

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
NUTRIENTES NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
TOXINAS POR *Microcystis aeruginosa* Kütz
emend. Elenkin (Cyanophyceae), EM CONDIÇÕES
DE CULTIVO.

DÉBORA GUERREIRO AGUIAR



Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biotecnologia Vegetal.

Rio de Janeiro

1995

EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
NUTRIENTES NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
TOXINAS POR *Microcystis aeruginosa* Kütz emend.
Elenkin (Cyanophyceae), EM CONDIÇÕES DE
CULTIVO.

DÉBORA GUERREIRO AGUIAR

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia
Vegetal do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biotecnologia Vegetal.

Rio de Janeiro

1995

FICHA CATALOGRÁFICA

AGUIAR, D.G.

EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE TOXINAS POR *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenkin (Cyanophyceae), EM CONDIÇÕES DE CULTIVO.

DÉBORA GUERREIRO AGUIAR. Rio de Janeiro, UFRJ, 1995.

74 p.: il., figuras.

Tese de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Palavras-Chave: 1. Toxinas de Cianofíceas. 2. Cianobactéria. 3. Microcistinas. 4. Eutroficação. 5. *Microcystis aeruginosa*. I. Aguiar, D.G.
II. Título

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Sandra Maria F. O. Azevedo

A você Sandra,
minha orientadora e
amiga, que tanto me ensi-
nou, meu muito obrigado e
que este seja apenas o início de
muitos "produtos científicos" conjuntos.

"Homem algum é uma ilha,
um todo, completo em si mesmo.
Todo homem é um pedaço de um continente,
uma parte do conjunto.
Se o mar carrega um punhado de terra,
a Europa é diminuída como se as ondas
tivessem levado um promontório,
o solar dos teus amigos e o teu.
A morte de qualquer homem me diminui,
porque pertença ao gênero humano.
Assim, nunca perguntes por quem
os sinos dobram: eles dobram por ti."

John Donne (1624)

À minha mãe
À meu pai e minhas irmãs
por terem me proporcionado,
com tanto amor,
tantos horizontes.

À Alberto Nandja
uma das maiores razões
deste manuscrito.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a **Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo**, minha orientadora, que me proporcionou uma orientação amiga, solidária e ininterrupta ao longo desses anos, conduzindo-me na execução do presente trabalho.

- À Prof^a **Lêda Cristina Mendonça-Hagler**, minha tutora, pelo acompanhamento integral durante a execução deste trabalho e pelas valiosas sugestões, quando da leitura e discussão dos originais.

- À Prof^a **Maria Aparecida Esquibel**, pela competência na organização e coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e pela revisão deste manuscrito.

- Ao Prof. **Alfredo Martins de Oliveira Filho**, pelo apoio integral durante todo este trabalho e pelo uso das instalações do Laboratório de Biologia do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais.

- Ao Prof. **Antônio Jorge Ribeiro da Silva**, pela atenção dispensada neste trabalho e pela utilização dos equipamentos da Central Analítica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais.

- Ao Prof. **Luiz Otávio de Azevedo**, pelas valiosas sugestões e esclarecimentos na área da Estatística e Informática.

- Ao Prof. **Maulori Curié Cabral**, pela amizade e incentivo dedicados durante a execução deste trabalho.

- À todos os amigos antigos e atuais do Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas: **Claudinho, Ana Claudia, Simone, Elizabete, Luciana, Renato, Marcelo de Pádula, Cadu, Raquel, Patrícia Vieira, Aloysio, Sylvia, Marcelo Marinho e Patrícia Domingos**, pelo companheirismo, incentivo e paciência durante todos estes anos.

- À todos os colegas do Laboratório de Biologia: **Marli, Celso, Elizabete, Elza, Joaquim e Cosme**, pelo apoio dispensado durante todos estes anos.

- Aos colegas da Central Analítica, **Elimar, Cristina e Eduardo**, pelo apoio e pelas valiosas sugestões na área da cromatografia.

- À todos os amigos e colegas da turma de Biotecnologia Vegetal: **Glauber, Glória, Luzia, Patrícia, Renato e Marcos**, pela coragem e perseverança, ao acreditarem no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal.

- À **Jorginaldo William de Oliveira**, pelo companheirismo durante grande parte deste trabalho.

