ao referir a morte de gado por ingestão de água contaminada com *Nodularia*. Apenas a partir da década de 80 do século passado, quando as florescências cianobacterianas começaram a alastrar-se pelo mundo, é que se ficou a conhecer melhor os aspectos relacionados com as cianotoxicoses. A maior parte da investigação debruçou-se sobre a cianotoxina microcistina-LR, por esta ser a mais frequente e, cada vez mais, a mais estudada. No entanto existem já muitos trabalhos que identificam várias outras cianotoxinas relatando os seus efeitos e as estruturas químicas. Os efeitos do LPS cianobacteriano tem sido um pouco esquecido, talvez velado pela acção aguda das outras cianotoxinas.

1.3.1. Tipos de cianotoxinas produzidas por cianobactérias diazotróficas

As principais descobertas sobre a existência, efeitos e ocorrências das cianotoxinas aconteceram nos últimos vinte anos. Nem todos os géneros de cianobactérias produzem cianotoxinas, e mesmos dentro de uma mesma espécie nem todas as estirpes são tóxicas. Por vezes podemos encontrar na mesma florescência estirpes tóxicas cohabitando com outras não tóxicas. De facto ainda não se sabe quais os factores que levam determinada estirpe a produzir ou não cianotoxinas. A mesma estirpe poderá produzir mais do que uma variante de determinada cianotoxina. Todas estas dúvidas representam a falta de conhecimento que temos sobre cianotoxinas e as suas ocorrências na Natureza.

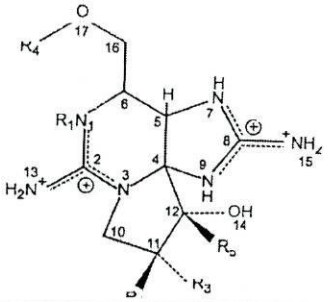
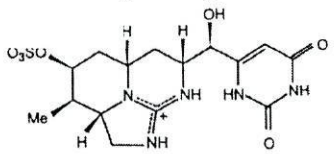
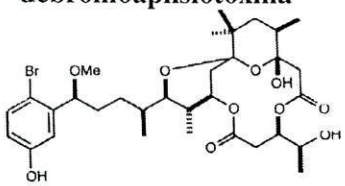
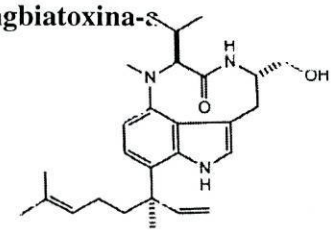
À medida que vão surgindo estirpes tóxicas caracterizam-se as toxinas tendo sido possível, até hoje, dividi-las em 3 grandes grupos: causadoras de efeitos agudos e letais – neurotoxinas e hepatotoxinas, com menor letalidade, com efeitos mais selectivos – citotoxinas e com propriedades irritantes, o LPS. Na tabela IV estão representadas as características das principais cianotoxinas aquáticas.

Tabela IV *- [continua na página seguinte]*
Descrição dos diversos tipos de cianotoxinas aquáticas (Sivonen & Jones, 1999).
Os géneros sublinhados são diazotróficos.

tipo de toxina	características químicas	toxina	orgãos alvo nos mamíferos	géneros aquáticos produtores
hepatotoxina	heptapeptídeo cíclico maioria hidrossolúveis; ca. 60 variantes	**microcistina*** 	fígado	*Microcystis* *Planktothrix* *Nostoc* *Anabaena* *Anabaenopsis*
hepatotoxina	pentapeptídeo cíclico hidrossolúveis; 2 variantes	**nodularina** 	fígado	*Nodularia*
neurotoxina	alcaloide	**anatoxina-a** 	sinapses	*Anabaena* *Planktothrix* *Aphanizomenon*
neurotoxina	alcaloide	**homoanatoxina-a** 	sinapses	*Planktothrix*
neurotoxina	organofosforado	**anatoxina-a(S)** 	sinapses	*Anabaena*

*Relativamente às várias microcistinas, elas diferem entre si em dois ou mais aminoácidos variáveis que estão mencionados no seu nome (*e.g* microcistina-LR, apresenta Leucina e Arginina).

Tabela IV *- [continuação da página anterior]*
Descrição dos diversos tipos de cianotoxinas aquáticas (Sivonen & Jones, 1999).
Os géneros sublinhados são diazotróficos.

tipo de toxina	características químicas	toxina	orgãos alvo nos mamíferos	géneros aquáticos produtores
neurotoxina	alcaloide 16 variantes	**saxitoxina (PSP)** 	axónios	*Aphanizomenon* *Anabaena* *Cylindrospermopsis* *Lyngbya*
citotoxina**	alcaloide	**cilindrospermopsina** 	essencialmente fígado, mas também rim, baço, timo, coração	*Cylindrospermopsis* *Aphanizomenon* *Umezakia*
citotoxina	alcaloide	**debromoaplisiotoxina** 	pele trato intestinal	*Schisothrix* *Planktothrix* *Lyngbya*
citotoxina	alcaloide	**lingbiatoxina-a** 	pele trato intestinal	*Lyngbya*
irritante	lipopolissacarideos (LPS) muitas variantes	**LPS**	potencialmente irritaveis: afecta qualquer tecido exposto	todos

**Aqui coloca-se a questão por que não se denomina a cilindrospermopsina de hepatotoxina, pois esta afecta essencialmente o fígado (Prof. Vitor Vasconcelos, com.pess.)

1.3.2. Modo de acção das cianotoxinas em animais

A principal via de intoxicação por cianotoxinas é a ingestão de água ou de alimentos com toxinas ou com células cianobacterianas tóxicas. Em águas de recreio, as cianotoxinas poderão afectar o organismo também por contacto directo com a pele ou por inalação. O perigo maior de intoxicação reside no facto de poderem existir concentrações tóxicas de cianotoxinas sem, no entanto, haver células na água. Isto porque após a morte celular (que poderá ser natural ou após tratamento) dá-se a libertação da toxina que estava contida na célula viva. Quando isto acontece após um "bloom" tóxico poderão encontrar-se concentrações de toxina muito elevadas na água.

Relativamente ao modo de acção, as cianotoxinas podem apresentar acções agudas ou crónicas, conforme o grau e o tempo de exposição. De todas as cianotoxinas, apenas os polipeptídeos cíclicos parecem exercer efeitos crónicos, nomeadamente o crescimento de tumores hepáticos e outros. Os seus efeitos agudos incluem morte por hemorragia e insuficiência hepática (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Esta acção crónica cancerígena contribuiu para o aumento dos estudos sobre microcistinas e nodularinas, tendo-se, tal como foi referido anteriormente, estabelecido um valor guia para a concentração máxima de cianotoxinas em águas para consumo humano (1 µg/l) (Gupta, 1998).

O que se sabe hoje sobre o modo de acção das cianotoxinas em animais, resultou essencialmente de estudos efectuados em laboratório onde se testou a toxicidade por via intraperitoneal e intravenosa. Os efeitos tóxicos revelados acabaram por ser inferiores àqueles que aconteceriam caso a administração fosse via oral ou dérmica. O orgão alvo das microcistinas e nodularinas nos animais é o fígado. A maioria das hepatotoxinas, incluindo a microcistina-LR, é hidrofílica, não atravessando as membranas celulares, sendo assim transportadas para o fígado através de transportadores iónicos multiespecíficos presentes nos canais biliares e no intestino delgado (Runnegar *et al.*, 1991). Aí exercem acção sobre a estrura dos hepatócitos atrofiando-os, impedindo o contacto entre eles e provocando hemorragias que fazem aumentar o peso de fígado e que poderão ser fatais. Este processo é irreversível pelo que, mesmo não havendo letalidade, as lesões persistem verificando-se disfunção hepática. A grande chamada de sangue ao fígado provoca falhas cardíacas, daí a letalidade, por vezes tão rápida (*e.g.* 90 min após injecção intraperitonial de microcistina -LR (100 µg/Kg) em ratinhos (Premazzi & Volterra, 1993) e 20 min após injecção i.p. de uma estirpe de *Microcystis* (Vasconcelos, 1994 a). O atrofiamento do citoesqueleto dos hepatócitos, dá-se devido à acção inibitória que as microcistinas e as nodularinas exercem nas fosfatases proteicas (enzimas reguladoras da síntese proteica), essenciais à sua manutenção (Carmichael, 1994). São estes mecanismos de interferência com as fosfatases proteicas que poderão explicar a carcinogénese atribuida às microcistinas por Ito *et al.*, (1997).

Algumas microcistinas são menos hidrofílicas do que a LR, sendo capazes de atravessar as membranas por difusão. A DL50 via intraperitonial da microcistina-LR e outras (LA, YR e YM), em ratinhos, varia entre 25 e 150 µg/Kg de peso corporal, mas a da microcistina-RR é 10 vezes superior (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

As neurotoxinas actuam no sistema nervoso, acabando por causar morte por paralisia dos músculos respiratórios. A saxitoxina bloqueia o sistema de transmissão de

impulsos nervosos entre os neurónios, impedindo a passagem do impulso para o neurónio seguinte. Os sintomas começam por perda de sensibilidade nas extremidades e lábios dormentes, acabando por se dar a morte quando a dose é suficiente. A DL50 em ratinhos varia consoante a via de administração da saxitoxina: 3,4 μg/Kg via intravenosa, a 263 μg/Kg de peso corporal, via oral (Wiberg & Stephenson, 1960).

As anatoxinas sobre-estimulam os músculos, nomeadamente os respiratórios, que acabam por paralisar por cansaço. Isto porque a anatoxina compete para receptores pré -sinápticos da acetilcolina (responsáveis pela interrupção do estímulo nervoso, impedindo a sobre-estimulação), provocando despolarização duradoura que resulta em bloqueio da ligação neuro-muscular e consequente relaxamentl (Carmichael, 1994). Em ratinhos, a DL50 via i.p. da anatoxina-a é 375 μg/Kg de peso corporal (Fitzgeorge *et al.*, 1994); via i.v. é inferior a 100 μg/Kg de peso corporal (Fawell & James, 1994). Para a anatoxina-a(s) a DL50 via i.p em ratinhos é 20 μg/Kg de peso corporal e o tempo de sobrevivência é de 4-7 min (Hyde & Carmichael, 1991; Premazzi, & Volterra, 1993). Esta anatoxina-a(s) tem uma estrutura química diferente da anatoxina-a e apresenta uma sintomatologia que difere essencialmente no facto de provocar salivação (daí o sufixo (s) no nome).

Cylindrospermopsis é o género cianobacteriano tóxico descoberto mais recentemente produtor da cianotoxina cilindrospermopsina (Li *et al.*, 2001). Trata-se de uma cianotoxina com DL50 para ratinhos após injecção i.p. entre 0,2 e 2,1 mg/Kg, conforme o tempo de exposição (Ohtani *et al.*, 1992). A sua acção resulta da inibição da síntese proteica causando alterações citológicas essencialmente no fígado, mas também no baço, rins, pulmões e coração (Hawkins *et al.*, 1997; Runnegar *et al.*, 1995). Falconer & Humpage (2001) encontraram evidências experimentais *in vivo* que sugerem um efeito crónico carcinogénico da cilindrospermopsina.

Relativamente ao LPS cianobacteriano sabe-se que tem uma toxicidade aguda 10 vezes inferior ao das outras bactérias Gram negativas como, por exemplo, a *Salmonella sp.* (Keevil, 1991). O LPS produzido por bactérias Gram negativas, tem sido alvo de estudos na área das ciências médicas, nomeadamente imunologia e sabe-se que induz intensa actividade biológica resultando daí uma resposta inflamatória do organismo, especialmente no fígado, choque séptico e morte (Castro, 1997).

1.3.3. Métodos de detecção e análise das cianotoxinas

Quando estamos na presença de uma florescência de cianobacterias é necessário determinar rápidamente a sua toxicidade para proceder às medidas necessárias de protecção da saúde pública. Reduzindo o tamanho das amostras de água utilizadas, todo o trabalho de monitorização será facilitado quer no transporte como em material, número de operadores e tempo de amostragem. É nesta linha que se têm desenvolvido as técnicas de detecção de cianotoxinas, por um lado; por outro, têm-se desenvolvido técnicas que tentam descobrir a todo o custo a toxicologia das cianotoxinas. São estes dois sentidos de investigação que nos últimos 20 anos têm feito surgir uma vasta gama de técnicas nesta área: bioensaios, citotoxidade *in vitro*, cromatografia, espectrometria de

massa, ensaios enzimáticos e imunológicos. De todas as cianotoxinas, as microcistinas são as que têm métodos de quantificação e detecção mais desenvolvidos.

Embora os bioensaios com ratinhos não sejam muito sensíveis nem muito específicos, permitem obter resultados rápidos sobre a presença de cianotoxinas, especialmente no caso das neurotóxicas que apresentam uma sintomatologia muito característica. Por outro lado, a acção lenta das microcistinas e nodularinas pode ser mascarada pela rápida acção das neurotoxinas (Meriluoto *et al.*, 1996). Estes bioensaios são reconhecidos para a determinação de doses toxicológicas (*e.g.* DL50) e têm sido a base das descobertas sobre efeitos das cianotoxinas em mamíferos (Carmichael & Bent, 1981; Falconer & Humepage, 2001). Com o desenvolvimento da bioética tornou-se mais difícil obter animais para ensaios, pelo que se tem procurado bioensaios alternativos com invertebrados.

Artemia é talvez o bioensaio com invertebrados mais conhecido em ensaios de toxicidade das cianobactérias. O seu manuseamento é facil e pouco dispendioso. No entanto, embora a *Artemia* seja sensível às hepatotoxinas e à anatoxina-a, essa sensibilidade parece não ser concordante com as concentrações de cianotoxinas aplicadas (Harada *et al.*, 1999). Utiliza-se também várias espécies de *Daphnia* para a determinação das cianotoxinas que se têm mostrado sensíveis às microcistinas (Rohrlack, com. pess.). Ao contrário do que acontece com a *Artemia*, as *Daphnia* requerem muito trabalho laboratorial.

Na tentativa de substituir os bioensaios com ratinhos, surgiram ensaios *in vitro* com células de mamíferos. Os primeiros ensaios foram efectuados por Aune & Berg (1986) que isolaram hepatócitos de rato para medir a inibição de enzimas hepáticas após a sua incubação com cianobactérias. Os resultados foram promissores e, mais tarde, com este método foi possível obter resultdos de CL50 para vários tipos de microcistina que eram concordantes com os resultados *in vivo* (Heinze, 1996).

Carmichael & Bent (1981) utilizaram células sanguíneas humanas e de ratinhos para detectar microcistinas e anatoxinas, com base na propriedade hemoaglutinadora dessas cianotoxinas. Os ensaios mostraram de facto capacidade de aglutinação dos eritrócitos pelas cianotoxinas mas não permitiram quantificá-las.

Outros testes foram desenvolvidos para a detecção de saxitoxinas, utilizando linhas de células nervosas, existindo hoje kits comerciais para a monitorização de neurotoxinas (Harada *et al.*, 1999).

O facto das células cianobacterianas poderem ter várias substâncias citotóxicas pode levar a resultados falsos positivos quanto à presença de cianotoxinas. Isto tem contribuido para a ambiguidade existente nos ensaios citológicos de detecção de cianotoxinas (Dow & Swoboda, 2001).

A análise química com cromatografia de fase líquida de alta resolução com detector UV (HPLC-UV), é hoje largamente utilizada para a detecção, quantificação, purificação e isolamento de algumas cianotoxinas (*e.g.* Meriluoto *et al.*, 2000; Dahlmann *et al.*, 2001). Nesta técnica faz-se passar a amostra por uma coluna de sílica - C18, (fase reversa) com um gradiente de acetonitrilo e água, ambos com ácido trifluoracético (fase móvel). Consoante a polaridade, as microcistinas vão sendo retidas durante mais ou menos tempo (tempo de retenção) neste sistema. À saída da coluna está um detector

fotodíodo (PDA) que capta a absorção pelas substâncias que vão saindo. As microcistinas caracterizam-se por ter um espectro de absorção máximo a 238 nm (banda UV) devido ao resíduo ADDA. Embora seja uma metodologia semi-selectiva e com um grau de detecção bastante bom, na ordem das nanogramas (James *et al.*, 1998; Dahlmann *et al.*, 2001), requer instrumentação especializada, cuidados na preparação das amostras e a comparação com padrões de toxina (existem apenas 3 padrões no mercado: microcistina-LR, -YR e -RR (Rivasseau *et al.*, 1999). Esta técnica também é utilizada para as outras cianotoxinas alterando-se as fases e os comprimentos de onda consoante cada caso (*e.g.* para a antoxina-a a detecção efectua-se aos 227 nm).

A técnica HPLC associada a outras, tem permitido aumentar a sua sensibilidade. É o caso de HPLC-MS, que associou ao HPLC a espectrometria de massa (MS) para a análise de cilindrospermopsina, baixando o seu limite de detecção cerca de 5 vezes (Harada *et al.*, 1988; Dahlmann *et al.*, 2001).

A técnica mais recente para a detecção das cianotoxinas polipeptídicas é MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization-time flight mass spectroscopy). Com esta técnica obtêm-se pesos moleculares dos polipéptidos cianobacterianos a partir de células intactas em minutos. As cianotoxinas podem ser identificadas por comparação com padrões, mas também são detectados novos polipéptidos que poderão ser posteriormente caracterizados na mesma análise pela técnica Post-Source-Decay (PSD) (Erhard *et al.*, 2001). Contrapondo com as técnicas de HPLC, MALDI-TOF-MS, é mais rápida, não requer preparação da amostra e não necessita de cultura prévia das cianobactérias: uma só célula poderá ser suficiente para a caracterização do seu perfil polipeptídico (Erhard *et al.*, 2001).

O facto das cianotoxinas alterarem o metabolismo enzimático tem sido aproveitado para a sua identificação. As microcistinas e nodularinas inibem as fosfatases proteícas, o que poderá ser detectado e quantificado através de uma reacção colorimétrica ou radioactiva. Existem já formas comerciais deste ensaio de fácil manuseamento e rápida execução. Rivasseau *et al.* (1999) desenvolveram um ensaio deste tipo em que foi possível fazer quantificações colorimétricas de microcistina na ordem dos microgramas (0,2 - 0,8 µg/l). No entanto, para resultados positivos era necessário confirmar a presença da microcistina com outros métodos. O método de quantificação radioactivo é mais sensível do que o colorimétrico mas exige condições laboratoriais mais específicas (radioactividade) (Meriluoto *et al.*, 2000).

Para An & Carmichael (1994) o ensaio da inibição das fosfatases proteicas na determinação de nodularinas e microcistinas poderá ser complementado com o ensaio imunológico ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) utilizando anticorpos que foram desenvolvidos contra a microcistina-LR (Chu *et al.*, 1989).

A primeira técnica imunológica ELISA para microcistinas e nodularinas, foi desenvolvida por Chu *et al.* (1989). Hoje existem kits comerciais que são largamente utilizados em laboratórios de monitorização de microcistinas e nodularinas na água (EnviroGard® Microcystins Plate Kit e Envirologix). Este ensaio ELISA aproveita a especificidade dos anticorpos de coelho contra microcistina-LR, para detectar de forma selectiva a concentração de moléculas de microcistina-LR, -RR, -YR e nodularinas. A especificidade do anticorpo para estas cianotoxinas deve-se essencialmente aos 2

aminoácidos nelas presentes: Adda e arginina (An & Carmichael, 1994). Através de padrões de microcistina com concentrações conhecidas e de uma reacção colorimétrica anticorpo/antigene, faz-se-se uma recta padrão para determinar a concentração de microcistinas na amostra. O kit apresenta uma gama de sensibilidade entre 0,1 e 1,6 μg/l.

1.4. Cianobactérias tóxicas em Portugal

Os primeiros estudos sobre cianobactérias (Cianófitas) foram levados a cabo pelo naturalista Joaquim Sampaio do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio". Em várias publicações nacionais descreveu a sua morfologia, a sua proveniência e eventuais citações anteriores sobre as cianobactérias encontradas em Portugal (Sampaio, 1933). Destas citações a mais antiga data de 1880 (Henriques, J.). Sampaio (1933) apenas descreve alguns géneros cianobacterianos mas não se lê qualquer referência à sua toxicidade. Segundo Vasconcelos (2001) a primeira publicação referindo cianobactérias potencialmente tóxicas foi da responsabilidade de Frade (1951).

1.4.1. Ocorrências tóxicas e estudo das cianotoxinas em Portugal

Embora tenham sido relatadas espécies cianobacterianas tóxicas em Portugal desde 1933, não havia ainda conhecimentos quanto à sua toxicidade. Foi apenas a partir de 1984 que Oliveira associou a ocorrência de florescências de cianobactérias com episódios de toxicidade em peixes (Oliveira, 1984 e 1987) e em humanos (Oliveira 1991), em albufeiras no Sul de Portugal, incluindo a do Maranhão. As espécies reponsáveis por estes episódios no Maranhão, foram *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* e *Aphanizomenon flos-aquae*; estas duas últimas são diazotróficas.

Entre 1989 e 1992 Vasconcelos recolheu amostras de água para o estudo de florescências e de estirpes de cianobactérias tóxicas dulciaquícolas em Portugal. 18 das 30 florescências amostradas revelaram-se hepatotóxicas por bioensaio em ratinhos. Embora *Microcystis aeruginosa* estivesse presente em todas as florescências, apenas foi dominante em 22. Foram registadas 3 espécies diazotróficas (*Anabaena flos-aquae, Anabena scheremetievi e Aphanizomenon flos-aquae*), tendo sido *Anabena flos-aquae* a espécie dominante em 5 das 18 florescências com toxicidade. Os valores de DL50 variaram entre 20 e 700 mg/Kg de peso corporal (Vasconcelos, 1994b).

Em 1993 Vasconcelos, publicou um estudo revelando a toxicidade de uma florescência de *Microcystis aeruginosa* colhido na albufeira de Crestuma (rio Douro, a Norte de Portugal). A toxicidade desta florescência foi confirmada por bioensaio em ratinhos, tendo-se determinado por injecção i.p. uma DL50 de *ca.* de 30 mg/Kg de peso corporal, e por isolamento de microcistina -LR com HPLC. Desde então já mais trabalhos foram publicados, revelando hepatotoxicidade de *Microcystis aeruginosa* de águas portuguesas (Pereira, 1995; Vasconcelos *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 1996; Vasconcelos, 1999).

Em 1994, Ferreira avaliou a toxicidade de duas estirpes cianobacterianas isoladas em laboratório (*Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*) provenientes da albufeira de Crestuma. *M. aeruginosa* revelou DL50 entre 15 e 25 mg/Kg de peso corporal e *A. flos-aquae* neurotoxicidade letal em 8-15 min.

Em 2000 publicou-se o primeiro artigo onde se isolaram por HPLC–MS cinco variantes de neurotoxina do grupo das saxitoxinas produzidas por *Aphanizomenon flos-aquae* cultivada em laboratório (proveniente da albufeira de Montargil no centro de

Portugal) (Pereira *et al.*, 2000). Ferreira *et al.* (2001) publicaram também um estudo aplicando HPLC mostrando a produção de saxitoxinas e compostos análogos por *Aphanizomenon flos-aquae* isolada a partir de florescências na albufeira de Crestuma.

Nota-se aqui, exceptuando os dois últimos casos acima referidos, que a maior parte dos estudos em Portugal tem recaído sobre hepatotoxicidade e *Microcystis aeruginosa*, deixando-se de lado outros géneros nomeadamente *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Anabaena* (diazotróficos) e outras cianotoxinas. Dados não publicados apontam ocorrências de outras cianobactérias que não *Microcystis* mas sem ser referido qual a sua toxicidade. Estes factos mostram a necessidade de alargar o conhecimento nesta área de estudo, evitando riscos para a saúde pública, para o ambiente e podendo contribuir para um melhor conhecimento da Ecotoxicologia.

1.5. Objectivo deste trabalho

Estudo da toxicidade de estirpes cianobacterianas portuguesas provenientes da barragem do Maranhão a Sul de Portugal, utilizada para aproveitamento hidroeléctrico, rega, desportos náuticos e pesca. Estudo de diferentes estirpes de água doce, fixadoras de azoto (diazotróficas), isoladas e cultivadas em laboratório. Caracterização morfológica das estirpes isoladas. Avaliação da produção de cianotoxinas, em cultura, comparando os seguintes métodos de detecção: ELISA, HPLC, MALDI e bioensaios com ratinhos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

As estirpes cianobacterianas deste trabalho, foram isoladas a partir de amostras recolhidas na albufeira do Maranhão, a Sul de Portugal, distrito de Portalegre - 39° 0' 48" N, 7° 59' 20"W. Trata-se de uma albufeira para aproveitamento hidroeléctrico, rega agrícola e utilização piscícola e balnear; está interdita para utilização balnear desde 1999, pelo INAG devido à elevada concentração de coliformes totais e fecais. No entanto a utilização para desportos náuticos é elevada, chamando muitoas pessoas para o local.

A colheita de água para este trabalho, ocorreu no dia 6 de Julho de 2000, em dois pontos da albufeira: Benavila (B) e Clube Náutico (CN) *(fig. 3 e tab. V)*. As amostras foram depois enviadas para o laboratório onde foram imediatamente sujeitas a observação microscópica para se proceder ao isolamento das estirpes cianobacterianas.

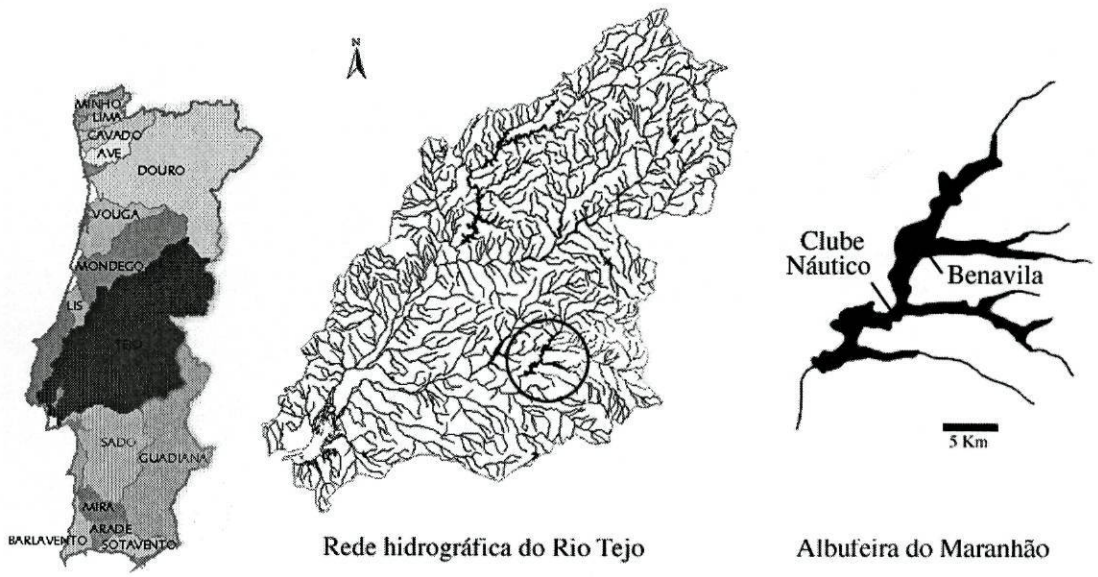


***Figura 3** - Localização geográfica da Albufeira do Maranhão. Referência aos pontos de amostragem: Clube Náutico e Benavila*

Tabela V - Características da Barragem do Maranhão

Albufeira do Maranhão (concelho de Aviz, distrito Portalegre)

Tipo de aproveitamento	hidroeléctrico, rega agrícola, balnear, náutico e piscícola (interdito para banhos desde 1999, pelo INAG)
Bacia hidrográfica principal	Tejo
Linha de água	Ribeira de Seda
Tipo de barragem	Terra (fundo em xisto e grauvaque)
Altura da barragem	55 m
*Prof. média	11 m
*Comprimento	30 Km
Área	1960 ha
Volume	592 000 m^3
1° ano de funcionamento	1957

*(LNEC, 1992 em (www.inag.pt); * Monteiro, 1988)*

2.2. Isolamento e cultivo das cianobactérias

O isolamento das estirpes foi feito ao microscópio óptico (Leica DMLB) com uma ampliação de 40 x. Utilizando uma pipeta de Pasteur estirada à chama, transferiu-se os tricomas das estirpes a isolar, sucessivamente, através de 3 a 4 gotas de meio de cultura Z8 esterilizado (Kotai,1972). Este procedimento teve como objectivo eliminar possíveis contaminantes que estivessem eventualmente associados aos tricomas, de modo a obterem-se culturas puras de cada estirpe. Finalmente, a última gota, contendo apenas o tricoma a cultivar, foi inoculada em cerca de 5 ml de meio Z8, com e sem azoto, em tubos de poliestireno de 10 ml fechados. Estes tubos foram incubados na sala de culturas (18 ±1 °C, fotoperíodo de 14 h de luz com 10 µmol.m2.s-1) até ser visível, a olho nu, o crescimento da cultura (15 dias a 2 meses). Após este período, repicaram-se as culturas para volumes de meio sucessivamente maiores: 40 ml, 1 L e 4 L, com intervalos de 15 dias a 1 mês.

Quando a massa cianobacteriana cultivada estava numa fase de crescimento máximo (cor verde/azulada intensa), guardaram-se 40 ml de cultura fixada em lugol (*ca.* 4%) para identificação taxonómica e colheram-se as restantes células por centrifugação (10174 g, 4 a 10 min). Imediatamente a seguir, conservaram-se as células a –22 °C até à sua liofilização.

2.3. Classificação taxonómica das estirpes isoladas

As amostras das culturas previamente fixadas com lugol, foram observadas ao microscópio óptico (Leica) acoplado ao sistema de análise de imagem LEICA QWIN version 1.

A classificação taxonómica foi baseada em Baker (1991), tentando-se sempre identificar até à espécie. Quando tal não foi possível, classificou-se apenas até ao género.

Para além da observação dos aspectos morfológicos, foi também possível obter dados morfométricos de 12 estirpes. Para cada estirpe, mediu-se o comprimento e a largura de 60 células vegetativas e, quando presentes, de 30 heterocistos e 30 acinetos. Determinaram-se as médias das várias medições e realizou-se o teste de normalidade K-S Lilliefors, utilizando o programa informático *Statistica for Windows (95-97).*

2.4. Estudo da toxicidade das estirpes cultivadas

Para a detecção de toxinas nas estirpes isoladas, utilizaram-se várias metodologias, mencionadas na tabela VI.

Tabela VI *- Enumeração dos vários métodos de detecção de toxinas, utilizados para cada estirpe.*

	estirpe											
metodologia	*J1*	*J4*	*J5*	*J15*	*J19*	*J21*	*J23*	*J24*	*J27*	*J34*	*J39*	*J40*
ELISA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HPLC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MALDI-TOF	x	x		x		x	x	x				
BIOENSAIO	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

2.4.1. ELISA

O ensaio ELISA foi realizado em 12 das estirpes de cianobactérias isoladas e cultivadas em laboratório. Utilizaram-se kites comerciais para detecção de microcistinas: Strategic Diagnostics Inc., EnviroGard® Microcystins Plate Kit, 75400 (EMPK). O EMPK foi desenvolvido para detectar microcistinas na água. Trata-se de um método rápido com um intervalo de detecção entre 0,1 e 1,6 µg de microcistina por litro.

No presente trabalho, em vez de amostras de água utilizaram-se células cianobacterianas liofilizadas, tendo-se que efectuar extractos celulares, os quais foram depois submetidos ao ELISA.

Obtenção dos extractos cianobacterianos para ELISA:

Pesou-se cerca de 10 mg das células liofilizadas de cada estirpe e diluiu-se num mililitro de água ultrapura (MiliQ). Seguidamente submeteram-se estas suspensões a ultrasons (60 Hz durante 5 min), em banho gelado para evitar a destruição das toxinas

por sobreaquecimento. Para confirmar o rebentamento total das células, fez-se uma rápida observação microscópica das suspensões celulares. Estas foram mantidas no frigorífico 24 h, de modo a garantir a total extracção das cianotoxinas. Os ensaios ELISA foram então efectuados após filtração dos extractos por filtro de seringa (0.2 μm, FP 030/3), removendo restos de células e eventuais detritos. O procedimento dos ELISAs foram efectuados seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante *(apresentado em anexo II).*

2.4.2. HPLC

Para efectuar as análises com o HPLC foi necessário preparar extractos das células liofilizadas.

Obtenção dos extractos cianobacterianos para HPLC:

Pesou-se cerca de 100 mg das células liofilizadas de cada estirpe e dissolveu-se em 2 ml de metanol a 50%. Seguidamente submeteram-se estas suspensões a ultrasons (60 Hz durante 5 min), em banho gelado, para evitar a destruição das toxinas por sobreaquecimento. Para confirmar o rebentamento total das células, fez-se uma rápida observação microscópica das suspensões celulares. Estas foram mantidas no frigorífico, para garantir a total extracção das cianotoxinas, e após 24 h, centrifugaram-se a 10174 g, durante 10 min. Decantaram-se os sobrenadantes e filtraram-se-os, através de um filtro de seringa (0.2 μm, FP 030/3) para remover restos de células e eventuais detritos, para os frascos de HPLC. Até à análise de HPLC, os extractos foram conservados a -22°C.

O procedimento utilizado neste trabalho foi baseado em Lawton *et al.* (1994). Antes de se proceder à análise no HPLC efectuou-se a desgasificação da amostra e dos solventes utilizados.

Todos os reagentes foram de grau analítico para HPLC (Merck). O aparelho utilizado foi LaChrom HPLC (Pump: L-7100; Diode array detector: L-7450; autosampler L-7200) e uma coluna C18 (LiChrocart 250-4). A fase móvel foi constituida por um gradiente acetonitrilo:água com TFA (0,05%) e a detecção a 238 nm. Cada amostra correu durante 30 min. As microcistinas foram detectadas por comparação com um padrão de Microcistina-LR (fornecido pelo laboratório do Prof. G. Codd, Universidade de Dundee, Escócia) que correu sempre no início de cada série. Para a detecção dos picos correspondentes às cianotoxinas, avaliou-se conjuntamente o espectro de absorção aos 238 nm e o tempo de retenção da amostra. Em anexo encontra-se um exemplo de um relatório final de uma das análise de HPLC efectuadas.

2.4.3. MALDI-TOF-MS

Esta análise foi efectuado por Jutta Fastner no âmbito do projecto europeu CYANOTOX project (ENV4-CT98-0802). Utilizaram-se alíquotas de células liofilizadas de cada estirpe a analizar, para obter o espectro de massa iónica positiva (M+H) num aparelho Voyager DE-PRO, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA. O método experimental foi baseado em Erhard *et al.* (1997).

2.4.4. Bioensaios com ratinhos

Efectuaram-se bioensaios em ratinhos com extractos celulares de 11 estirpes cianobacterianas: J1, J4, J5, J15, J19, J21, J23, J24, J27, J34 e J39.

Obtenção dos extractos cianobacterianos para bioensaio:

Suspenderam-se as células liofilizadas de cada estirpe em NaCl (0,9%) de modo a ter uma dose final de 1500 mg de células por Kg de animal. Seguidamente, submeteram-se estas suspensões a ultrasons (60 Hz durante 5 min) em banho gelado, para evitar a destruição das toxinas por sobreaquecimento. Para confirmar o rebentamento total das células, fez-se uma rápida observação microscópica das suspensões celulares. Os extractos assim preparados foram conservados no frigorífico durante a noite até aos bioensaios.

Injectou-se 1 ml dos vários extractos celulares por via intra-peritonial (i.p.) em ratinhos albinos, Charles River, machos, não consanguíneos, de 6 semanas (provenientes do biotério CRIFFA, Espanha). Efectuaram-se duplicados para cada estirpe e dois controlos, os quais foram injectados apenas com 1 ml de solução salina (NaCl a 0,9%). Após a injecção, os sintomas e tempos de sobrevivência foram sendo registados durante 60 horas. Após a morte dissecaram-se os animais, registou-se o peso do fígado e observou-se o aspecto macroscópico dos orgãos. Fixaram-se os orgãos para estudos histológicos posteriores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na altura da colheita avaliaram-se alguns parâmetros físico-químicos, nos dois locais de amostragem *(tab. VII)*.

Tabela VII- *Parâmetros físico-químicos dos locais de amostragem, aquando a colheita de cianobactérias para isolamento e cultivo (6/7/00). Dados fornecidos por Dra. Maria Antónia Ceia, do Laboratório do Centro de Saúde de Aviz (ARS do Alentejo, sub-região de Saúde de Portalegre).*

Parâmetro/Local	**Benavila**	**Clube Náutico**
Cor	esverdeada	esverdeada
Odor	mofo	mofo
Detritos	não visivel	não visivel
Turvação (UNT)	15	14,2
pH	9,5	9,9
Oxidabilidade (mg/L O2)	13,8	11,4
Nitratos (mg/L NO3)	0,6	0,5
Nitritos (mg/L NO2)	0,3	0,01
Amónia (mg/L NH4)	0,63	0,68
Clorofila a (mg/m3)	121,8	112,4
temperatura água	25,2	24,9
temperatura ar	25,2	20,5
tempo	céu limpo, sem vento	céu limpo, sem vento

Estes valores revelam uma situação característica de florescência de cianobactérias, nomeadamente a abundância fitoplanctónica, pH elevado, cor verde, cheiro a mofo e elevada carga orgânica. Em ambos os pontos de amostragem, as florescências eram constituidas por mistura de vários géneros, dominando sempre as cianobactérias do género diazotrófico *Anabaena*.

A diversidade fitoplanctónica foi avaliada ao microscópio apenas de uma forma qualitativa *(tab. VIII)*, notando-se uma abundância elevada de cianobactérias diazotróficas do género *Anabaena* e *Aphanizomenon*. Embora esta situação seja pontual (6/7/00), sabe-se que situações semelhantes, com dominância dos géneros diazotróficos, têm ocorrido nesta albufeira, mostrando a necessidade de estudos como este.

Num relatórios interno da ARS do Alentejo (de 20/07/2000), posterior à data de amostragem deste trabalho (06/07/2000), mostra-se o resultado obtido por ELISA revelando 0,26 µg/L e 1,59 µg/L de microcistina na água em Benavila e Clube Náutico, respectivamente.

Como se repara, nesta tabela *(tab. VIII)* não está referenciado o género *Cylindrospermopsis,* no entanto ele estava presente, tendo-se conseguido isolar uma estirpe *(subcapítulo 3.1).*

***Tabela VIII** - Grupos fitoplanctónicos presentes na amostra, colhida na albufeira do Maranhão, para isolamento e cultivo de cianobactérias (6/7/00). Dados fornecidos por Dra. Maria Antónia Ceia, do Laboratório do Centro de Saúde de Aviz (ARS do Alentejo, sub-região de Saúde de Portalegre).*

	Benavila	**Clube Náutico**
CIANOBACTÉRIAS		
Anabaena spp.	+++	+++
Aphanizomenon spp.	++	+
Microcystis aeruginosa	+	-
Oscillatoria sp.	+	-
Chroococcales não ident.	-	-
DIATOMÁCEAS		
Cyclotella sp.	-	
Nitzchia sp.	-	
CLORÓFITAS		
Ankistrodesmus sp.	+	+
Chlodatela sp.	-	
Carteria sp.		+
Coelastrum sp.	++	+
Oocystis sp.	+	+
Cosmarium sp.	+	+
Scenedesmus sp.	-	
Pediastrum sp.	-	
CHLOROCOCCALES	+	
outras algas		
CRIPTÓFITAS		
Cryptomonas sp.	++	++
Rhodomonas sp.		
CRISÓFITAS		
Mallomonas sp.		
EUGLENÓFITAS		
Euglena sp.		
Trachelomonas sp.		+
DINÓFITAS		
Ceratium sp.		

Legenda:

(-) raro,
(+) pouco frequente,
(++) frequente,
(+++) abundante.

3.1. Estirpes cianobacterianas isoladas e cultivadas

Embora se tenham efectuado *ca.* de 300 isolamentos, apenas se conseguiram isolar 31 estirpes cianobacterianas. A cada estirpe foi dado um código, tendo-se registado o local de amostragem e a espécie ou género respectivos. Na tabela seguinte estão representados os isolamentos efectuados, os quais estão presentemente a ser mantidos no laboratório de ecotoxicologia "Dr. Augusto Nobre" do CIIMAR (Porto) para estudos futuros *(tab. IX).*

Tabela IX *- Estirpes cianobacterianas provenientes da Barragem do Maranhão e presentemente mantidas em stock vivo no laboratório de ecotoxicologia "Dr. Augusto Nobre" do CIIMAR.*

Estirpe	Local amostragem	Taxon	Meio de cultura
J1	Clube Náutico	*Anabaena* spp	Z8 s/ N
J3	Benavila	*Anabaena* spp	Z8
J4	Benavila	*Anabaena* spp	Z8
J5	Clube Náutico	*Cylindrospermopsis raciborskii*	Z8
J10	Clube Náutico	não identificada	Z8 s/ N
J11	Clube Náutico	não identificada	Z8 s/ N
J12	Clube Náutico	não identificada	Z8 s/ N
J14	Clube Náutico	não identificada	Z8
J15	Clube Náutico	*Anabaena aphanizomenioides*	Z8
J16	Clube Náutico	não identificada	Z8
J17	Clube Náutico	não identificada	Z8
J18	Clube Náutico	não identificada	Z8
J19	Benavila	*Anabaena spp*	Z8 s/N
J20	Benavila	não identificada	Z8
J21	Benavila	*Aphanizomenon gracile*	Z8
J22	Benavila	não identificada	Z8 s/N
J23	Clube Náutico	*Anabaena aphanizomenioides*	Z8
J24	Clube Náutico	*Aphanizomenon issatchenkoi*	Z8 s/N
J25	Benavila	não identificada	Z8 s/N
J26	Benavila	não identificada	Z8 s/N
J27	Benavila	*Anabaena aphanizomenioides*	Z8 s/N
J28	Clube Náutico	não identificada	Z8
J32	Benavila	não identificada	Z8
J34	Benavila	*Aphanizomenon issatchenkoi*	Z8 s/N
J39	Clube Náutico	*Aphanizomenon issatchenkoi*	Z8 s/N
J40	Benavila	*Aphanizomenon issatchenkoi*	Z8 s/N
J41	Benavila	não identificada	Z8 s/N
J42	Clube Náutico	não identificada	Z8
J46	Benavila	não identificada	Z8
J52	Benavila	não identificada	Z8
J53	Benavila	não identificada	Z8 s/N

Legenda: Z8 s/ N – meio Z8 sem adição de $NaNO_3$

O isolamento de estirpes cianobacterianas é um processo que, embora simples, é sempre muito moroso e com um sucesso baixo. Neste trabalho apenas 31% dos isolamentos efectuados tiveram sucesso. Isto demonstra a dificuldade existente no isolamento e cultura de cianobactérias.

Foi efectuada a caracterização morfométrica de 12 estirpes. Foram medidos o comprimento (medição na direcção do crescimento do tricoma) e a largura (medição na direcção prependicular ao crescimento do tricoma) dos três tipos de células *(fig.4)*.