- À **Reitoria da UFRJ**, na pessoa de seu ex-vice-reitor, **Gilberto de Oliveira Castro (SR-2)**, pela confiança depositada e pelo apoio financeiro durante grande parte da execução deste trabalho.

- À **CAPES**, pelo auxílio financeiro concedido.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Determinação do Crescimento	14
3.2. Testes de Toxicidade	18
3.3. Extração, Purificação e Verificação da Variação Quali-quantitativa das Toxinas	19
3.4. Análises Estatísticas	21
4. RESULTADOS	
4.1. Determinação do Crescimento	23
4.2. Testes de Toxicidade	29
4.3. Extração, Purificação e Verificação da Variação Quali-quantitativa das Toxinas	37
5. DISCUSSÃO	
5.1. Determinação do Crescimento	48
5.2. Testes de Toxicidade	52
5.3. Extração, Purificação e Verificação da Variação Quali-quantitativa das Toxinas	54

6. CONCLUSÕES

57

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

59

8. ANEXOS

RESUMO

EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE TOXINAS POR *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenkin (Cyanophyceae), EM CONDIÇÕES DE CULTIVO.

O aumento da eutroficação de corpos d'água brasileiros tem sido correlacionado com a dominância de espécies de Cianofíceas nesses ambientes aquáticos. A ocorrência de "blooms" de Cianofíceas, na superfície desses corpos d'água, tem sido registrada principalmente para o gênero *Microcystis* e a produção de hepatotoxinas por diferentes linhagens desse gênero já foi verificada em várias partes do mundo. Para compreender a relação entre a concentração de nutrientes e a produção de toxinas, a linhagem hepatotóxica NPJB-1 da espécie *Microcystis aeruginosa*, isolada da Lagoa das Garças (cidade de São Paulo - Brasil), foi cultivada em meio ASM-1 com variações das concentrações de nutrientes (N/20, N/10, N/5, ASM-1 (C), 2N, 2NP, 5N, 5NP, ASM-1/2, 2ASM-1 e 5ASM-1), à uma intensidade luminosa de $22\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$. O crescimento das culturas foi monitorado através de contagens de células, taxa de crescimento, produção de biomassa e rendimento celular. Ao atingirem o final da fase exponencial, as células foram lavadas, concentradas e liofilizadas para realização de bioensaios com camundongos, extração e purificação das hepatotoxinas através de HPLC, em fase reversa. Houve redução da taxa de crescimento nas condições 2N, 5N e ASM-1/2 e aumento da mesma nas condições 2ASM-1 e 5ASM-1. Em relação à biomassa celular, houve aumento nas condições 2ASM-1 e 5ASM-1 e, em relação ao rendimento celular, houve aumento nessas condições e diminuição nas condições N/20, N/10, N/5 e

ASM-1/2. Embora esta linhagem produza duas diferentes microcistinas - LR e LF, a redução da hepatotoxicidade nas condições ASM-1/2 e 2ASM-1 deveu-se principalmente, à diminuição da produção da microcistina LR. As condições ótimas de cultivo para o crescimento celular não coincidiram com as condições ótimas para a produção de hepatotoxinas e não foi constatada correlação entre o aumento das concentrações de nutrientes e a produção dessas hepatotoxinas. Portanto, o aumento das concentrações de nutrientes em ecossistemas aquáticos brasileiros precisa ser avaliado cuidadosamente quanto a sua relação com a produção de hepatotoxinas por linhagens de *Microcystis aeruginosa*.

ABSTRACT

EFFECTS OF DIFFERENT NUTRIENT CONCENTRATION ON GROWTH AND TOXIN PRODUCTION BY *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenkin (Cyanophyceae), IN CULTURE CONDITIONS.