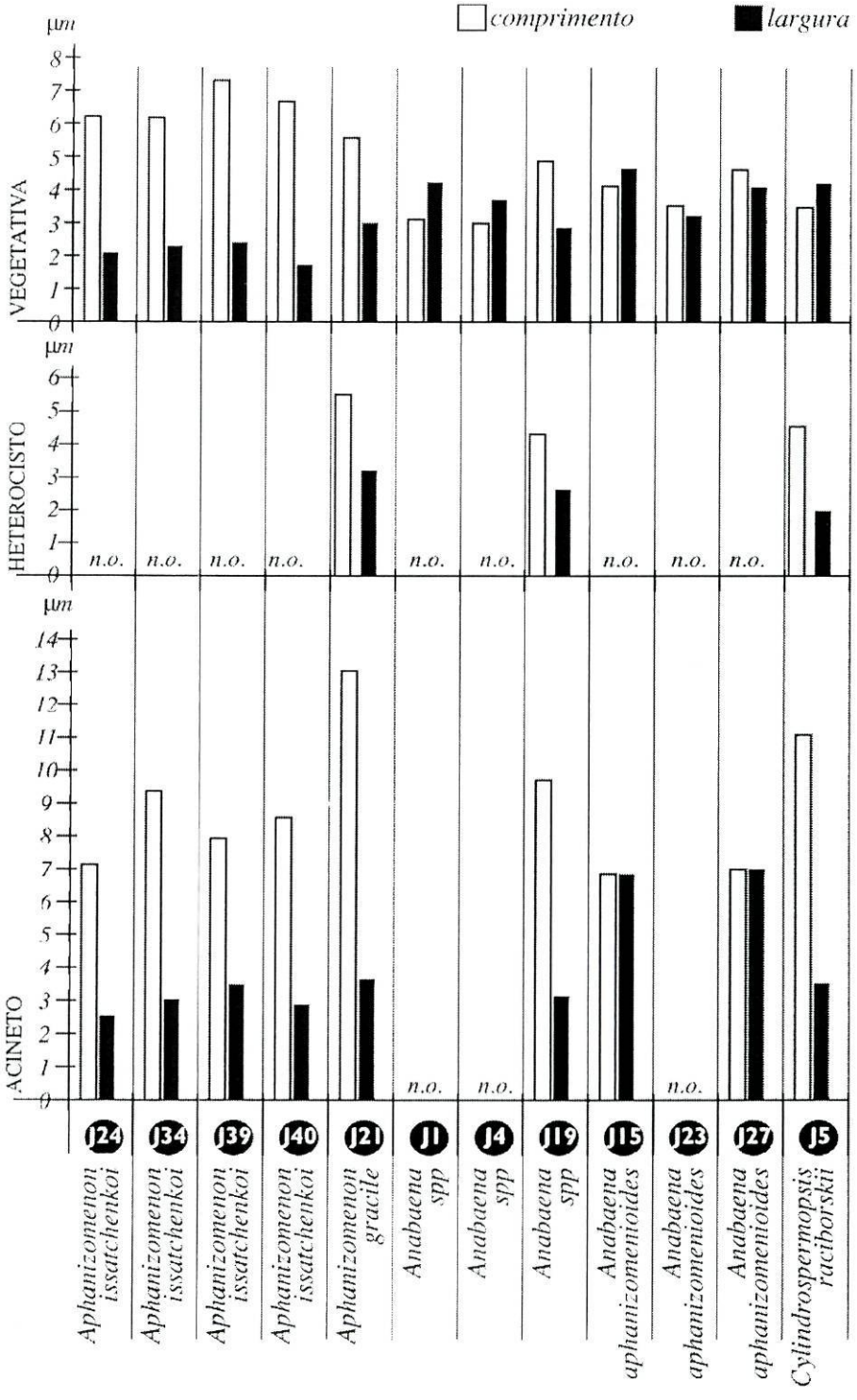
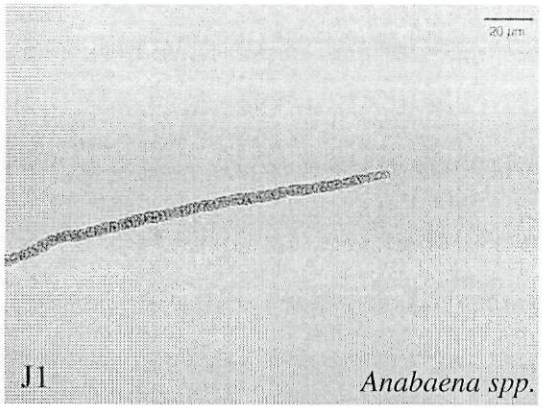
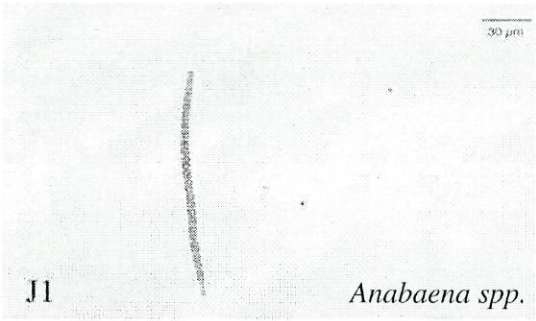
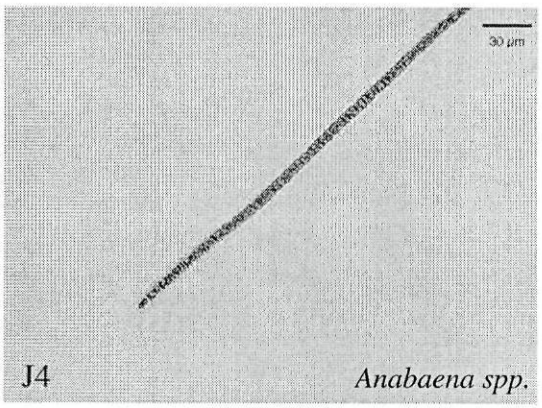


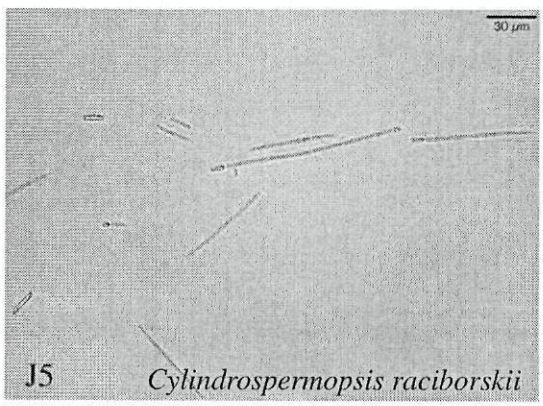
Figura 4 - *Dimensões dos vários tipos de células (vegetativa, acineto e heterocisto) das estirpes isoladas. Em anexo V encontram-se tabelas com os valores de cada medição por estirpe. n.o. - não observado.*

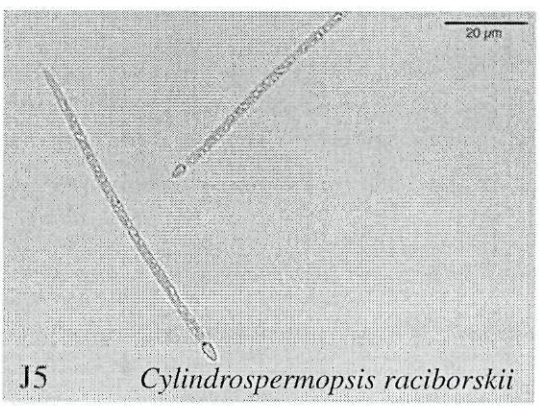
As fotografias de cada estirpe estão representadas na figura 5.











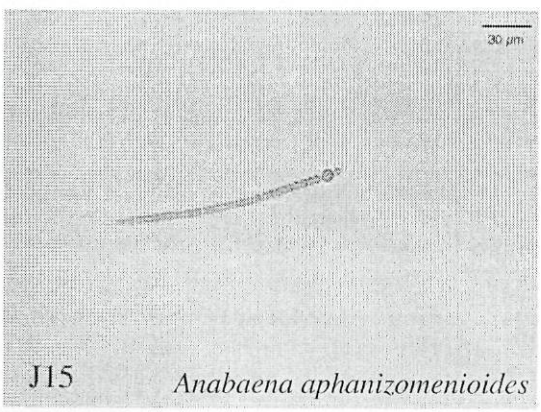


Figura 5 - *[continua nas páginas seguintes] Fotografias em microscopia óptica das 12 estirpes isoladas e caracterizadas morfometricamente.*

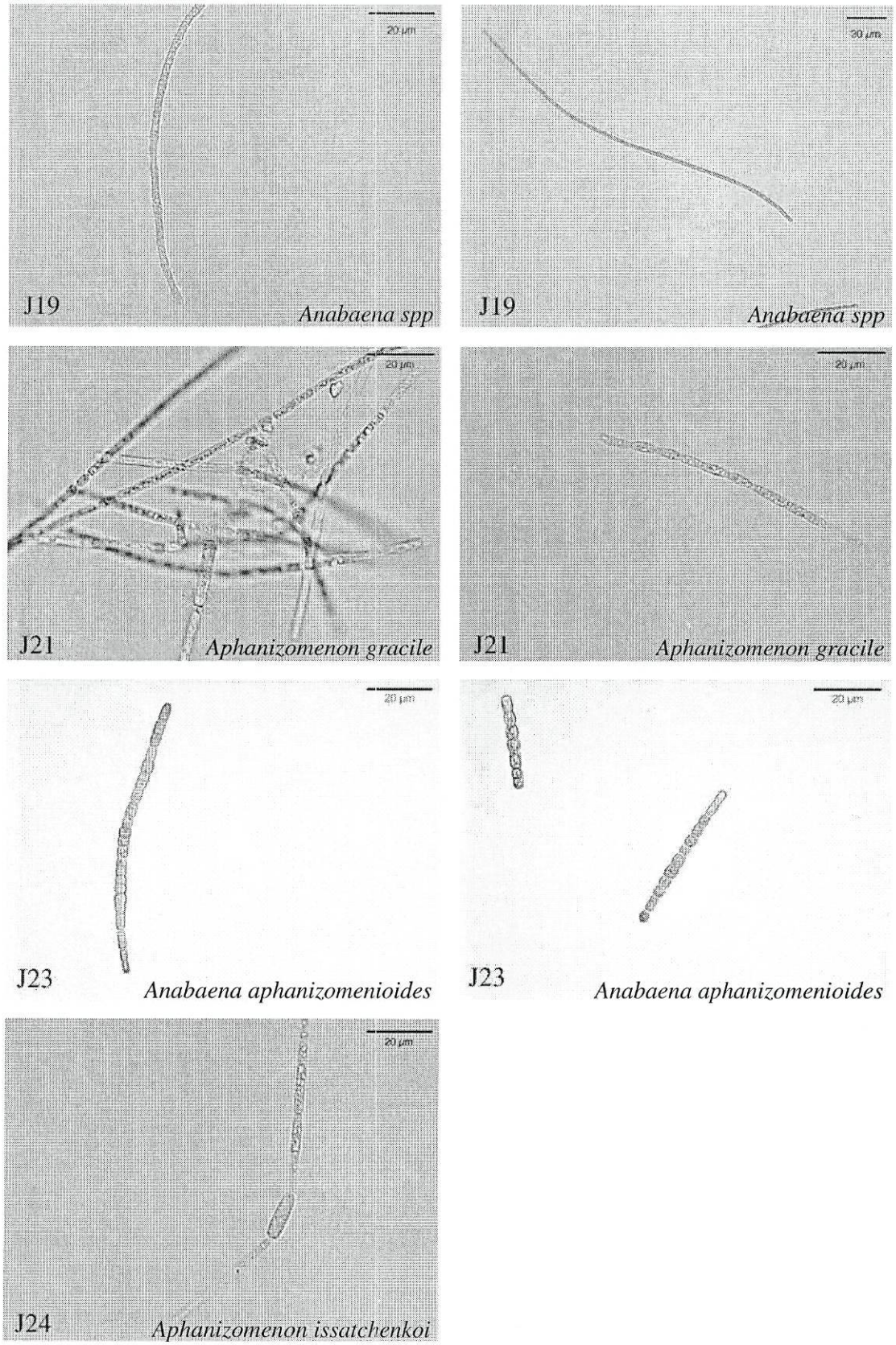


Figura 5 - *[continuação da página anterior; continua na página seguinte] Fotografias em microscopia óptica das 12 estirpes isoladas e caracterizadas morfometricamente.*

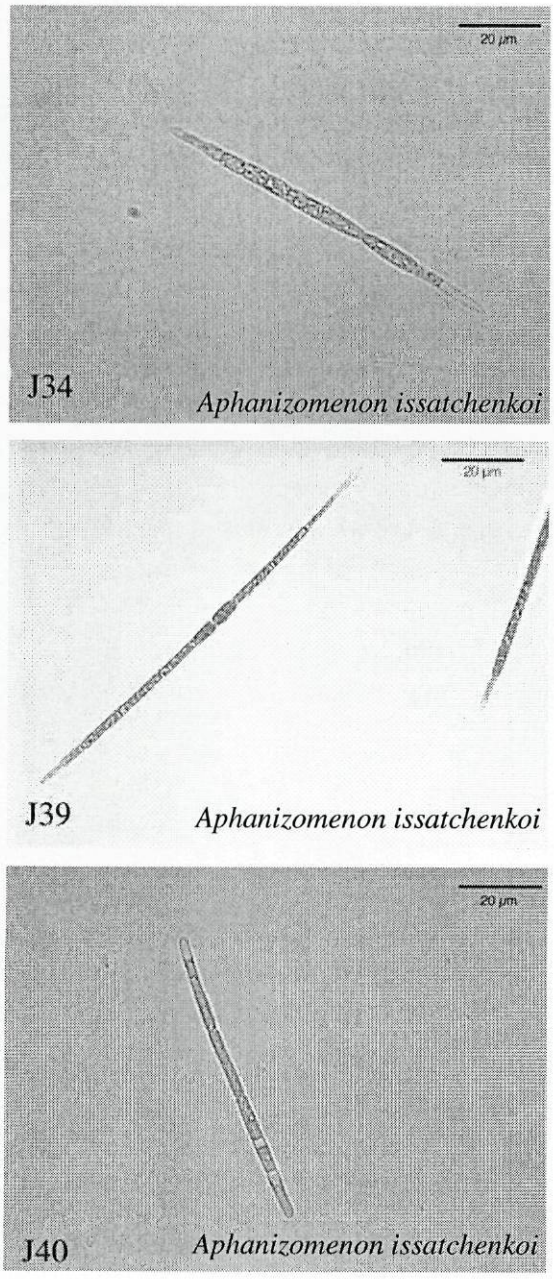


***Figura 5** - [continuação das páginas anteriores] Fotografias em microscopia óptica das 12 estirpes isoladas e caracterizadas morfometricamente.*

Ficaram ainda várias estirpes por identificar. A classificação taxonómica de espécies cianobacterianas, utilizando a microscopia óptica é difícil, por vezes pouco precisa, exigindo uma formação especializada e treinada. As células são de pequenas dimensões o que, associado à sua estrutura muito simples, torna a sua morfologia bastante semelhante entre espécies do mesmo género. Técnicas filogenéticas seriam necessárias para complementar a classificação taxonómica das várias estirpes isoladas neste trabalho, nomeadamente a técnica de biologia molecular PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizada já em alguns laboratórios (Rasmussen & Svenning, 1998; Fergusson & Saint, 2000). Numa fase mais avançada deste trabalho, prevê-se a aplicação desta técnica, já em instalação no nosso laboratório. Futuramente pretende-se prosseguir com este trabalho para completar a avaliação da toxicidade de cianobactérias diazotróficas na albufeira do Maranhão, aqui iniciada.

3.2. Análise da toxicidade das estirpes cianobacterianas cultivadas: HPLC, ELISA e MALDI

Todos os ensaios ELISA efectuados apresentaram valores negativos de microcistina e nodularina. Isto é apenas verdadade para as nodularinas e para as variantes microcistina-LR (RR e YR), que são detectadas pelo kit de ELISA utilizado neste trabalho. O facto do relatórios interno da ARS do Alentejo (de 20/07/2000), posterior à data de amostragem deste trabalho (06/07/2000), revelar 0,26 µg/L e 1,59 µg/L de microcistina na água em Benavila e Clube Náutico, respectivamente, poderá ser devido a: (1) a(s) estirpe responsável pelo valor positivo ainda não estava presente na albufeira aquando a amostra efectuada para este trabalho (6/7/2000); (2) as estirpes testadas neste trabalho não correspondem à responsável pelos valores tóxicos na amostra de água; (3) as condições de cultura no laboratório inibiram, de alguma forma, a produção de toxinas.

Os perfis de HPLC das estirpes analisadas que revelaram picos possivelmente tóxicos e do padrão de microcistina-LR utilizado, estão representados na figura 6.

As estirpes J1, J5, J15, J19, J 23, J27 e J34 não revelaram qualquer pico característico de microcistina (em anexo IV). Estes resultados estão concordantes com os obtidos por ELISA, ou seja dão negativos também.

Relativamente aos espectros de HPLC das estirpes J4, J21, J24, J39 e J40, apresentam alguns picos com absorção máxima a 238 nm mas com tempos de retenção diferentes da microcistina-LR *(fig. 6)*. Isto poderá representar substâncias idênticas à microcistina mas com hidrofilia diferente.

Nos ensaios MALDI não se obteve nenhum pico que correspondesse a alguma microcistina conhecida (-LR, -FR, -WR e -YR) mas obtiveram-se alguns picos reveladores de substâncias não identificadas *(tab. X)*. Assim, estes resultados confirmam também os anteriores, obtidos por HPLC e ELISA, em que não houve presença de microcistina nas estirpes analisadas.

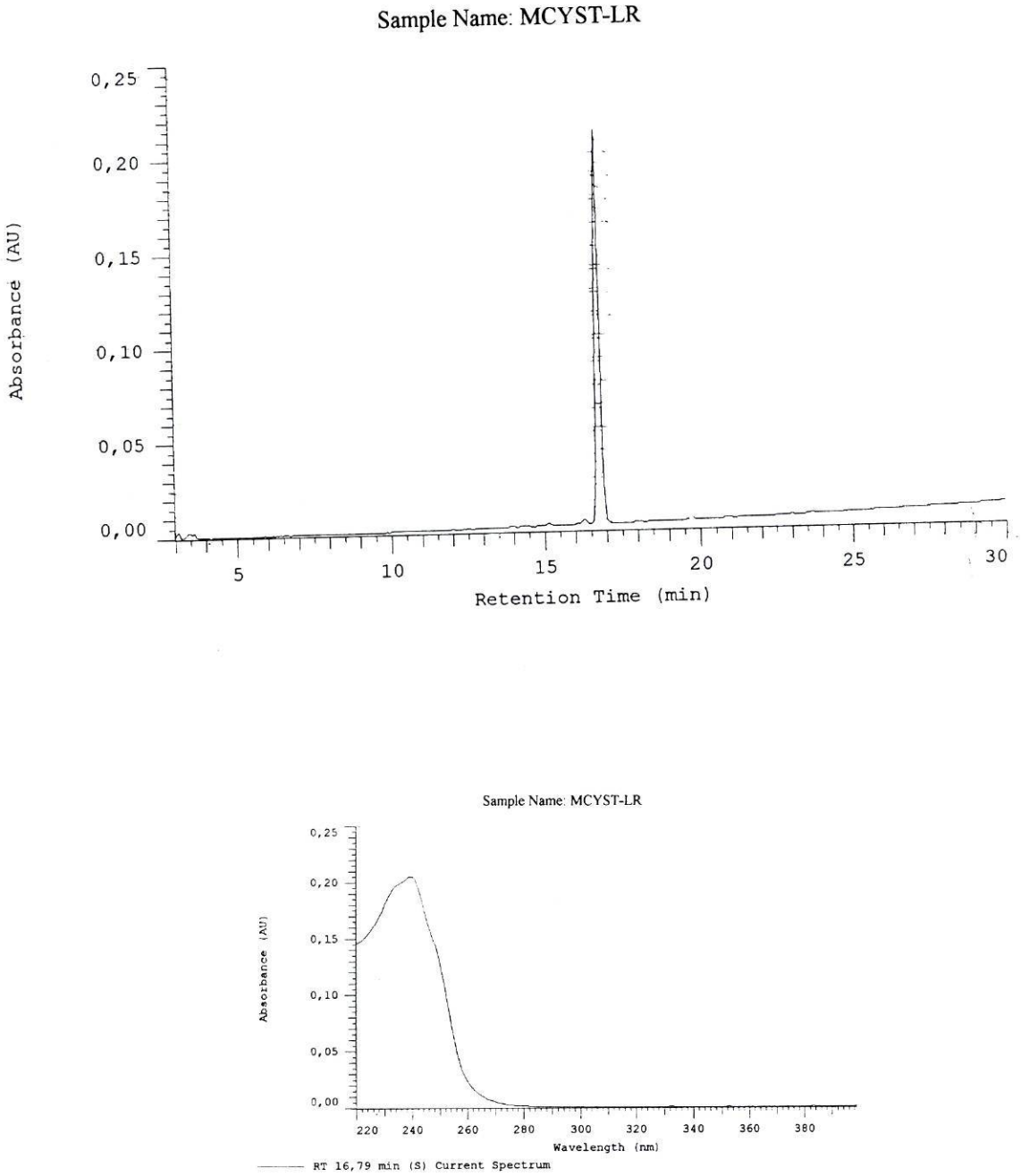
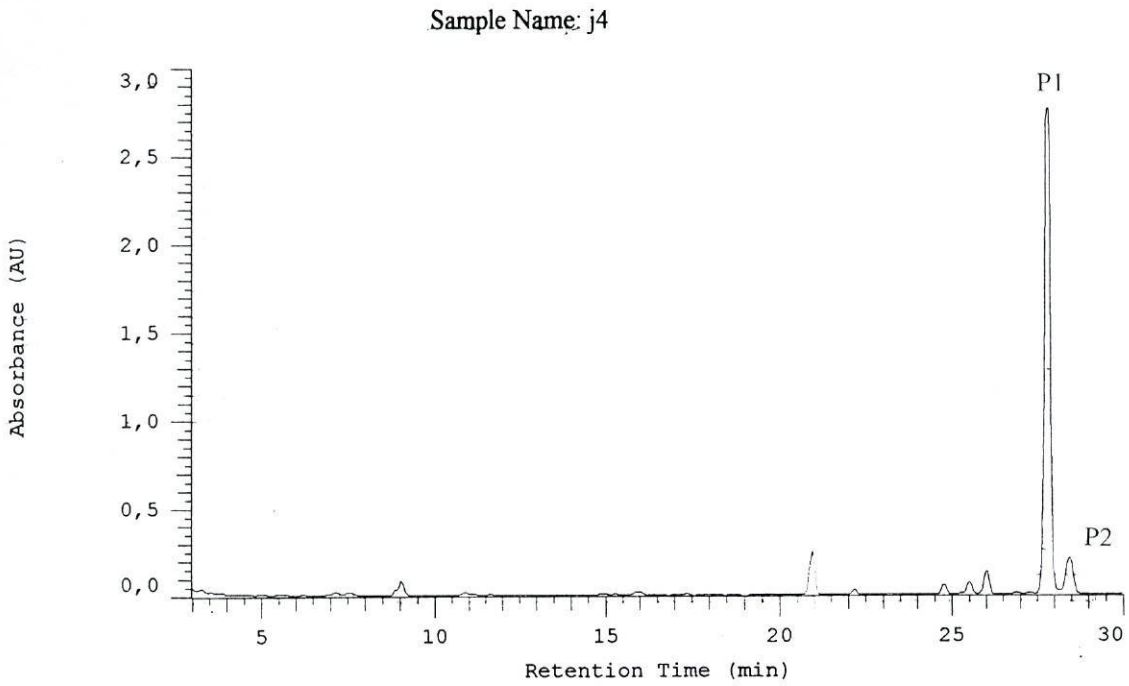
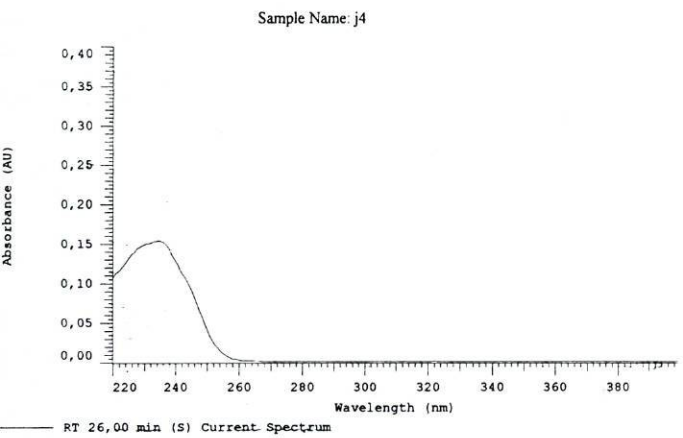


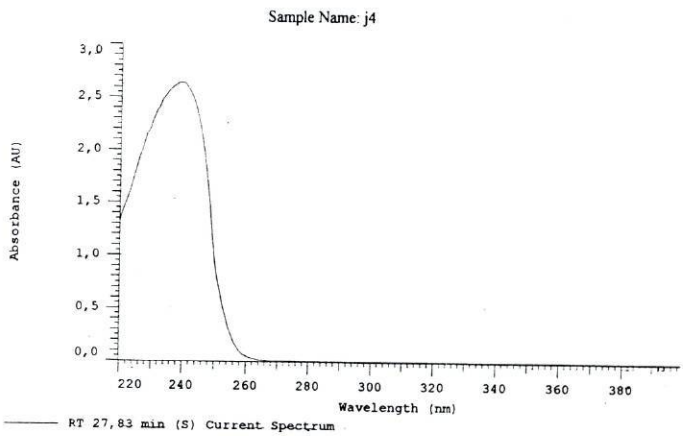
Figura 6 *- [continua nas páginas seguintes]*
Espectros obtidos por HPLC do padrão de microcistina LR.
Estão representados o perfil tempo de retenção (retention time) / absorvância (absorbance) e o perfil comprimento de onda (wavelenght) / absorvância (absorbance).



A

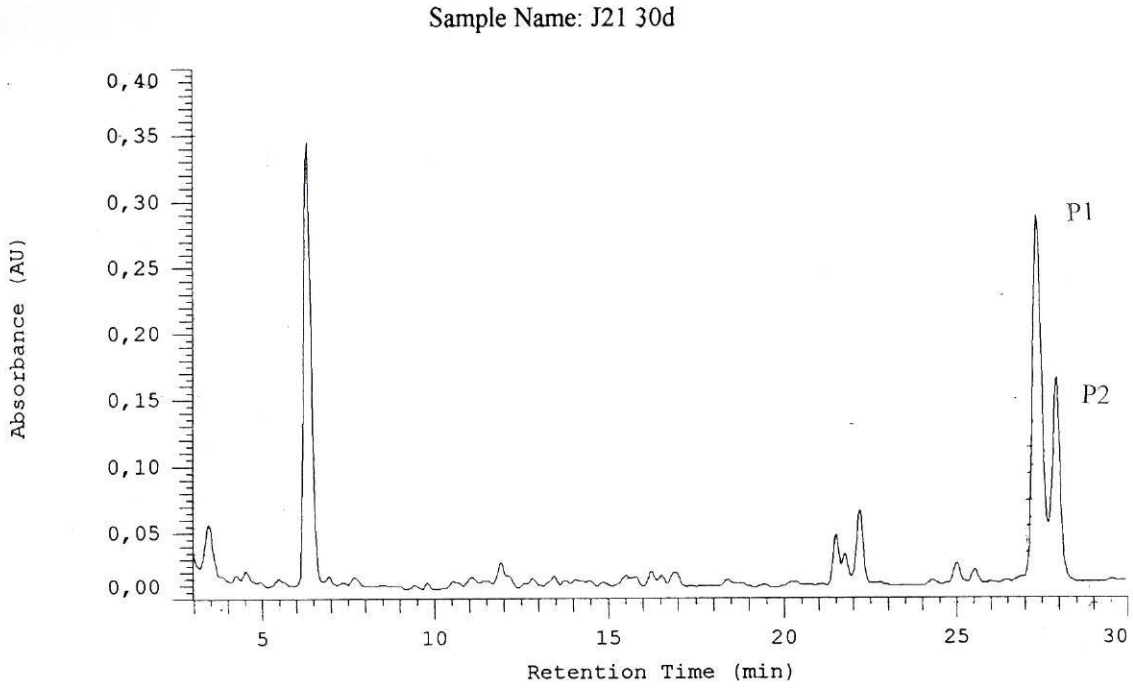


A1

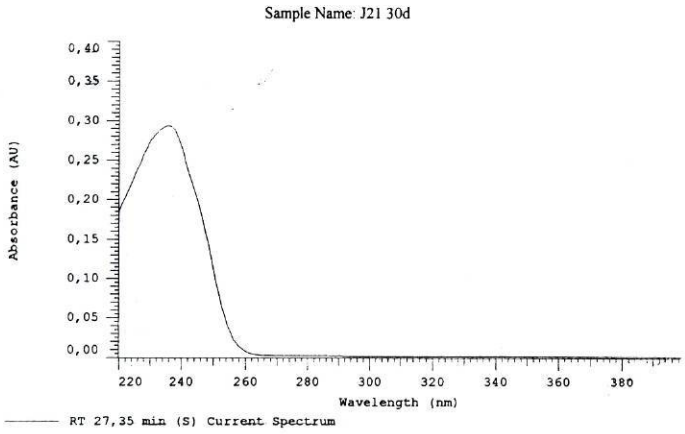


A2

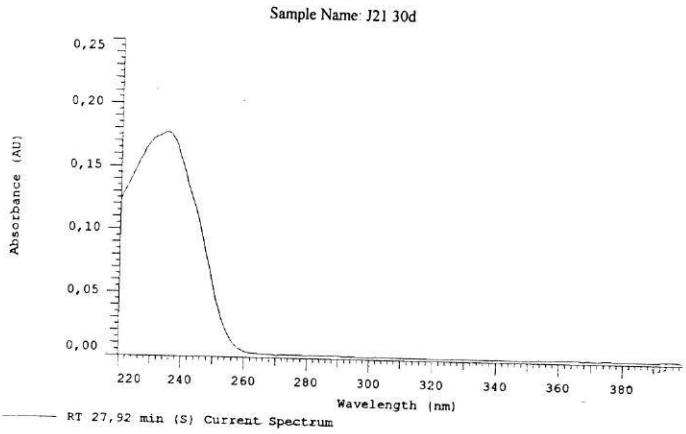
Figura 6a
Espectros obtidos por HPLC para a estirpe J4 (Anabaena spp.).
A - perfil tempo de retenção (retention time) / absorvância (absorbance);
A1, A2 e A3 - perfil comprimento de onda (wavelenght) / absorvância dos picos que apresentaram absorvância máxima ca. 238 nm.



A



A1



A2

Figura 6b
Espectros obtidos por HPLC para a estirpe J21 (Aphanizomenon gracile).
A - perfil tempo de retenção (retention time) / absorvância (absorbance);
A1 e A2 - perfil comprimento de onda (wavelenght) / absorvância dos picos que apresentaram absorvância máxima ca. 238 nm.

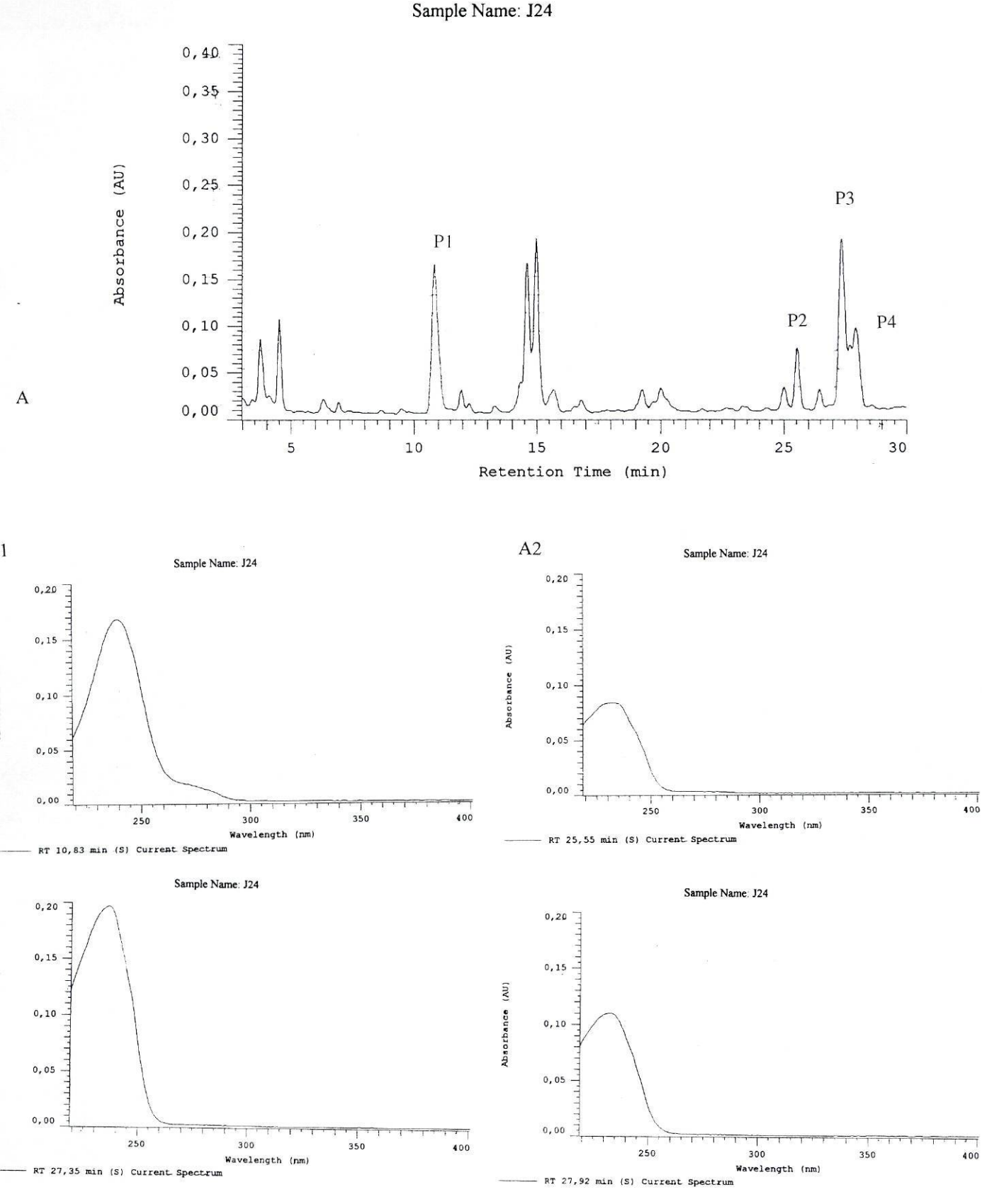
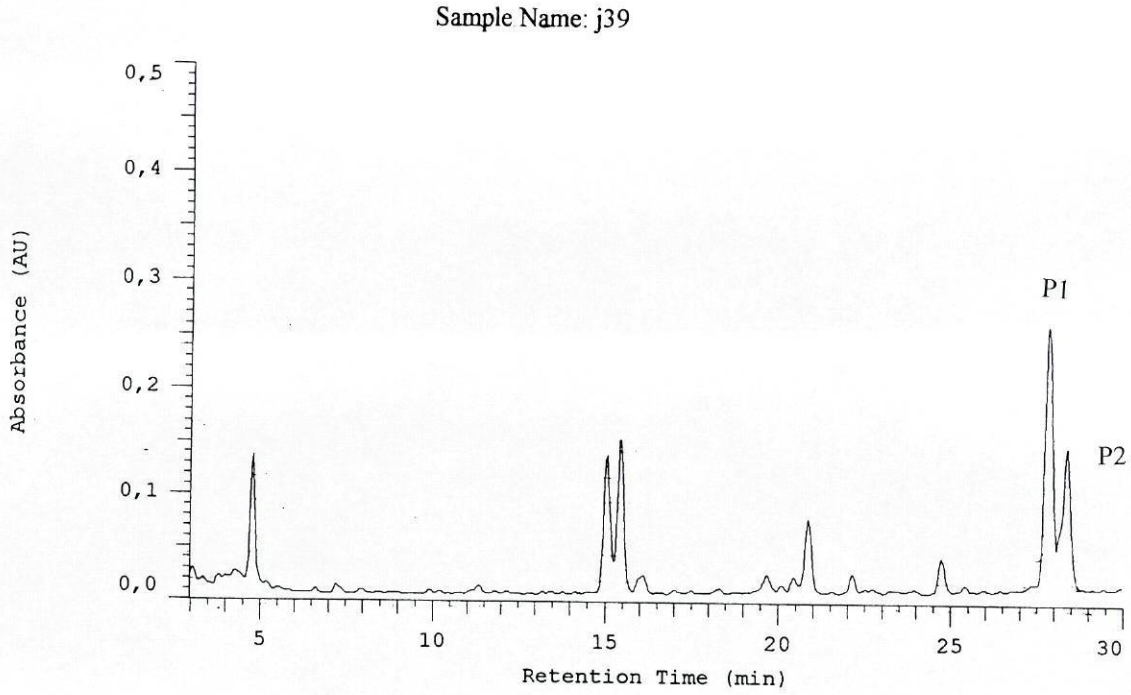
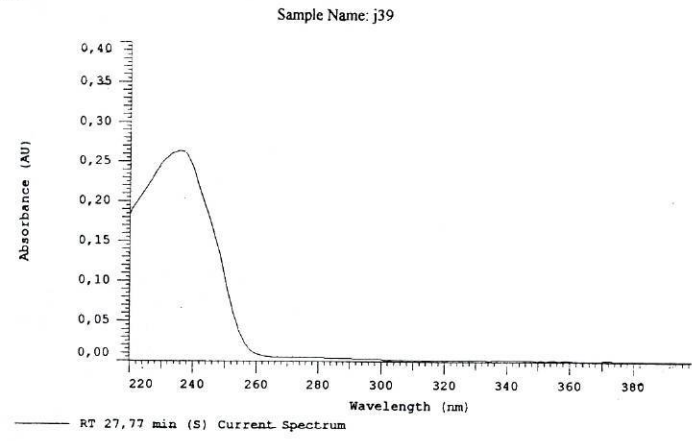


Figura 6c

Espectros obtidos por HPLC para a estirpe J24 (Aphanizomenon issatchenkoi).
A - perfil tempo de retenção (retention time) / absorvância (absorbance);
A1, A2, A3 e A4 - perfil comprimento de onda (wavelenght) / absorvância dos picos que apresentaram absorvância máxima ca. 238 nm.



A1



A2

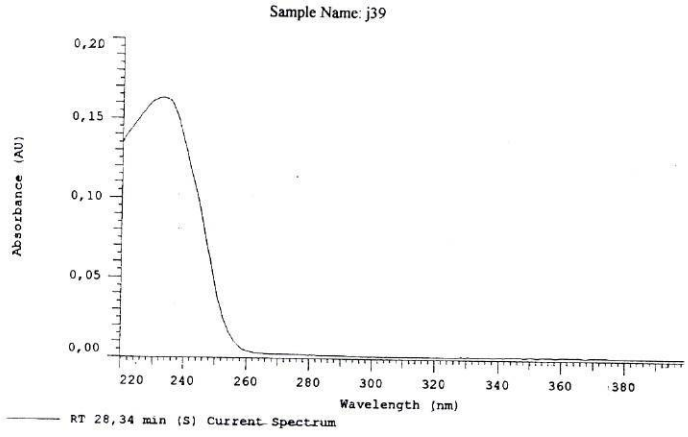
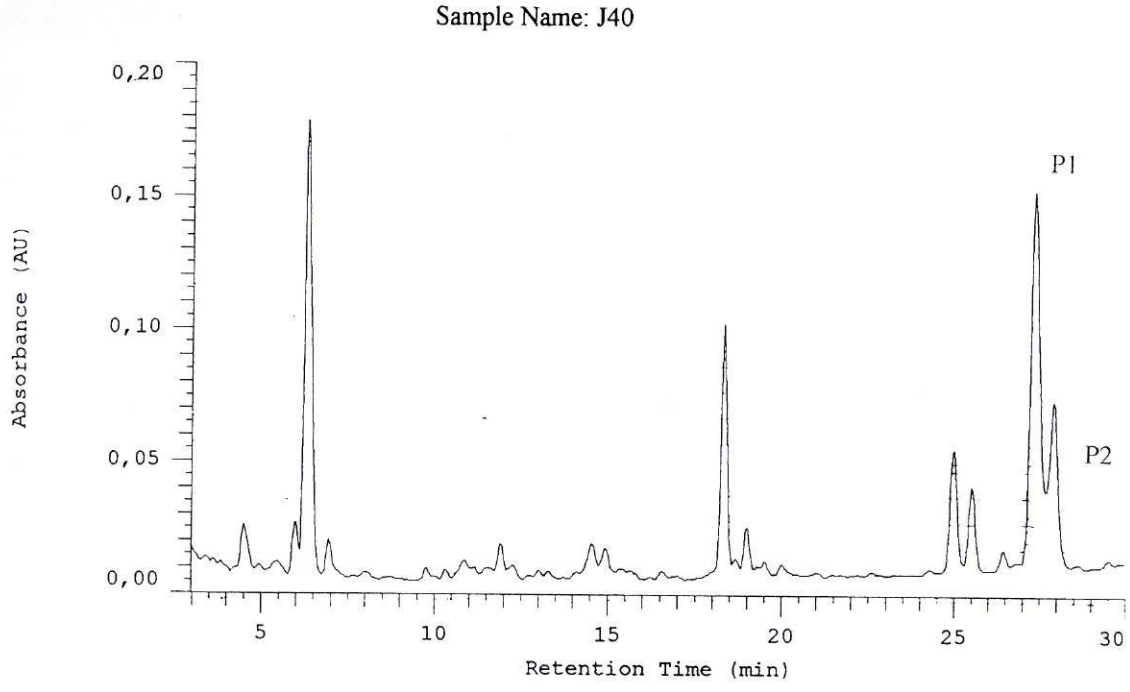
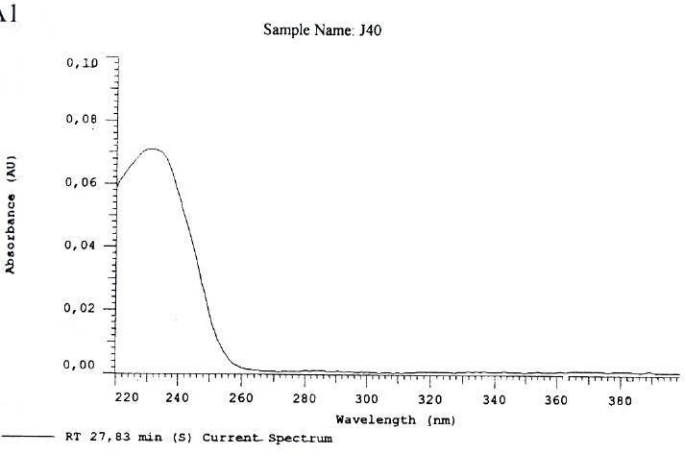


Figura 6d
Espectros obtidos por HPLC para a estirpe J39 (Aphanizomenon issatchenkoi).
A - perfil tempo de retenção (retention time) / absorvância (absorbance);
A1 e A2 - perfil comprimento de onda (wavelenght) / absorvância dos picos que apresentaram absorvância máxima ca. 238 nm.



A2



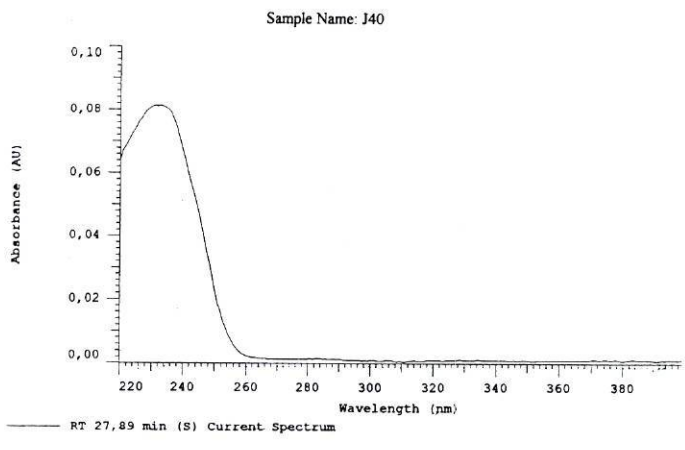


Figura 6e
Espectros obtidos por HPLC para a estirpe J40 (Aphanizomenon issatchenkoi).
A - perfil tempo de retenção (retention time) / absorvância (absorbance);
A1 e A2 - perfil comprimento de onda (wavelenght) / absorvância dos picos que apresentaram absorvância máxima ca. 238 nm.

Tabela X *- M+H dos picos mais relevantes das estirpes analizadas por MALDI-TOF por Jutta Fastner. Em anexo VI estão representados os espectros de massa.*

	massa (M+H)									
estirpe	**598/ 600**	**626/ 627/ 628**	**675/ 677**	**742**	**800**	**837/ 839**	**940**	**956**	**1338**	**1354**
J1		x								
J4		x								
J15	x		x			x				
J21										
J23							x	x		
J24				x	x				x	x

Todos as massas representadas na tabela anterior correspondem a substâncias não conhecidas. Os picos correspondentes às várias microcistinas analisadas não apareceram nestas estirpes.

Já no final deste trabalho foi possível obter resultados de uma análise de J4 de FAB-MS, efectuada por Michio Namikoshi. Apesar dos espectros obtidos (anexo VII) não revelarem picos característicos de microcistina – tal como verificado na análise MALDI-TOF –, é possível identificar um pico de massa M+H=416.5. Esta massa iónica é igual à obtida para a cilindrospermopcina por Harada *et al.* (1994).

3.3. Bioensaio com ratinhos

Na tabela seguinte *(tab. XI)* estão descriminados os tempos de sobrevivência de cada ratinho injectado, bem como os sintomas após injecção, aspecto macroscópico durante a autópsia e percentagem do peso do fígado em relação ao peso corporal do animal ((peso fígado x 100) / peso corporal). A dose final injectada de cada estirpe foi sempre 1500 mg de peso seco de células por kilograma de animal, excepto nos controlos que foram injectados com 1 ml de NaCl (0,9%).

Nos casos em que se verificava a morte de um dos duplicados e/ou o estado do animal era terminal, optou-se por provocar a morte por deslocamento cervical. Na tabela está assinalado como *morte provocada*.

Analisando a tabela XI, verifica-se que a estirpe J1 é neurotóxica. A ocorrência de salivação aponta para a presença de anatoxina-a(s). Serão necessários outros estudos analíticos, nomeadamente HPLC, para confirmar este dado. Esta é a primeira sugestão da existência de neurotoxina na albufeira do Maranhão e só foi possível através deste bioensaio. Como se repara aqui neste trabalho, as outras análises mais utilizadas, HPLC para microcistinas e ELISA, acabaram por mascarar a neurotoxina.

A estirpe J5 foi letal para um dos duplicados (J5-2) que morreu em 12 h 30min após a injecção. O outro ratinho J5-1 apresentou uma sintomatologia semelhante pelo que foi morto e autopsiado 30 min mais tarde. Os testes ELISA e HPLC foram negativos para esta estirpe de *Cylindrospermopsis raciborskii*, no entanto ela, tal como a J1 (*Anabaena spp.*) foi letal. Atendendo à espécie em questão, talvez estejamos na presença de cilindrospermopsina, o que terá que ser confirmado com HPLC para a cilindrospermopsina.

As estirpes J23, 24 e 34 foram letais, no entanto os resultados de ELISA apontariam para estirpes não tóxicas. Como se depreende da tabela XI, os ratinhos injectados com estas estirpes foram encontrados mortos (morreram durante a noite), não sendo possível precisar o tempo de sobrevivência. Relativamente à percentagem do peso do fígado não se verificam diferenças notórias, comparando com os controlos. Isto leva-nos a concluir que embora as estirpes J5, 23, 24 e 35 tenham sido letais, não foi por choque hipovolémico que se deu a morte dos animais. Outros bioensaios serão necessário para determinar o modo de acção destas estirpes, bem como observação e análise dos cortes histológicos efectuados durante este trabalho.

Tabela XI *- Resultados dos bioensaios com as 11 estirpes. Cada ratinho foi denominado pelo código da estirpe injectada seguido de 1 ou 2 para distinguir os dois duplicados. A e B correspondem aos dois controlos.*

ratinho	tempo sobrevivência	%fígado	sintomas após injecção	aspecto macroscópico durante a autópsia
J 1-1	25 min	n. o.	10 min - excitado, muito activo; 23 min - aos saltos, estrebuchando, morte repentina	tudo normal
J 1-2	30 min	n. o.	igual a J 1-1. Olhos esbranquiçados. Talvez salivação (restos de comida colada às vibrissas)	tudo normal, excepto intestino delgado com hemorragia
J 4-1	29 h (morte provocada)	4,93	deixou de se alimentar e beber. Actividade muito reduzida. Horripilação; 12 h - olhos fechados, actividade nula, respiração acelerada.	intestinos fragilizados, com muco e fezes diarréicas. Fígado de cor mais escura do que a dos controlos.
J 4-2	29 h (morte provocada)	5,26	igual a J 4-1.	igual a J 4-1
J 5-1	13h (morte provocada)	6,57	deixou de se alimentar e beber. Actividade muito reduzida. Horripilação; 12h - muita dificuldade em deslocar-se, pouco reactivo, com diarreia.	intestinos hemorrágicos, com muco e fezes diarréicas.
J 5-2	12h 30 min	5,53	igual a J 5-1	igual a J 5-1
J 15-1	*			
J 15-2	*			
J 19-1	*			
J 19-2	*			
J 21-1	*			
J 21-2	*			
J 23-1	14 h - 22 h	7,32	deixou de se alimentar e beber. 12 h - actividade muito reduzida.	n.o.
J 23-2	14 h - 22 h	6,67	igual a J 23-1	n.o.
J 24-1	14 h - 22 h	5,91	deixou de se alimentar e beber. 12 h - actividade reduzida. Fezes sólidas	fígado com manchas brancas na periferia
J 24-2	55 h (morte provocada)	5,08	igual a J 24-1	igual a J 24-1
J 27-1	*	6,22		
J 27-2	*	6,19		
J 34-1	45 h (morte provocada)	5,80	deixou de se alimentar e beber. 12 h - actividade reduzida, com diarreia. 24 h - olhos fechados, horripilação. 45 h - diarreia muito forte.	bexiga cheia, orgãos da cavidade peritonial fragilizados, intestino delgado edemaciado.
J 34-2	14 h - 22 h	5,50	deixou de se alimentar e beber. 12 h - actividade reduzida, com diarreia.	fígado com manchas escuras e claras
J 39-1	*	5,56		
J 39-2	*	5,56		
A	*	6,31		
B	*	6,73		

legenda: n.o. - não observado; * não morreram dentro das 60 horas do ensaio.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudou-se a produção de toxinas de 12 estirpes cianobacterianas diazotróficas, isoladas a partir de uma amostra retirada da albufeira do Maranhão, a Sul de Portugal. Foi possível detectar efeitos tóxicos usando bioensaios em ratinhos, mas sem se identificar, de forma segura, quais as cianotoxinas responsáveis.

Na tabela XII estão sumariados sucintamente os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela XII *- Resumo dos resultados.*
rt – tempo de retenção em minutos; abs. máx. – absorção máxima

taxon / **estirpe**	**ELISA**	**HPLC** (abs. máx. 238 nm)	**MALDI-TOF-MS (m+H)**	**Bioensaio**	**FAB-MS**
Anabaena spp./J1	negativo	nada	626-28	neurotóxica	não efectuado
Anabaena spp./J4	negativo	rt=26 rt=28	626-28	tóxica	cilindrospermopsina?
Cylindrospermopsis raciborskii/J5	negativo	nada	não efectuado	tóxica	não efectuado
Anabaena aphanizomenioides/J15	negativo	nada	598-600 675-677	não tóxica	não efectuado
Anabaena spp./J19	negativo	nada	não efectuado	não tóxica	não efectuado
Aphanizomenon gracile/J21	negativo	rt=27 rt=28	nada	não tóxica	não efectuado
Anabaena aphanizomenioides/J23	negativo	nada	940; 956	tóxica	não efectuado
Aphanizomenon issatchenkoi/J24	negativo	rt=11 rt=26 rt=27 rt=29	742; 800; 1338; 1354	tóxica	não efectuado
Anabaena aphanizomenioides/J27	negativo	nada	nada	não tóxica	não efectuado
Aphanizomenon issatchenkoi/J34	negativo	nada	nada	tóxica	não efectuado
Aphanizomenon issatchenkoi/J39	negativo	rt=27 rt=28	nada	não tóxica	não efectuado
Aphanizomenon issatchenkoi/J40	negativo	rt=28 rt=29	nada	não efectuado	não efectuado

Cinco estirpes (J4, J21, J24, J39 e J40) revelaram nos seus espectros de HPLC dois picos com absorção máxima aos 238 nm (característico das microcistinas). No entanto, estes picos parecem não corresponder a substâncias tóxicas. Isto porque as estirpes J21 e J39 apresentaram apenas essas duas substâncias potencialmente tóxicas nos seus espectros de HPLC e não causaram toxicidade nos ratinhos. As estirpes J4 e J24 foram tóxicas mas revelaram, para além dos referidos picos, talvez a existência de cilindrospermopsina (por FAB-MS) no caso de J4, e outros dois, picos também característicos de microcistina (absorção máxima aos 238 nm), no caso de J24. Relativamente à estirpe J40 não foi efectuado bioensaio, pelo que não é possível afirmar nada quanto à sua toxicidade. Apesar de algumas estirpes terem demonstrado toxicidade nos bioensaios, os testes ELISA e MALDI-TOF-MS foram todos negativos. A estirpe J1 apresentou dados negativos quanto à existência de cianotoxinas em todas as análises efectuadas, mas no bioensaio provocou a morte dos ratinhos em 25 e 30 min; o que revela neurotoxicidade acentuada não atribuível às toxinas identificáveis pelos outros métodos aqui aplicados.

Ficou assim demonstrado que os métodos mais utilizados na monotorização de cianotoxinas em água doce (ELISA e HPLC) não são suficientes para fazer o rastreio de eventuais cianotoxinas existentes na água. Isto porque: (1) na maior parte das vezes procura-se apenas o género *Microcystis* como potencial toxigénico, esquecendo-se que poderá haver outros potencialmente tóxicos, nomeadamente os diazotróficos, (2) o teste ELISA comercial detecta apenas as nodularinas e 3 variantes de microcistina, não sendo capaz de diagnosticar todas as outras cianotoxinas (ca. 60 variantes de microcistina), (4) a detecção com HPLC é normalmente utilizada com padrões de microcistina-LR, não sendo possível confirmar se existem outras variantes tóxicas apenas numa análise, (5) evita-se fazer bioensaios com mamíferos, no entanto eles são essenciais para detectar efeitos tóxicos provocados por toxinas não conhecidas e para se identificar rapidamente as neurotoxinas .

A toxicidade detectada neste trabalho que, note-se, foi apenas pontual (no dia 6 de Junho), indícia uma forte probabilidade de existirem várias estirpes tóxicas em Portugal. A sua existência poderá estar a ser mascarada pela excessiva confiança que se tem nos métodos de detecção de rotina. Talvez isto seja explicado pela aplicação de técnicas de detecção muito específicas para cada tipo de cianotoxina. O desenvolvimento dos métodos de análise e de detecção de cianotoxinas terá que ser feito numa perspectiva mais abrangente, de modo a ser possível detectar quaisquer efeitos tóxicos perigosos para a saúde e para o ambiente. Este aspecto torna-se premente para a protecção da saúde pública, especialmente quando se sabe que cada vez mais se recorre a águas superficiais, muitas vezes com elevados índices de eutrofização, na produção de água para consumo humano.

A continuação e o aprofundamento deste estudo é necessário para alargar o conhecimento sobre a toxicidade das cianotoxinas. Presentemente estão-se a analisar os efeitos histológicos resultantes do bioensaio aqui descrito e os estudos de toxicidade com as outras estirpes isoladas (*tab. IX*) irão também continuar. Uma amostragem mais sistematizada , abrangendo regiões maiores e águas de consumo, será também proposta no seguimento deste trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D.G., 2000. Symbiotic interactions. *In* Whitton, B.A. & Potts, M., (Eds), The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 523-561 pp.

Alouf, J. E., 2000. Bacterial protein toxins. An overview. *In* Holst, O. (Ed) Bacterial toxins. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 45. Humana Press. Totowa, New Jersey. 1-26.

Amorim, A. & Vasconcelos, V.M., 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovinciallis*. Toxicon 37: 1041-1052.

An, J. & Carmichael, W.W., 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. Toxicon, 32(12): 1495-1507.

Anderson, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z.X., Holmes, C.F.B., Kent, M., LeBlanc, M., Taylor, F.J.R. & Williams, D.E., 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon "Nepten Liver Disease". Toxicon, 31: 1315-1323.

Aune, T. & Berg, K., 1986, Use of freshly prepared rat hepatocytes to study toxicity of blooms of blue-green algae *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria agardhii.* J. Toxic. Environ. Health, 19: 325-336.

Baker, P., 1991. Identification of common noxious cyanobacteria. Part I - Nostocales. Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research. Research Report no. 29. Melbourn and Metropolitan Board of Works. 203 pp

Beasley, V.R., Dahlem, A.M., Cook, W.O., Valentine, W.M., Lovell, R.A., Hooser, S.B., Hrada, H.-I., Suzuki, M.& Carmichael, W.W., 1989. J. Vet. Dign. Invest. 1: 359-365.

Bothe, H., 1982. Nitrogen fixation. *In* Carr, N.G. & Whitton, B.A. (Eds) The biology of cyanobacteria. 87-104 pp.

Byth, S. 1980. Palm Island mystery disease. Medical Journal of Australia, 2:40-42.

Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Grant, P., Mitchell, G.F., Anderson, J.W. & McCauley, I., 1997. A study of feral carp *Cyprinus carpio L.*, exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implication on fish health. J.Fish Diseases, 20: 81-91.

Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Scientific American, January: 64-72.

Carmichael, W.W., Beasley, V.R., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.I., Krishnamurthy, T., Yu, M.J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M. & Watanabe, M., 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon, 26: 971-973 .

Carmichael, W.W., Bent, P.E. 1981. Hemagglutination method for detection of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. Applied and Environmental Microbiology. 41(6): 1383-1388.

Castro, A.T.P., 1997. Aspectos da resposta imunologica específica e inespecifica à infecção (artigo de revisão). Sociedadde Portuguesa de Imunologia. 3(2): 11-35.

Chorus, I. & Bartram, J. (Eds.), 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public helath. Consequences, monitoring and management. E&FNSpon. London. New York. 416pp.

Chorus, I. (Ed), 2001. Cyanotoxins: occurence, causes, consequences. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. 357 pp.

Chu, F.S., Huang, X., Wei, R.D. & Carmichael, W.W., 1989. Production and characterization of antibodies against microcystin. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1928-1933.

Codd, G.A. & Roberts, C. (Eds). 1991. Public health aspects of cyanobacteria (blue-green algae). Proceedings of a Seminar. Public Health Laboratory Service. Association of medical Microbiologists. PHLS Microbiology Digest, 8(3): 78-100.

Costa, M.S. & Azevedo, S.M.F.O., 1994. Implantação de um banco de culturas de cianoficeas tóxicas. Iheringia. 45: 69-74.

Dahlmann, J., Rühl, A, Hummert, C., Liebezeit, G., Carlsson, P. & Ganéli, E., 2001. Different methods for toxin analysis in the cyanobacterium *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae). Toxicon, 39: 1183-1190.

Dow, C.S. & Swoboda, U.K., 2001. Cyanotoxins. *In* Whitton, B.A. & Potts, M., (Eds), The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 613-632 pp.

Erhard, M., Döhren, H. & Jungblut, P., 1997. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. Nature Biotech, 15: 906-909.

Erhard, M., Döhren, H. & Jungblut, P., 2001. Rapid typing and structure dtermination of cyanobacterial peptides using MALDI-TOF mass spectroscopy. *In* Cyanotoxins: occurence, causes, consequences. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. 344-353 pp.

Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O.& Lindholm, T., 1989. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the fresh water mussel *Anodonta cygnea*. Hidrobiologia, 183: 211-216

Falconer, I. R., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper- Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M. & Codd, G. A., 1999. Safe levels and safe practices. *In* Chorus, I. & Bartram, J. (Eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 155-178 pp.

Falconer, I:R., 2001. Toxic cyanobacterial blooms problems in Australian waters: risks and impacts on human health. Phycologia. 40(3): 228-233.

Falconer, I.R. & Humpage, A.R., 2001. Preliminary evidence for *in vivo* tumor initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. Envir. Toxicol. 16: 192-195.

Falconer, I.R., Choice, A & Hosja, W., 1992. Toxicity of edible (*Mytilus edulis*) growing naturally in an estuary during a water bloom of the blue-green algae *Nodularia spumigena*. Environmental Toxicology and Water Quality, 7: 119-123

Fawell, J.K. & James, H.A., 1994. Report number FR0434/DOE3728. Allen House, The Listons, Liston Road, Marlow, Bucks, SL7 1 FD, U.K.

Fergusson, K.M. & Saint, C.P., 2000. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. Appl. Environ. Microbiol, 66(9): 4145-4148.

Ferreira, F., 1994. Caracterização bioquímica de cianotoxinas produzidas por duas espécies de cianobactérias *(Microcystis aeroginosa* e *Aphanizomenon flos–aquae)* provenientes da albufeira de Crestuma-Lever (Rio Douro). Tese de mestrado F.C.U.P.

Ferreira, F.M.B., Soler, J.M.F., Fidalgo, M.L. & Férnandez-Vila, P., 2001. PSP Toxins from *Aphanizomenon flos–aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro River, Northern Portugal). Toxicon, 39: 757-761.

Fitzgeorge, R.B., Clark, S.A. & Keevil, C.W.1994. Routes of intoxication. *In* G.A. Codd, T.M. Jeffries, C.W. Keevil & E. Potter (Eds). 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins, Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K., 69-74 pp.

Frade, F., 1951. A propósito da barragem de Castelo de Bode. Bol. da Comissão de fiscalização das Águas de Lisboa., 35: 129-137.

Francis, G., 1878. Poisonous Australian lakes. Nature, 18: 11-12

Gupta, S., 1998. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. *In* Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information. Addendum to Volume 2. Second edition. World Health Organiztion. Geneva. 95-107 pp.

Harada, K.-I., Suzuki, M., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W. W., & Rinehart, Jr., 1988. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. Toxicon, 26(5):433-439.

Harada, K.-I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M. & Terao, K., 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and it's screening method. Toxicon, 32: 73-84.

Harada, K.-I., Kondo, F. & Lawton, L., 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In* Chorus, I. & Bartram, J. (Eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 369-405 pp.

Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R. & Falconer, I.R., 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. Toxicon, 35: 341-346.

Heinze, R. 1986. A biotest for hepatotoxins using primary rat hepatocytes. Phicologia, 35 (suplement): 89-93.

Henriksen, P. 1996. Toxic cyanobacteria/blue-green algae in Danish fresh waters. Thesis, Dept. of Phycology, University of Copenhagen.

Hyde, E.G.& Carmichael, W.W., 1991, Anatoxin-a(s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase. J.Biochem. Toxicol. 6(3): ?-?.

Ito, E., Kondo, F. & Harada, K.-I., 1997. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. Toxicon, 35(9): 1453-1457.

James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B & Skulberg, O.M., 1998. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. Journal of Chromatography A, 798: 147-157.

Kevil, C. W., 1991. Toxicology and detection of cyanobacterial (blue-green algal) toxins. PHLS Microbiology Digest 8(3): 91-95.

Kotai, J., 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae 11/69. Norwegian Institute for water Research, Oslo.

Kaebernick, M. & Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations on cyanotoxin production. FEMS Microbiology Ecology 35: 1-9.

Komarárek, J. & Agnostidis, K., 1999. Cyanoprokariota. 1. Teil Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fisher: 548 pp.

Kuipper-Goodman, T., Falconer, I. & Fitzgerald, J. 1999. Human health aspects. *In* Chorus, I. & Bartram, J. (Eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 113-141 pp.

Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Extraction and High-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analyst. 119: 1525-1530.

Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K & Watanabe, M.M., 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria). Toxicon, 39: 973-980.

Lindholm, T., Eriksson, J.E., & Meriluoto, J.A.O., 1989. Toxic cyanobacteria and water quality problems - examples from a eutrophic lake Åland, South West Finland. Water Research, 23: 481-486

Meriluoto, J., Härmälä-Braskén, A.-S., Eriksson, J., Toivola, D. & Lidholm, T., 1996. Choosing analytical strategy for microcystins. Phycologia, 35 (supplement): 125-132.

Meriluoto, J., Lawton, L. & Harada, K.-I., 2000 Isolation and detection of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. *In* Holst, O. (Ed) Bacterial toxins. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 45. Humana Press. Totowa, New Jersey. 65-87.

Mur, L. R., Skulberg, O.M. & Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. *In* Chorus, I. & Bartram, J. (Eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 15- 40 pp.

Nichols, J.M. & Adams, D.G., 1982. Akinets. *In* Carr, N.G. & Whitton, B.A. (eds.) The biology of cyanobacteria. Blackwell Scientific Publications. Osford. London. Edimburgh. 387-412 pp.

Oberemm, A., 2001. Effects of cyanotoxins on early life stages of fish and amphibians. *In* Chorus, I. (Ed), 2001. Cyanotoxins: occurence, causes, consequences. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. 241-248 pp.

Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii.* J. Am. Chem. Soc. 114: 7942-7944.

Oliveira, M.R., 1984. Estrutura da comunidade fitoplanctónica e dinâmica dos "blooms" na albufeira do Maranhão. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas, 12:37-69.

Oliveira, M.R., 1987. Estrutura de comunidades fitoplanctónicas em albufeiras portuguesas. Tese para investigador auxiliar. INIP. Lisboa. 307 pp.

Oliveira, M.R. 1991. Eutrofização do rio Guadiana. "Blooms" de cyanophyceae e influência na ictiofauna. Relatório Técnico e Científico do INIP, 8: 27

Oliver, R.L., & Ganf, G. G., 2000. Freshwate blooms. *In* Whitton, B.A. & Potts, M., (Eds), The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 149-194 pp.

Pearl, H. W., 1991. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). *In* Sandgren, C. D. (Ed). Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press. 261- 315 pp.

Pereira, M.L., Soares, A.M.V.M. & Vasconcelos, V.M., 1995. Toxicidade de *Microcystis aeroginosa.* Alterações morfológicas em tecidos animais. Cience. Biol. Ecol. Syst. (Portugal). 15 (1/2): 01-08.

Pereira, P., Onodera, H., Andrindo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N. & Oshima, Y., 2000. Paralytic shellish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir. Portugal. Toxicon, 38: 1689-1702 pp.

Premazzi, G. & Volterra, L.1993. Microphyte toxins. A manual for toxin detection, environmental monitoring and therapies to counteract intoxications. Environment Institute. Joint Research Centre. 59-174 pp.

Råbergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E., 1991. Histopathological effect of microcystin LR a cyclic polypeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio L.*). Aquat. Toxicol. 20: 131-146

Rasmussen, U. & Svenning, M.M., 1998. Fingerprinting of Cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1). 265-272 pp.

Rivasseau, C., Racaud, P., Deguin, A. & Hennion, M.-C., 1999. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. Analytica Chimica Acta, 394: 243-257.

Runnegar, M.T.C., Gerdes, R.G. & Falconer, I.R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. Toxicon, 29(1): 43-51.

Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z. & Lu, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultures rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol., 42(2): 219-225.

Rypka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments. Strain Histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. of General Microbiol. 111:1-61pp.

Sampaio, J., 1933. Apontamentos para o estudo das cianófitas portuguesas. Anais da Faculdade de Ciências, 28: 49-59.

Semenova, E.A., Kuznedelov, K.D. & Grachev, M.A., 2001. Nucleotide sequences of fragments of 16S rRNA of the Baikal natural populations and laboratory cultures of Cyanobacteria. Molecular Biolgy 35 (3): 405-410 pp.

Shopf, JW., 1993. Microfossils of the Early Archean Apex chert: New evidence of the antiquity of life. Science. 260: 640-646.

Sivonen, K. & Jones, G. 1999. Cyanobacterial Toxins. *In* Chorus, I. & Bartram, J. (eds.) Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences. Monitoring and Management. 41-111 pp.

Sommer, U., 1985. Comparison between steady state and non steady state competition: experiments with natural phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 30: 335-346 pp.

Tencalla, F.G., Dietrich, D.R. & Schlatter, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Aqua. Toxicol. 30(3): 215-224.

Vasconcelos, V.M., 1994a. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese fresh waters. Arch. Hydrobiol., 130: 439-451.

Vasconcelos, V. M., 1994b. Toxicologia de cianobactérias. Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves. Dissertação de Doutoramento. Fac. de Ciências da Universidade do Porto. 137 pp.

Vasconcelos, V.M., 1995. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovinciallis.* Aquatic Toxicol 32: 227-237

Vasconcelos, V. M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M., 1995. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from portuguese strains of *Microcystis aeroginosa* Kuts. emend Elekin. Arch. Hydrobiol. 134 (3): 295-305 pp.

Vasconcelos, V. M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W. & Namikoshi, M., 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. Wat. Res. 30 (10): 2377-2384.

Vasconcelos, V.M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. Brz. J. Med. Biol. Res. 32: 249-254

Vasconcelos, V.M., 2001. Freshwater cyanobacteria and their toxins in Portugal. *In* Chorus, I. (Ed), 2001. Cyanotoxins: occurence, causes, consequences. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. 62-67

Wiberg, G.S. & Stephenson, N.R. 1960. Toxicologic studies on paralytic shellfish poison. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2:607-615.

Whitton, B.A. & Potts, M., (Eds), 2000. The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1-11 pp

Whitton, B.A., 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the Cyanobacteria. *In* Mann, N.H. & Carr, N.G. (Eds). Photosynthetic prokaryotes. Plenum New York. 1-51 pp.

Whitton, B.A., Robinson, P.J. & Gemmel, J.J., 2000. Key to the blue-green algae of the British Isles. Environment Agency (England and Wales) and university of Durham. Department of Biological Sciences, University of durham, Durham, U.K.

Wolk, C.P., 1982. Hetrocysts. *In* Carr, N.G. & Whitton, B.A. (Eds) The biology of cyanobacteria. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edingburgh, Boston, Melbourne. 359-386 pp.

Yu, S.-Z., 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. Journal of Gastroenterology and Hepatology 10: 674-682.

Zehr, J.P., Mellon, M.T. & Zani, S., 1998. New Nitrogen.fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by Amplification of nitrogenase (nifH) genes. Appl. Environ. Microbiol. 64 (9) 3444-3450 pp.

ANEXO I

CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DOS PRINCIPAIS GÉNEROS CIANOBACTERIANOS

The Cyanobacteria and Their Taxonomy

After Rippka et al. (1979)

Rippka divides the cyanobacteria into five sections. She describes her first two sections, I and II, as "Unicellular; cells single or forming colonial aggregates held together by additional outer cell wall layers". Her other three sections, III to V, she describes as "Filamentous; a trichome (chain of cells) which grows by intercalary cell division".
The paper by Rippka et al. 1979 contains many micrographs of cell morphologies typical of these genera.

Section I (Unicellular)

Unicellular cyanobacteria that reproduce by binary fission or by budding

unicellular cyanobacteria with cylindrical to ovoid cells that reproduce by binary transverse fission

Synechococcus Nageli 1849
* thylakoids present
* sheath absent

Gloeothece Nageli 1849
* thylakoids present
* sheath present

Gloeobacter Rippka, Waterbury & Cohen-Bazire 1974
* thylakoids absent
* sheath absent

unicellular cyanobacteria with spherical cells that divide in two or three successive planes at right angles to one another

Synechocystis Sauvageau 1892
* thylakoids present
* sheath absent

Gloeocapsa Kutzing 1843
* thylakoids present
* sheath present

unicellular cyanobacteria that reproduce by forming successive spherical buds from one pole of the ovoid cell

Chamaesiphon Braun & Grunow 1895 emend. Geitler 1925

Section II (Unicellular)

Unicellular cyanobacteria that reproduce by multiple fission

reproduction only by multiple fission

Dermocarpa Crouan & Crouan 1858
* motile baeocytes

Xenococcus Thuret 1880
* immotile baeocytes

reproduction by both binary fission and multiple fission

Dermocarpella Lemmermann 1907
* binary fission yields pear-shaped structure of one or two basal cells and one apical cell
* subsequent multiple fission of apical cell yields motile baeocytes

Myxosarcina Printz 1921
* binary fission yields cubical cellular aggregates
* subsequent multiple fission yields motile baeocytes

Chroococcidiopsis Geitler 1933
* binary fission yields cubical cellular aggregates
* subsequent multiple fission yields immotile baeocytes

Pleurocapsa group
* binary fission yields irregular cellular aggregates (pseudofilamentous)
* subsequent multiple fission yields motile baeocytes

Section III (Filamentous)

Filamentous non-heterocystous cyanobacteria that divide in only one plane

trichome helical

Spirulina Turpin 1827
* cells in trichome isodiametric, cylindrical or disc-shaped
* little or no constriction between adjacent cells
* reproduction by transcellular trichome breakage
* trichome motile
* trichome not ensheathed or thinly ensheathed

trichome straight

Oscillatoria Vaucher 1803
* cells in trichome disc-shaped and not separated by deep constrictions
* reproduction by transcellular trichome breakage
* trichome motile, not ensheathed or thinly sheathed

LPP group A
* cells in trichome disc-shaped and not separated by deep constrictions
* reproduction by transcellular trichome breakage
* trichome immotile, enclosed by heavy sheath
* motility restricted to sheathless or thinly sheathed hormogonia

Pseudoanabaena Lauterborn 1915
* cells in trichome isodiametric or cylindrical
* deep constrictions between adjacent cells
* reproduction by transcellular or intercellular trichome breakage
* trichome motile, not ensheathed
* cells contain polar gas vesicles

LPP group B
* cells in trichome isodiametric or cylindrical
* variable degree of constriction between adjacent cells
* reproduction by transcellular or intercellular trichome breakage
* do not fit the entire description:
* deep constrictions between adjacent cells
* trichome motile, not ensheathed
* cells contain polar gas vesicles

* may be with or without sheath, motile or immotile

Section IV (Filamentous)

Filamentous heterocystous cyanobacteria that divide in only one plane

reproduction by random trichome breakage; some germinate from akinetes; trichomes indistinguishable from mature vegatative trichomes

Anabaena Bory de St Vincent 1822
* heterocysts intercalary or terminal
* position of akinetes variable
* vegetative cells spherical, ovoid or cylindrical

Nodularia Mertens 1822
* heterocysts intercalary or terminal
* position of akinetes variable
* vegetative cells disc-shaped

Cylindrospermum Kutzing 1843
* heterocysts exclusively terminal and form at both ends of the trichome
* akinetes are always adjacent to heterocysts
* vegetative cells isodiametric or cylindrical

reproduction by random trichome breakage; some germinate from akinetes; form hormogonia distinguishable from mature trichomes by absence of heterocysts and one or more of the following characters: rapid gliding motility, smaller cell size, cell shape and gas vacuolation

Nostoc Vaucher 1803
* hormogonia give rise to young filaments with terminal heterocysts at both ends of the cellular chain
* vegetative cells spherical, ovoid or cylindrical
* akinetes (if produced) are not initiated adjacent to heterocysts and are often formed in chains

Scytonema Agardh 1824
* hormogonia give rise to young filaments with terminal heterocyst at only one end of the cellular chain
* mature trichome composed of cells of even width
* heterocysts predominantly intercalary
* vegetative cells disc-shaped, isodiametric or cylindrical

Calothrix Agardh 1824
* hormogonia give rise to young filaments with terminal heterocyst at only one end of the cellular chain
* mature trichome tapers from base, which bears a terminal heterocyst, to apex
* vegetative cells disc-shaped, isodiametric or cylindrical

Section V (Filamentous)

Filamentous heterocystous cyanobacteria that divide in more than one plane

reproduction by random trichome breakage, by formation of hormogonia and (if produced) by germination of akinetes

Chlorogloeopsis Mitra & Pandey 1966
* hormogonia composed of small cylindrical cells which enlarge and become spherical
* heterocysts develop in terminal and intercalary positions
* cells in mature trichome divide in more that one plane
* associated detachment of groups of cells leads to irregular Gloeocapsa-like aggregates containing terminal heterocysts
* hormogonia are produced within such aggregates

Fischerella Gomont 1895
* hormogonia composed of small cylindrical cells which enlarge and become rounded
* heterocysts develop almost exclusively in an intercalary position
* cells in mature trichome divide in more that one plane to produce a partly multiseriate trichome with lateral uniseriate branches
* heterocysts in the primary trichome are predominantly terminal or lateral
* hormogonia are produced from the ends of trichomes or from lateral branches

References

Rippka, Rosmarie, Josette Deruelles, John B. Waterbury, Michael Herdman & Roger Y. Stanier (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology Vol. 111 p. 1-61

(Retirado de www-cyanosite.bio.purdue.edu)

ANEXO II

PROTOCOLO PARA O PROCEDIMENTO DE ANÁLISE ELISA, FORNECIDO CONJUNTAMENTE COM O KIT EMPK

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC.
EnviroGard® Microcystins Plate Kit
75400

ded Use
nviroGard Microcystins Plate Kit is a quantitative ory test for the detection of microcystins residues in

Principles
nviroGard Microcystins Plate Kit is calibrated with a non-icrocystin-LR surrogate at levels equivalent to 0.1, 0.4, parts per billion (ppb) microcystin-LR. The kit uses poly- antibodies which bind either microcystins or a ystin-enzyme conjugate. These antibodies are immobilized valls of the test wells. Microcystins in the sample compete e microcystin-enzyme conjugate for a limited number of dy binding sites.

he same number of antibody binding sites are available on est well, and each test well receives the same number of ystin-enzyme conjugate molecules, a sample which s a low concentration of microcystins allows the antibody d many microcystin-enzyme conjugate molecules. The s a dark blue solution. Conversely, a high concentration of ystins allows fewer microcystin-enzyme conjugate les to be bound by the antibodies, resulting in a lighter lution.

: Color is inversely proportional to Microcystins concentration.

Darker color = lower concentration.
Lighter color = higher concentration.

rmance Characteristics
nviroGard Microcystins Plate Kit does not differentiate n microcystin-LR and other microcystin variants but their presence to differing degrees. The following table the concentration at 50% inhibition (50% B_0) for these unds. Concentration is in ppb.

VARIANTS	50% B_0 (ppb)
MCYST-LR	0.31
MCYST-RR	0.32
MCYST-YR	0.38
NODLN	0.47

utions
icrocystins in environmental samples may be toxic. Use equate precautions when handling these samples.
ore all plate kit components at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) hen not in use.
o not store test kit components for more than 8 hours at mbient temperatures (20°C to 37°C or 68°F to 99°F). Do t expose **substrate** to **direct sunlight**.
o not freeze plate kit components or expose them to mperatures greater than 37°C (99°F).
low all reagents to reach ambient temperature (18°-27°C 64°-81°F) before beginning the test.

- Do not use plate kit components after the expiration date.
- Do not use reagents or test well strips from one plate kit with reagents or test well strips from a different plate kit.
- Do not dilute or adulterate test reagents or use samples not called for in the test procedure.
- Always use a calibrator which has a matrix comparable to that of your sample.
- Use approved methodologies to confirm results.
- Some solutes and particulates found in untreated ground or surface waters may affect the sensitivity level of this plate kit.

Materials Provided
You should have the following items in your plate kit:

8 antibody-coated strips (12 wells each), in strip holder
1 vial of Negative Control
1 vial of 0.1 ppb Microcystin-LR Calibrator
1 vial of 0.4 ppb Microcystin-LR Calibrator
1 vial of 1.6 ppb Microcystin-LR Calibrator
1 vial of Microcystin-Enzyme Conjugate
1 vial of Substrate
1 vial of Stop Solution

Materials You Provide
You also need these items:

- 10 cc syringes
- Millex® HV_{13} filter units (0.45 micron, 13 mm, non-sterile)
- disposable-tip pipette and disposable tips that will measure 100 microliters (µL)
- marking pen (indelible)
- tape or Parafilm®
- timer (1 hour and 30 minutes)
- tap or distilled water for rinsing wells
- microtiter plate reader or strip reader
- calculator (optional)
- a multi-channel pipette (optional)
- microtiter plate washer (optional)
- orbital shaker (optional)
- solid phase extraction devices (optional)

Sample Preparation

- Water samples should be filtered to remove particulates. A syringe-operated Millex-HV$_{13}$ filter is suitable for this purpose.
- If a lower sensitivity for microcystin is required (<0.1 ppb), a solid-phase extraction device such as a C_{18} reverse phase Sep-Pak is necessary to concentrate the sample (see "References", # 2).

Assay Procedure

The raised markings on the strip holder identify the well location.

1. Two strips may be used to run the Negative Control, three Calibrators and eight samples in duplicate. For example:
   Negative Control (NC)
   Calibrator 1 (C1) = 0.1 ppb calibrator
   Calibrator 2 (C2) = 0.4 ppb calibrator
   Calibrator 3 (C3) = 1.6 ppb calibrator
   Samples (S1, S2, S3, S4, S5, S6 etc.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	NC	C1	C1	C2	C2	C3	C3	S1	S1	S2	S2
B	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6	S7	S7	S8	S8
C												
D												
E												
F												
G												
H												

NOTES:

- When you use fewer than eight strips, remove the unneeded strips and store them at 4°C to 8°C in the re-sealable plastic bag (with desiccant) provided.
- If you are running more than three strips, it is recommended that you use a multi-channel pipette in steps 2, 4, 8, and 10 to deliver the volume as specified.

2. Add 100 µL of Negative Control (NC) and each Calibrator (C1 to C3) and 100 µL of each sample (S1 to S8) to their respective wells, as shown above.
3. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 30 minutes.
4. After incubation, carefully remove the covering. Add 100 µL of Microcystin-enzyme Conjugate to each well.
5. Thoroughly mix the contents of the wells by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop. Be careful not to spill the contents.
6. Cover the wells with new tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 30 minutes.
7. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Flood the wells completely with tap or distilled water, then shake to empty. Repeat this wash step four times. Invert the plate and tap out as much water as possible. Alternatively, use microtiter plate washer for the wash steps.
8. Add 100 µL of Substrate to each well beginning with the Negative Control (NC) and calibrators (C1 to C3), then the samples (S1 to S8).
9. Thoroughly mix the contents of the wells, as in step 5. Cover the wells with new tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes

   WARNING: Stop solution is 1.0 N HCl.

10. Add 100 µL of Stop Solution to each well and mix thoroughly. This will turn the solution yellow.
11. Read the plate within 30 minutes after you add the Stop Solution.

Interpret The Results

Spectrophotometric Measurement and Analysis

1. Adjust the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600 nm or 650 nm as the "reference" wavelength.)
2. If the plate reader does not auto-zero on air, zero the instrument against 200 µL water in a blank well, then measure and record the optical density (OD) of each well's contents. Or, measure and record the OD in every well, then subtract the OD of the water blank from each of the readings.
3. If the microtiter plate reader you are using has data reduction capabilities, use a **semi-log** curve fit for the standard curve. You can also calculate the results manually as described in the next section.

Calculate the Results

1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, and calculate the $\%B_O$ as follows:

$$\%B_o = \frac{\text{average OD of calibrator or sample}}{\text{average OD of negative control}} \times 100$$

   The $\%B_O$ calculation is used as a means of equalizing different runs of an assay. While the raw OD readings of negative controls, calibrators, and samples are likely to differ from run to run, the $\%B_O$ relationship of calibrators and samples to the Negative Control should remain fairly constant.

NOTE: The %CV [Coefficient of Variation = (standard deviation/mean) x 100] for the calibrator OD values should not be > 15%.

2. Graph the $\%B_O$ of each Calibrator against its microcystin concentration on a semi-log scale (see "Sample Calculations").

ANEXO III

EXEMPLO DE UM RELATÓRIO FINAL, ESPECIFICANDO OS DADOS TÉCNICOS, OBTIDO APÓS UMA ANÁLISE DE HPLC

Channel 1 Noise: Not Measured
Channel 1 Drift: Not Measured

Configuration parameters:
Interface Module: D-7000
Channel 1 Detector: L-7450
Column Oven: None
Pump A: L-7100
Number of Solvents pump A: 2
Gradient Mode: Low
Channel 2 Detector: None
Autosampler: L-7200
Pump B: None
Number of Solvents pump B: 1

Method Information:
Method Name: microcystins
Column Type: LiChrocart 250-4
Description:
identification of microcystins
Developed by: V. Vasconcelos

Pump Setup:
Main Pump (A) Pressure Limit: 0 to 412 bar

Pump A (L-7100):
Solvent A: acetonitrile 0,05% TFA
Solvent B: water 0,05% TFA

Pump A (L-7100):
Pump Solvent and Event Table

Time (min)	%aceto	%water	Flow (ml/min)	Event 1	Event 2	Event 3	Event 4
0,0	28	72	1,000				
5,0	35	65	1,000				
30,0	70	30	1,000				
30,5	100	0	1,000				
35,0	100	0	1,000				
36,5	28	72	1,000				
45,0	28	72	1,000				

Autosampler Setup (L-7200):
Syringe Speed: 5
Syringe Volume: 500 ul
Lead Volume: 30,00 ul
Needle Wash Strokes: 1
Injection Port Wash Stroke: 1
Needle Down Speed: Fast
Injection Method: Cut
Rear Volume: 30,00 ul
Needle Wash Speed: 5
Injection Port Wash Speed: 5

Channel 1 Detector (L-7450):
Spectral Bandwidth: 4 nm
Absorbance Mode: Normal(2.0AU)
Wavelength Range: 220 to 400 nm
Start Time: 0,00 min
Spectral Interval: 1600 msec
Auto Zero before Injection: YES
Monitoring Wavelenth: 238 nm
Stop Time: 30,00 min

Method DP for channel 1

Calculation Method:
Calculation Method: Ext Std
STD peaks identification rule: Highest peak
UNK peaks identification rule: Closest peak
Calibration order of curve fit: Linear
Force through zero: NO
Maximum calibration levels required; 2
Concentration Weight: 1.0
Peak Quantitation: Area
Peak identification Window: % Time
Update RT in component Table: YES

Do blank subtraction: YES Use blank from same series: YES

omponent Table

T min)	Window (%)	Name	Func1	Func2	Mol. Weight	E-Conc	Tolerance (%)
4,04	10,00	mcyst-LR			1,000		

oncentration Table Data: Dilution factor for STD1: 1,000 *

Concentration Table:

ame	Std1	Std2	Std3
cyst-LR	1,000	2,000	0,100

oefficients table

ame	A0	A1	A2	A3	R-sqr
cyst-LR	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,0000

ntegration Table

ime min)	Function	Value/Status
,00	NOISE	10
,00	SMOOTHING	OFF
,00	SENSITIVITY	20
,00	N-METHOD	0
,00	INTEGRATION-INHIBIT	ON
,00	INTEGRATION-INHIBIT	OFF

DAD Processing Setup: Peak purity check enabled: YES
Purity threshold: 0,95
Peak height percent for side spectra: 20
Delete DAD data after reporting: NO
Chromatogram to create: Fixed at 238 nm

DAD Display Format:
Time range: 3,00 to 30,00 min
Offset: 0,0
Auto Mark Peak WL: NO
3-D tilt: 50
3-D mirror: NO
Report Spectra: Peak top and sides.

Absorbance scale (Au): Auto
Wavelength range: 220 to 400 nm
Spectrum Display: Absorbance
3-D resolution: Medium
3-D rotation: 30
Display spectra only: NO

Perform system suitability test : NO
Perform module performance test : NO
Perform data diagnosis : NO

Chromatogram Display Format: Autoscale: YES
Autoscale Time Range: 3,00 to 30,00 min

Use alternate scale: NO
Auto zero: NO
Scale to Full Chrom Time Range: NO
Time scale range: 3,00 to 30,00 min
Peak rejection level: 0 uV * sec
Baseline overlay: YES
Peak start-end markers: YES
Marker-In Signals: NO
Peak label: Time
Show integration time table: NO
Show sampling period time table: NO
Show gradient curves: NO
Report channel 1 labels in the chromatogram ovelay graph.

Report Format:
Reported peaks: All Peaks
Name of quantified unknown peaks:
Vial summary average type: Mean
Report statistics on repetitive injections retention times: NO
Report statistics on repetitive injections concentrations: NO
Report statistics on unknown injections retentions times: NO
Report statistics on unknown injections concentrations: NO
Use primary layout: YES
Use secondary layout: NO
Print primary layout report: NO
Print secondary layout report: NO
Acquisition DDE: NO
Acquisition macro name:
Reprocess DDE: NO
Reprocess macro name:
Concentration 1 unit name: ug
Concentration 2 unit name:
Concentration 1 scale factor: 1,0000
Concentration 2 scale factor: 1,0000
Injection report column 1 header: PK-NUM
Injection report column 2 header: RT
Injection report column 3 header: AREA
Injection report column 4 header: CONC1
Injection report column 5 header: BC

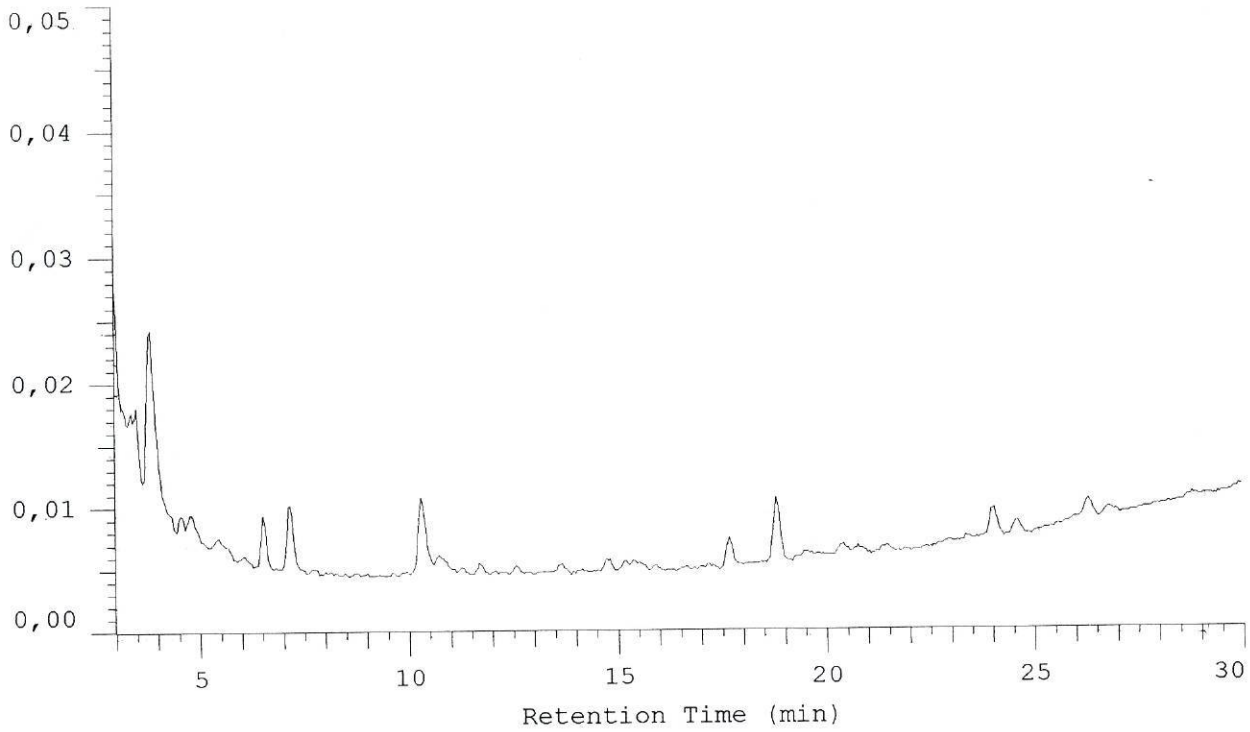
Date/time	Event
06-09-01 15:03	Data Processing Warning: mcyst-LR peak not detected in sample mcyst-LR for channel 1.

ANEXO IV

ESPECTROS DE ABSORVÂNCIA, OBTIDOS POR HPLC, PARA AS ESTIRPES QUE NÃO DEMONSTRARAM PICOS COM ABSORVÂNCIA MÁXIMA AOS 238nm

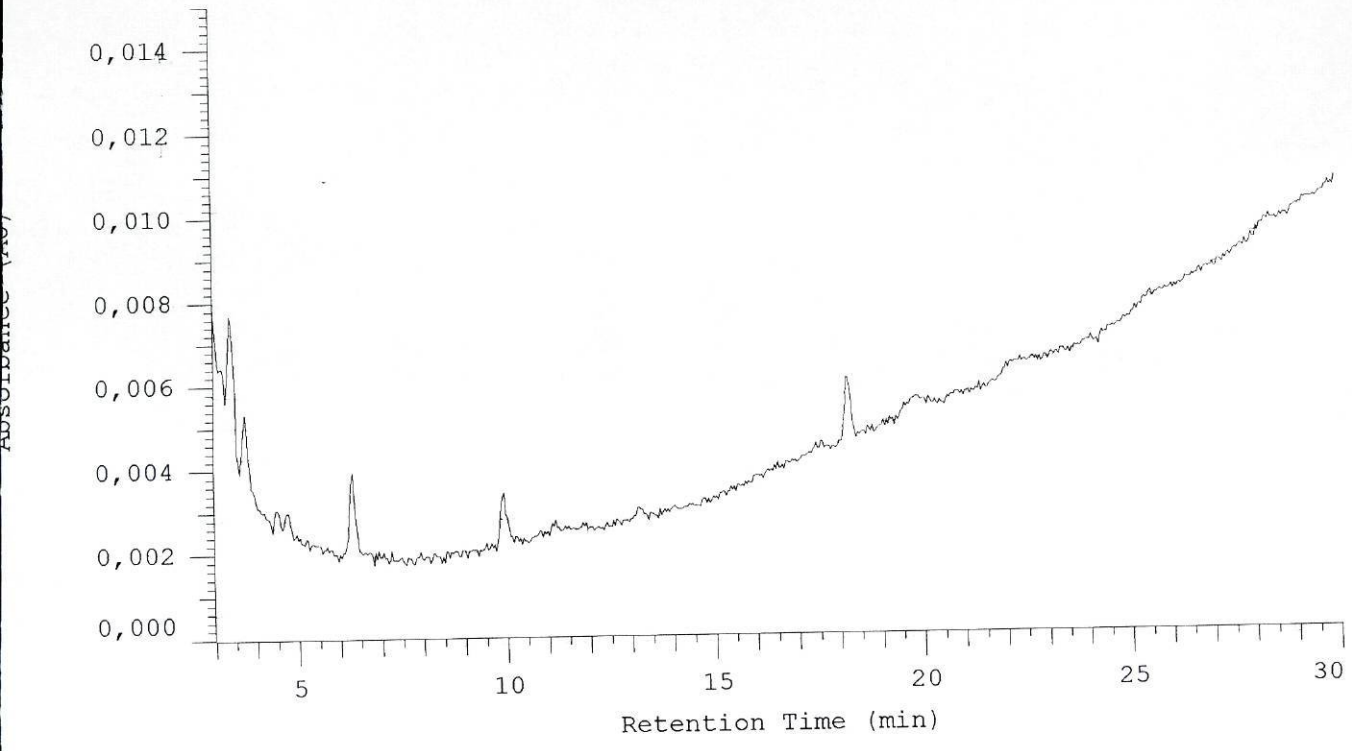
microcystins - Vial 27 Inj 1 J1 3X - Fixed 238 nm

urrent Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0076
ata Desc.: DAD 3-D Data
ial Number: 27 Inj Number: 1 Sample Name: J1 3X



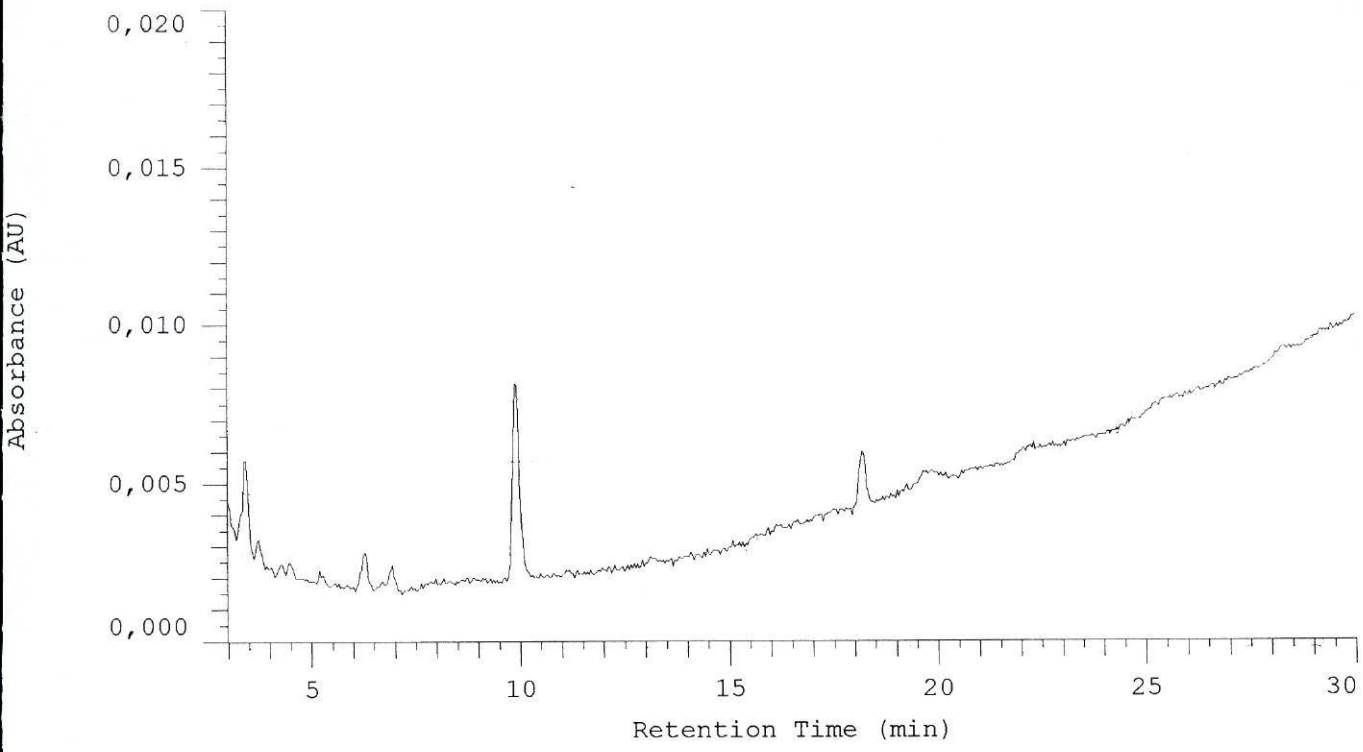
microcystins - Vial 28 Inj 1 J5 10X - Fixed 238 nm

urrent Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0076
ata Desc.: DAD 3-D Data
ial Number: 28 Inj Number: 1 Sample Name: J5 10X



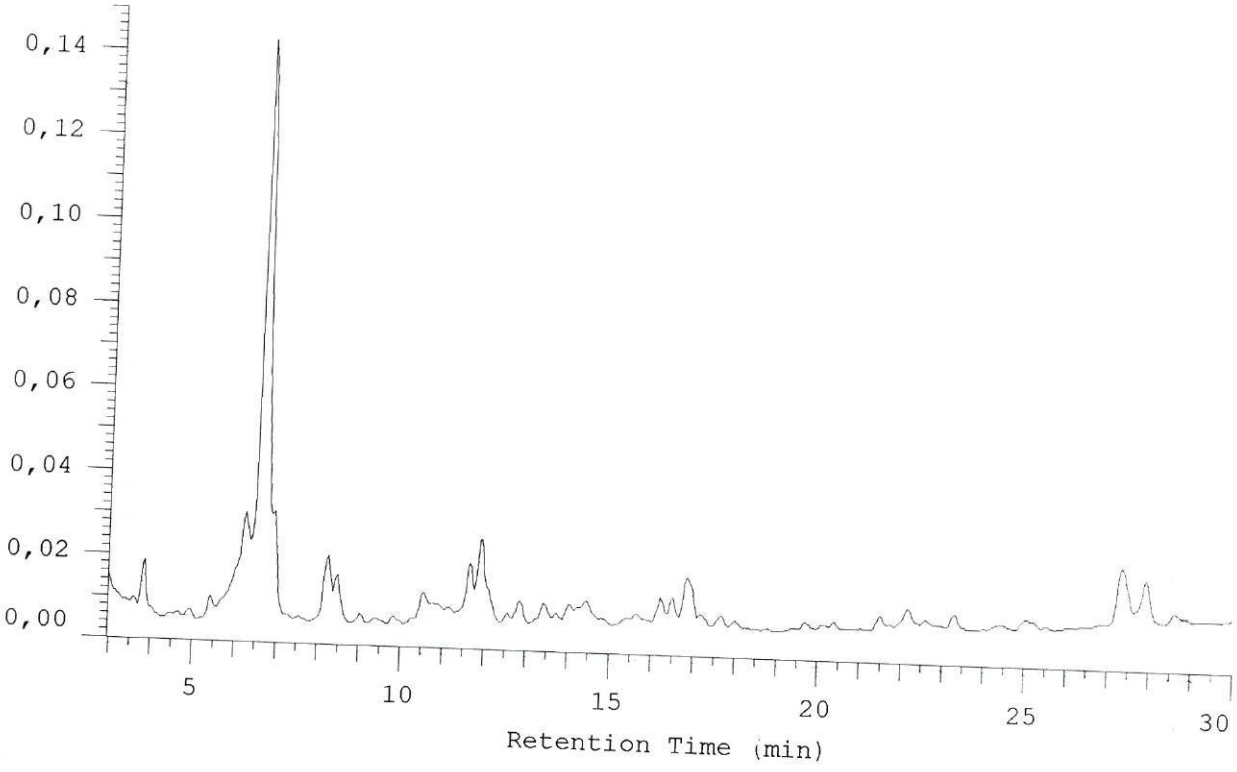
microcystins - Vial 29 Inj 1 J15 10X - Fixed 238 nm

Current Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0076
Data Desc.: DAD 3-D Data
Vial Number: 29 Inj Number: 1 Sample Name: J15 10X



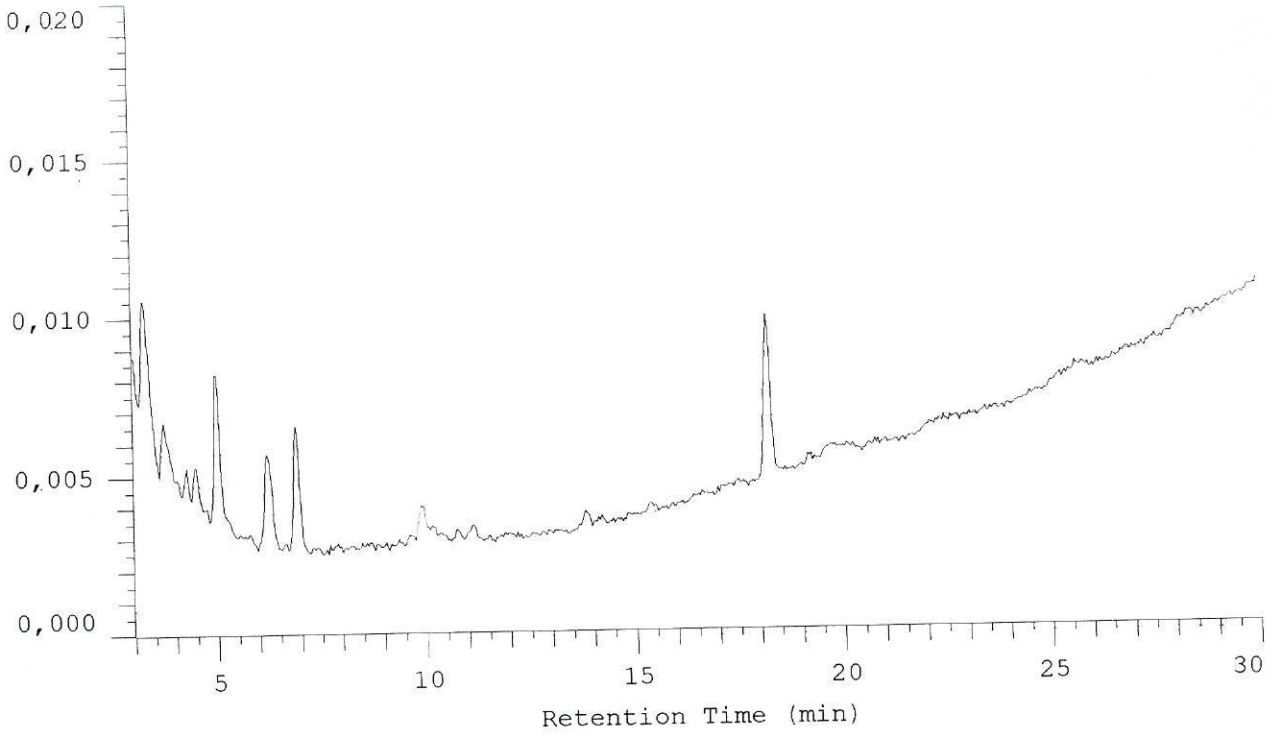
microcystins - Vial 5 Inj 1 J19 - Fixed 238 nm

Current Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0021
Data Desc.: DAD 3-D Data
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: J19



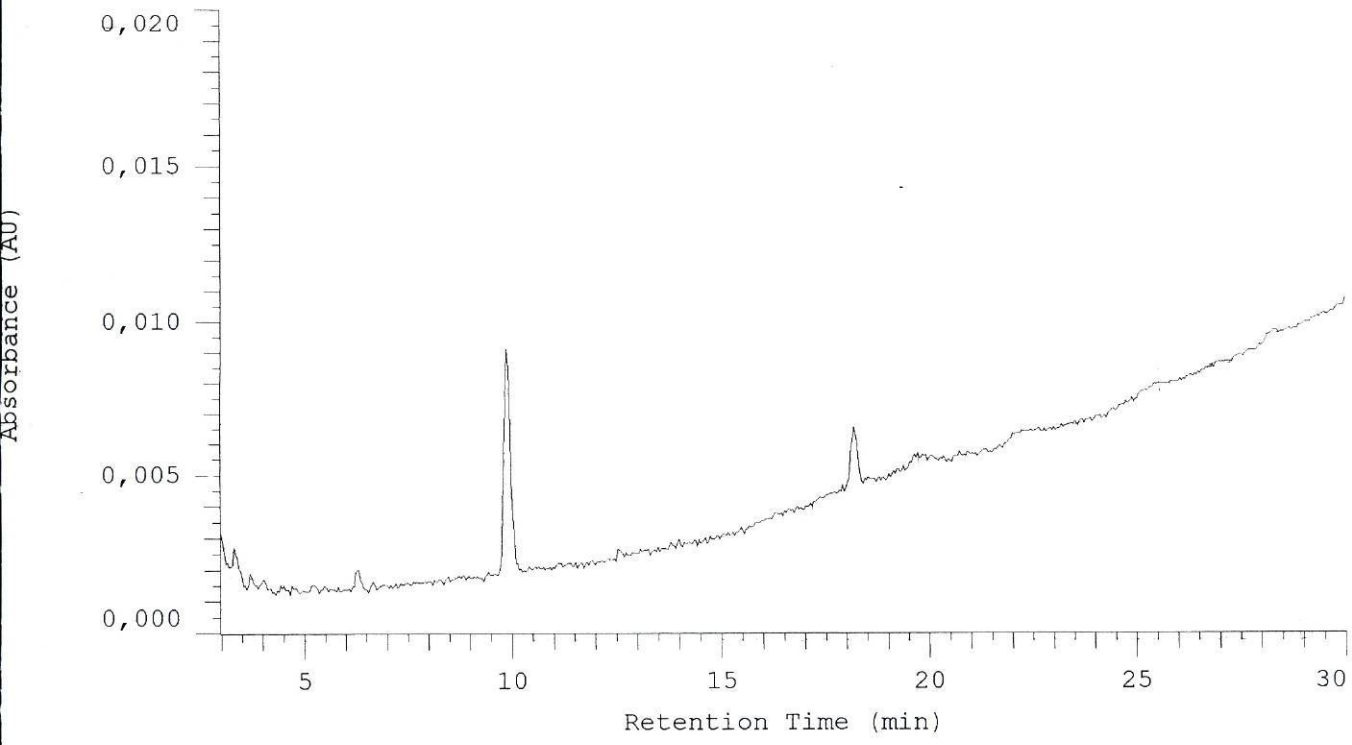
microcystins - Vial 30 Inj 1 J23 10 X - Fixed 238 nm

ırrent Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0076
ata Desc.: DAD 3-D Data
al Number: 30 Inj Number: 1 Sample Name: J23 10 X



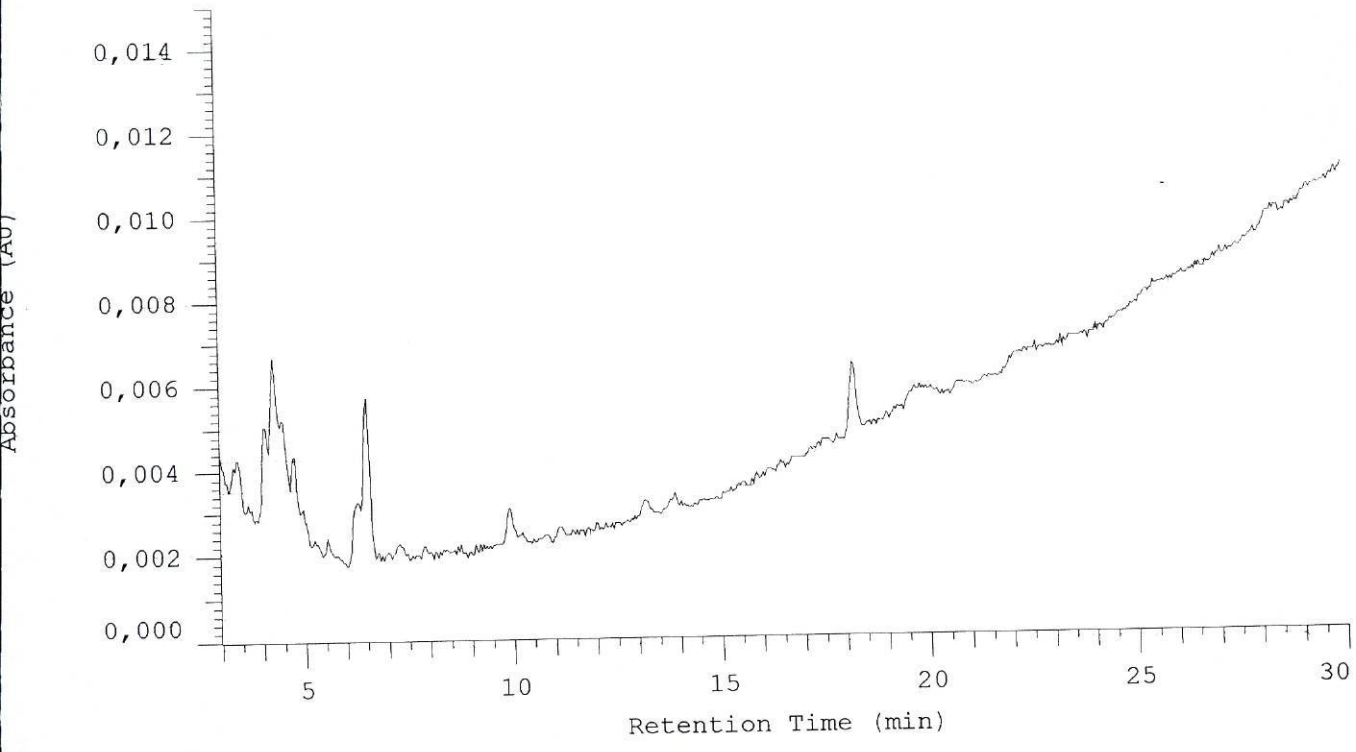
microcystins - Vial 31 Inj 1 J27 10X - Fixed 238 nm

Current Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0076
Data Desc.: DAD 3-D Data
Vial Number: 31 Inj Number: 1 Sample Name: J27 10X



microcystins - Vial 32 Inj 1 J34 10 X - Fixed 238 nm

urrent Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Vitor\DATA\0076
ata Desc.: DAD 3-D Data
ial Number: 32 Inj Number: 1 Sample Name: J34 10 X



ANEXO V

VALORES OBTIDOS PARA AS DIFERENTES CÉLULAS DE TODAS AS ESTIRPES MEDIDAS

Tabela A-I *- Comprimento das células vegetativas (μm)*

	x média	**sigma**	**intervalo de conf. 95%**
J1	3,11	0,46	2,99; 3,23
J4	2,99	0,53	2,86; 3,13
J5	3,5	1,55	3,1; 3,9
J15	4,12	0,56	3,98; 4,27
J19	4,87	0,89	4,64; 5,1
J21	5,57	1,08	5,29; 5,85
J23	3,53	0,8	3,32; 3,74
J24	6,2	2,06	5,67; 6,73
J27	4,64	0,85	4,42; 4,85
J34	6,17	1,88	5,68; 6,65
J39	7,29	2,10	6,75; 7,83
J40	6,66	2,02	6,14; 7,18

Tabela A-II *- Largura das células vegetativas (μm)*

	x média	**sigma**	**intervalo de conf. 95%**
J1	4,22	0,48	4,1; 4,34
J4	3,71	0,33	3,62; 3,79
J5	4,23	0,44	4,12; 4,35
J15	4,66	0,48	4,54; 4,78
J19	2,86	0,28	2,79; 2,93
J21	3	0,4	2,89; 3,1
J23	3,23	0,35	3,14; 3,32
J24	2,09	0,36	1,99; 2,18
J27	4,11	0,66	3,94; 4,28
J34	2,3	0,45	2,18; 2,41
J39	2,4	0,55	2,25; 2,54
J40	1,73	0,24	1,67; 1,8

Tabela A-III - *Comprimento dos heterocistos (μm)*

	x média	sigma	intervalo de conf. 95%
J1	n.o.		
J4	n.o.		
J5	4,42	1,39	4,06; 4,78
J15	n.o.		
J19	4,19	1,36	3,83; 4,54
J21	5,34	0,94	5,1; 5,58
J23	n.o.		
J24	n.o.		
J27	n.o.		
J34	n.o.		
J39	n.o.		
J40	n.o.		

legenda: n.o. não foram observados

Tabela A-IV - *Largura dos heterocistos (μm)*

	x média	sigma	intervalo de conf. 95%
J1	n.o.		
J4	n.o.		
J5	1,92	0,36	1,83; 2,02
J15	n.o.		
J19	2,56	0,88	2,33; 2,78
J21	3,1	0,34	3,01; 3,19
J23	n.o.		
J24	n.o.		
J27	n.o.		
J34	n.o.		
J39	n.o.		
J40	n.o.		

legenda: n.o. não foram observados

Tabela A-V - Comprimento dos acinetos (μm)

	x média	sigma	intervalo de conf. 95%
J1	n.o.		
J4	n.o.		
J5	11,07	3,21	9,87; 12,27
J15	6,85	1,63	6,43; 7,27
J19	9,7	6,33	8,07; 11,34
J21	13,02	10,98	10,19; 15,86
J23	n.o.		
J24	7,13	2,48	6,5; 7,77
J27	6,99	2,65	6,3; 7,67
J34	9,35	3,74	8,39; 10,32
J39	7,92	2,14	7,36; 8,6
J40	8,56	2,65	7,87; 9,24

legenda: n.o. não foram observados

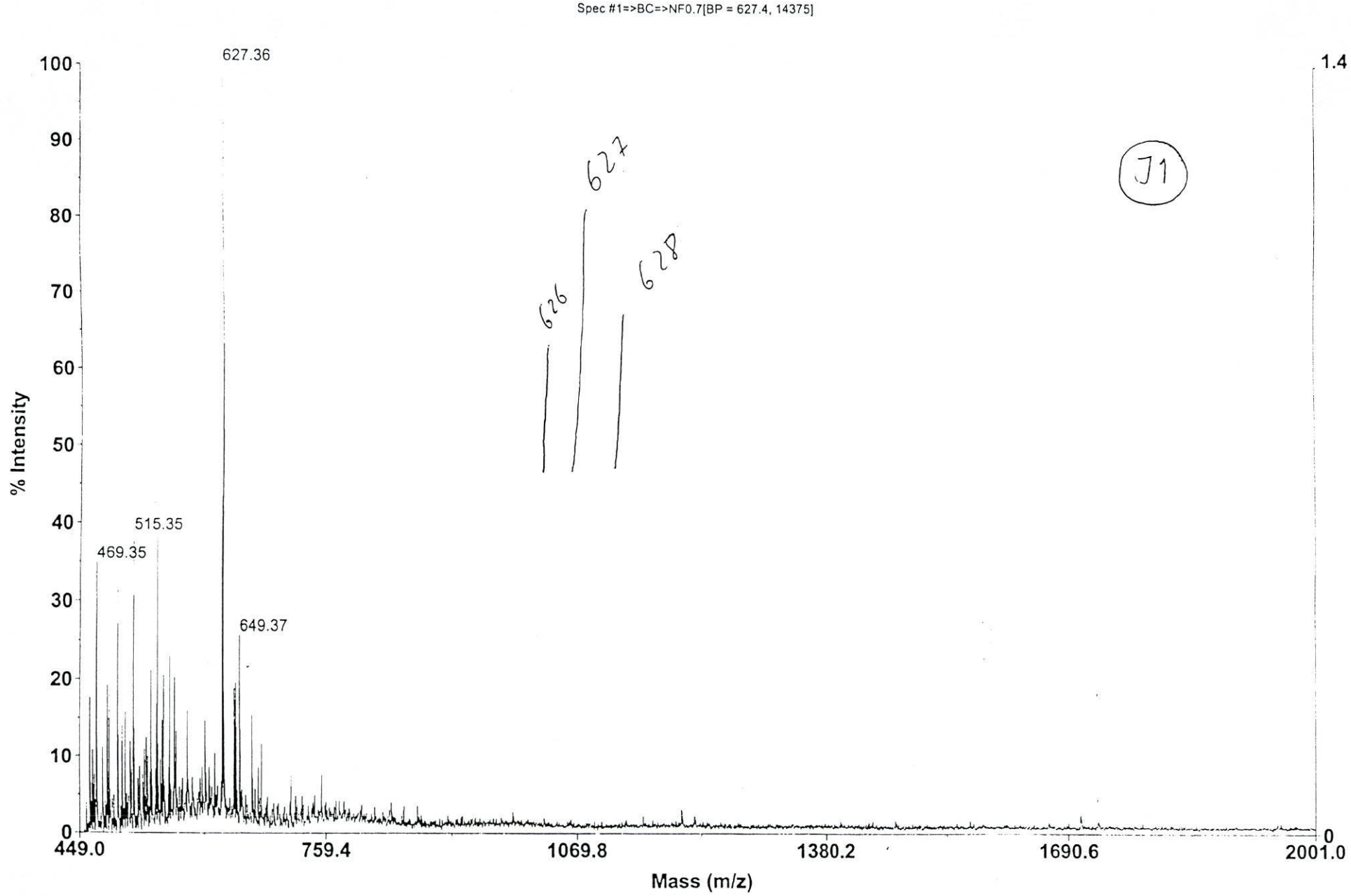
Tabela A-VI - Largura dos acinetos (μm)

	x média	sigma	intervalo de conf. 95%
J1	n.o.		
J4	n.o.		
J5	3,52	0,82	2,88; 3,44
J15	6,85	1,63	6,43; 7,27
J19	3,13	1,69	2,69; 3,56
J21	3,65	0,87	3,43; 3,88
J23	n.o.		
J24	2,54	0,61	2,38; 2,7
J27	6,99	2,65	6,3; 7,67
J34	3,04	0,85	2,82; 3,26
J39	3,49	1,2	3,18; 3,8
J40	2,88	1,39	2,52; 3,24

legenda: n.o. não foram observados

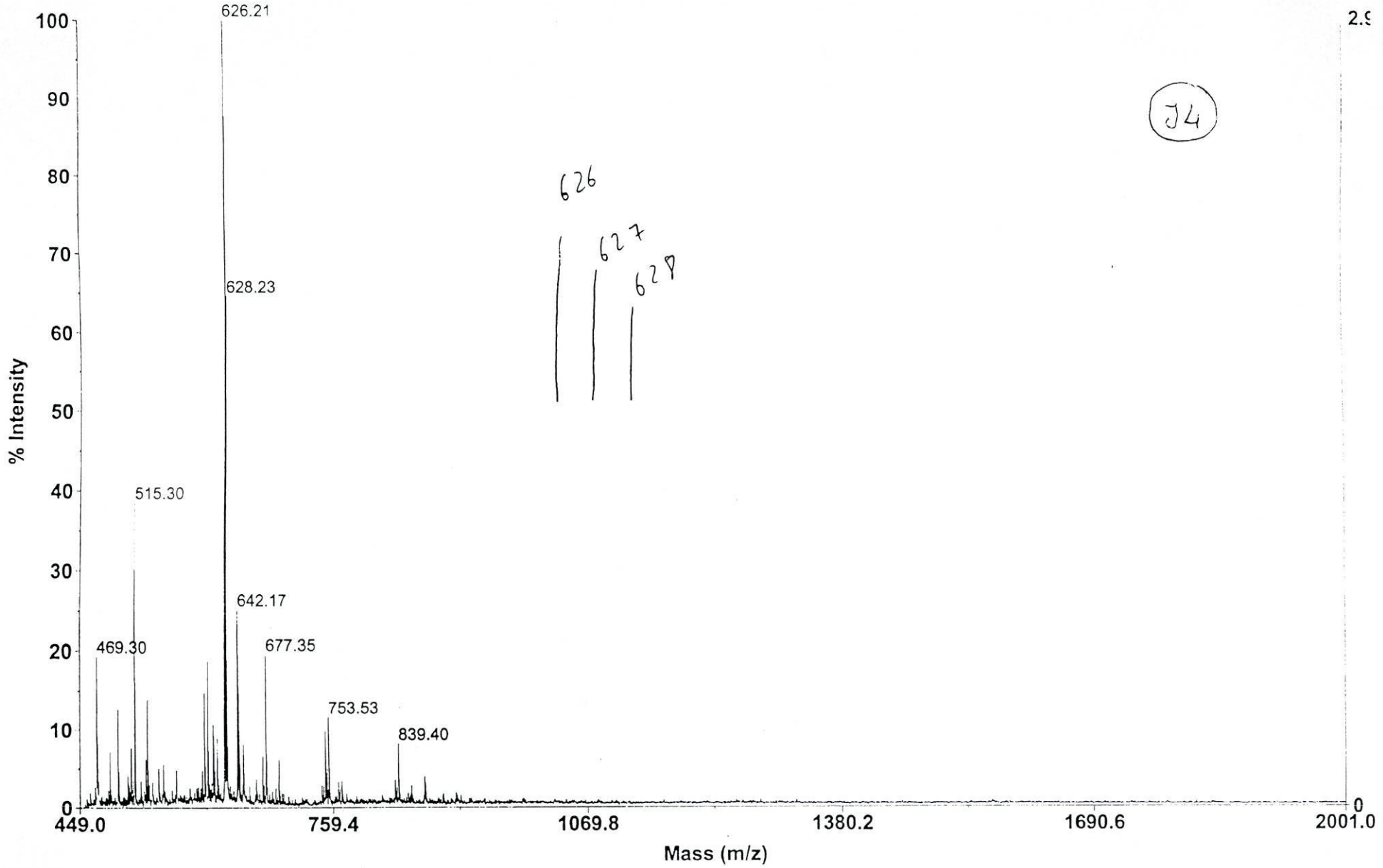
ANEXO VI

ESPECTROS DE MASSA MOLECULAR DAS VÁRIAS ESTIRPES ANALISADAS POR MALDI-TOF-MS

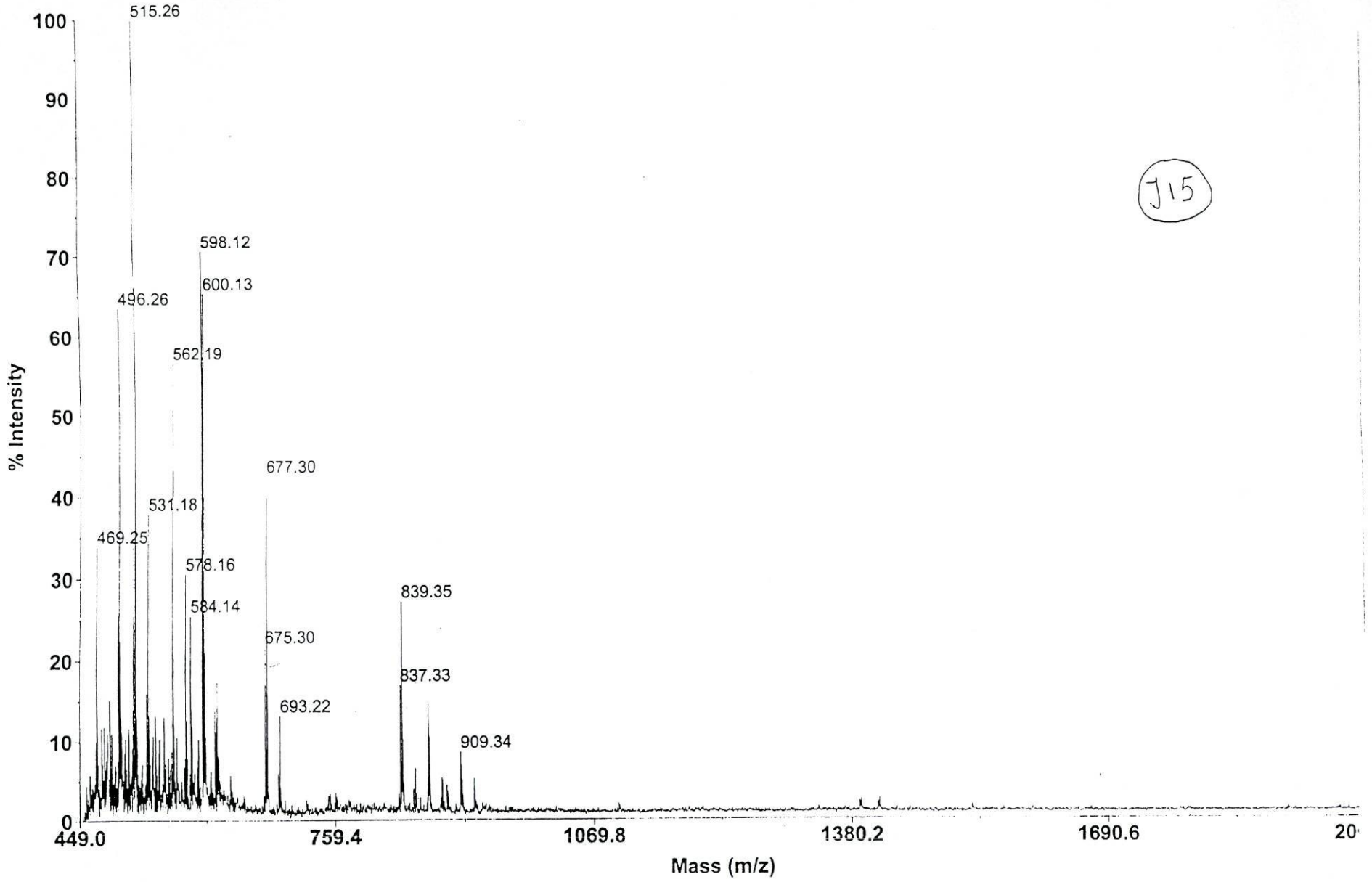


M. Saker, I1
E:\...\37103.dat
Acquired: 10:11, January 04, 2001

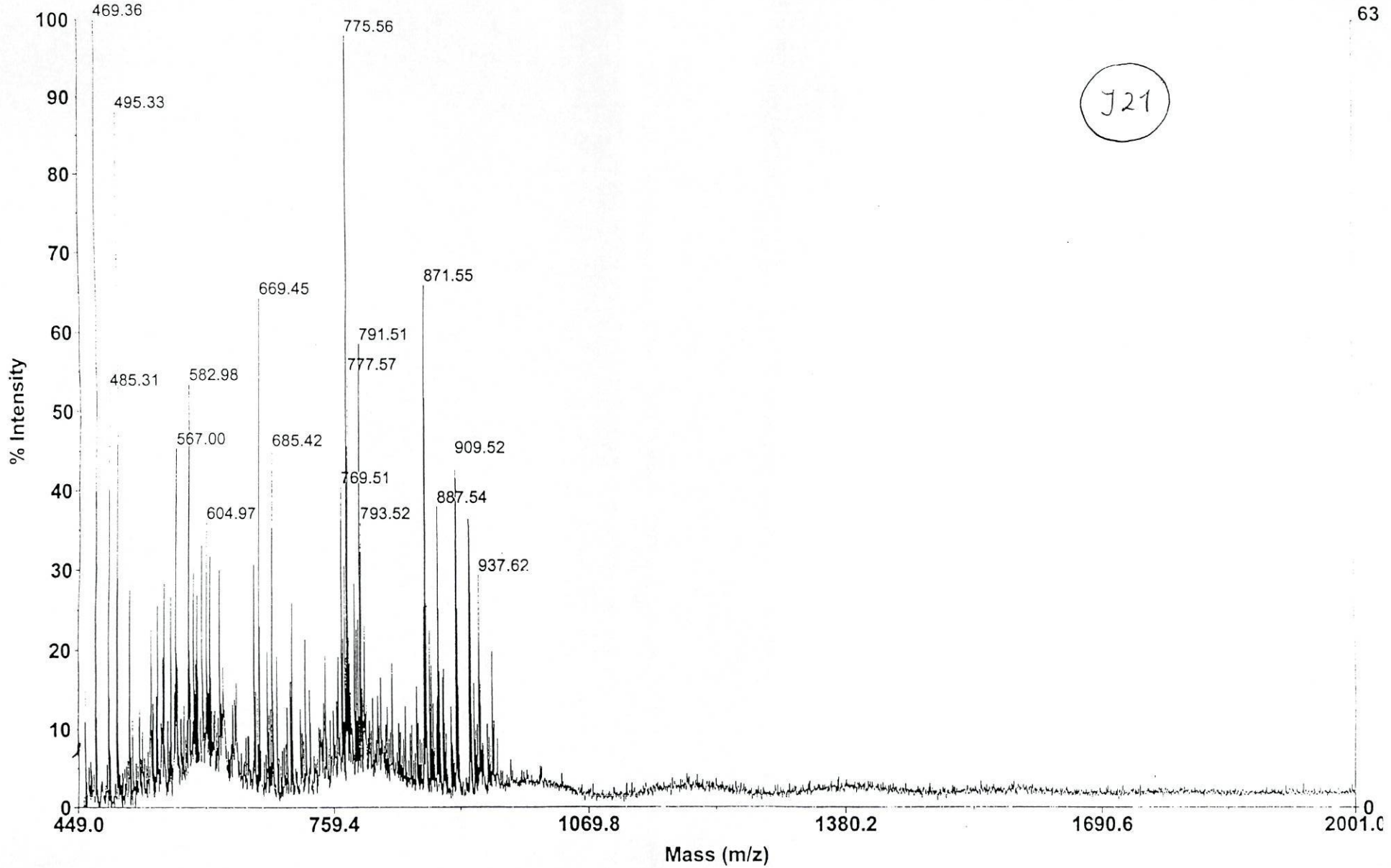
Spec #1=>BC=>NF0.7[BP = 626.2, 29378]



M. Saker, I4
E:\...\37104.dat
Acquired: 10:13, January 04, 2001

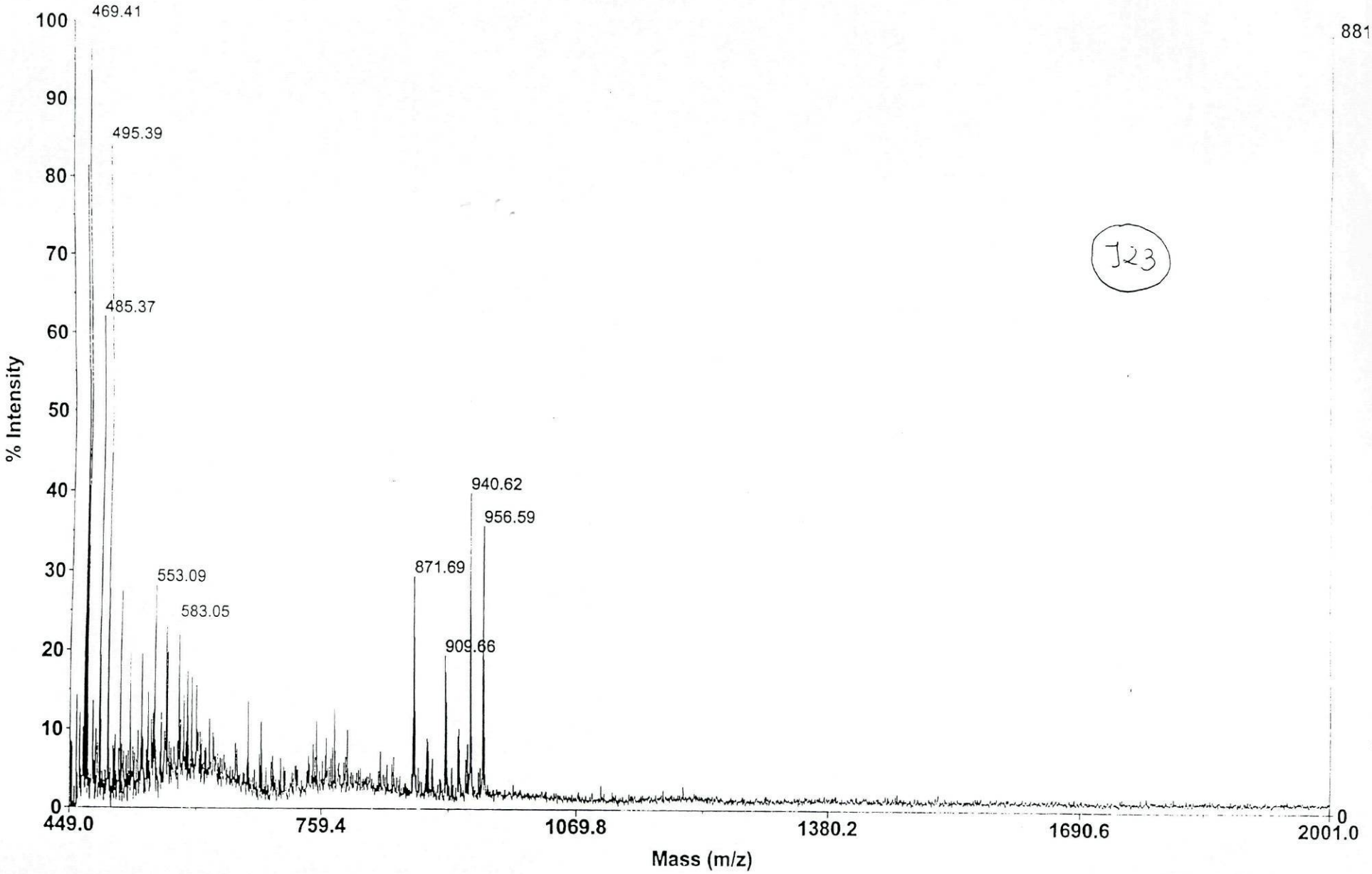


M. M. Saker, I15
E:\... E:\...\37105.dat
Acc Acquired: 10:15, January 04, 2001

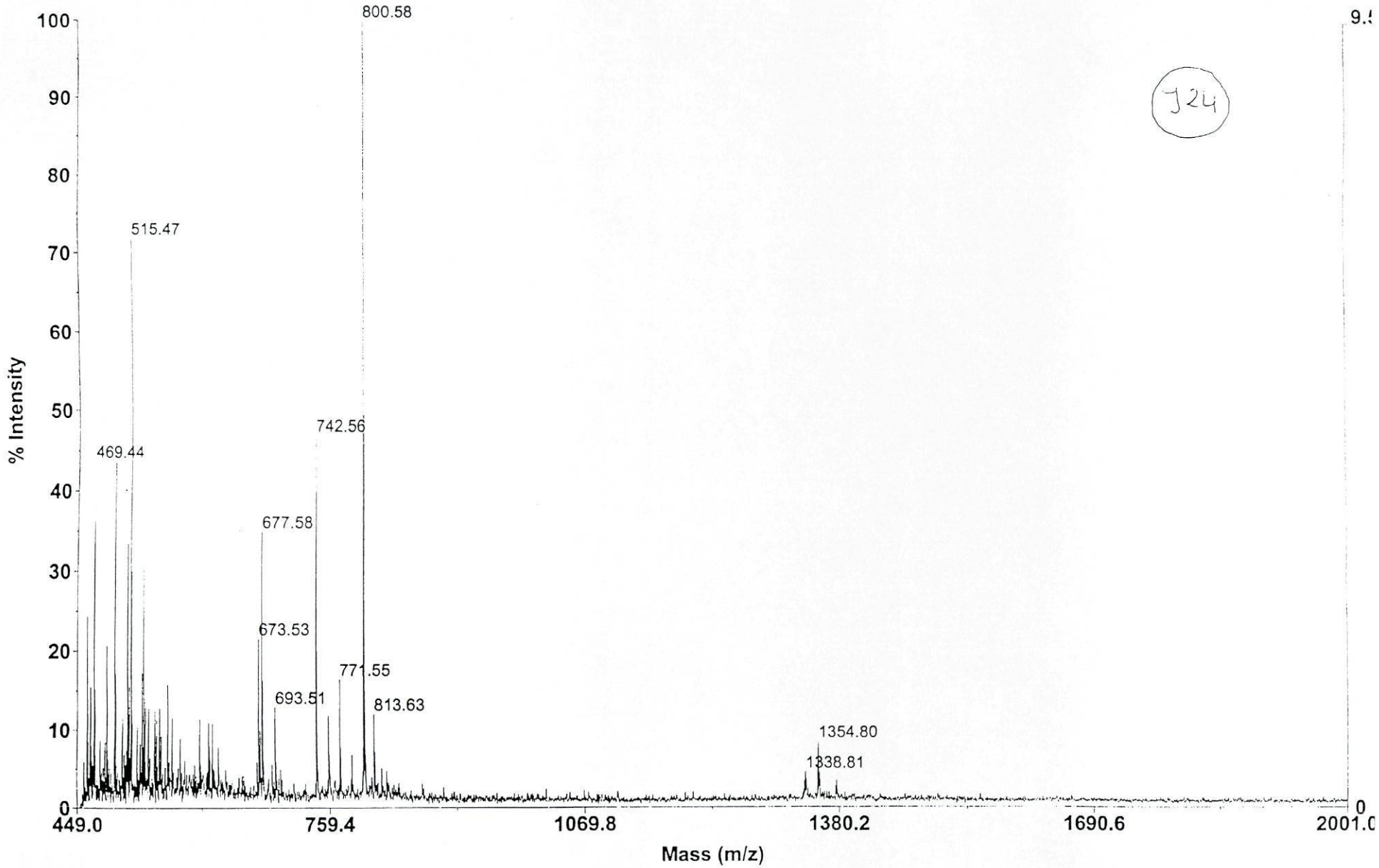


J21

M. Saker, I21
E:\...\37106.dat
Acquired: 10:17, January 04, 2001



. Saker, I23
\...\37107.dat
:quired: 10:19, January 04, 2001



M. Saker, I24
E:\...\37108.dat
Acquired: 10:20, January 04, 2001

ANEXO VII

ESPECTRO DE MASSA MOLECULAR OBTIDO POR FAB-MS DA ESTIRPE J4

[Mass Spectrum]
Data : KB267 Date : 06-Dec-101 20:22
Sample: Namikoshi J4 RT=27-30
Note : Gly:mNBA=1:1
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Regular [MF-Linear]
RT : 0.42 min Scan# : (1,6) Temp : 0.0 deg.C
BP : m/z 93.0807 Int. : 400.00
Output m/z range : 364.3000 to 655.7150 Cut Level : 0.00 %