The increase of eutrophication of Brazilian natural freshwater supplies and reservoirs has led to Cyanophyta species becoming dominant. The most common Cyanophyta genera producing "blooms" on the surface of eutrophic Brazilian water bodies is *Microcystis* and the hepatotoxin production by strains of this genera has been showed in many areas of the world. In order to understand the relationship between nutrient concentration and hepatotoxin production, a hepatotoxic strain (NPJB-1) of *Microcystis aeruginosa*, isolated from Lagoa das Garças (São Paulo city - Brazil) was cultivated in ASM-1 medium using different concentrations of the nutrients (N/20, N/10, N/5, ASM-1 (C), 2N, 2NP, 5N, 5NP, ASM-1/2, 2ASM-1 and 5ASM-1) at $22\text{uE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light with a photoperiod of 12 h and $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ of temperature. The culture growth was monitored by cell count, growth rates, biomass production e cell rendimento. Cells growing on the exponential phase were harvested, concentrated and lyophilized for mouse bioassays and toxin extraction. Isolation, purification and quantification of the toxins were carried out by reverse phase HPLC. The growth rate was reduced in the conditions 2N, 5N and ASM-1/2 and it was increased under 2ASM-1 and 5ASM-1 conditions. The cell biomass and cell rendimento were increased in the conditions 2ASM-1 and 5ASM-1. Cell rendimento was reduced under N/20, N/10, N/5 and ASM-1/2 conditions. This *Microcystis aeruginosa* strain (NPJB-1) produces two different hepatotoxic heptapeptide microcystins: LR and LF, however the decrease of

hepatotoxicity under the conditions ASM-1/2 and 2ASM-1 was mainly related with the decrease of microcystin-LR production. The best culture condition for the growth of this strain was not coincident with the condition where was observed the maximum hepatotoxins production. Therefore the increase of nutrient concentration in aquatic environment should not be directly related with the hepatotoxin production by the *Microcystis* strains.

1 - INTRODUÇÃO:

As microalgas formam um conjunto de plantas simples, com grande diversidade de tamanho, pigmentação, mecanismos de reprodução e habitat.

As Cianofíceas ou Cianobactérias constituem uma das divisões de microalgas que vêm despertando um crescente interesse para estudos quanto à utilização de sua biomassa e mesmo como fonte potencial de várias substâncias orgânicas de interesse farmacológico e químico (AARONSON *et al.*, 1980).

Cianofíceas ou Cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes que, diferentemente das bactérias fotoautotróficas, fazem assimilação de CO₂ e produzem O₂, durante o processo fotossintético.

As atividades humanas em áreas industriais e agrícolas têm produzido variações na qualidade de água de vários lagos, rios e reservatórios artificiais. O aumento da entrada de nutrientes, nesses sistemas, tem sido identificado como principal causa dessas variações. Este aumento na fertilização de corpos d'água é conhecido como eutroficação (TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1992).

Uma das consequências da eutroficação é a diminuição da diversidade fitoplanctônica que, sob essa condição, apresenta dominância crescente de espécies de Cianofíceas (Cianobactérias) que, em períodos de calmaria, podem

apresentar crescimento intenso na superfície desses corpos d'água, o que é conhecido como "bloom" ou floração.

Este fenômeno tem sido observado no Brasil, principalmente nas proximidades de grandes centros urbanos, como Rio de Janeiro e São Paulo, recebendo atenção especial de órgãos estaduais que controlam a qualidade de água.

Vários gêneros de Cianofíceas que podem formar "blooms" têm sido descritos como produtores de toxinas, podendo-se citar: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Oscillatoria*. Estes gêneros de Cianofíceas têm sido apontados como responsáveis pelo envenenamento animal, e mesmo humano, em vários países (CARMICHAEL, 1992).

Vários trabalhos têm sido realizados, utilizando culturas de cianofíceas tóxicas, com o objetivo de elucidar os mecanismos de ação destas toxinas, além de determinar sua estrutura química e possíveis aplicações farmacológicas e biotecnológicas (HUGUES *et al.*, 1958; BISHOP *et al.*, 1959; SHILO, 1967; MURTHY & CAPINDALE, 1970; CARMICHAEL *et al.*, 1975; MYNDERSE *et al.*, 1977; SPIVAK *et al.*, 1980; RUNNEGAR & FALCONER, 1981; BROOK & COOD, 1987; FALCONER, 1991; KIVIRANTA *et al.*, 1992; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 1992; CARMICHAEL, 1992, 1994; SAARIO *et al.*, 1994).

Animais afetados com estas toxinas têm demonstrado indicações de envenenamento e lesão de tecidos nos sistemas gastrointestinal, hepático, neuromuscular, respiratório e cardiovascular.

As principais toxinas já caracterizadas produzidas por estas espécies de Cianofíceas são neurotoxinas e hepatotoxinas; as neurotoxinas até agora identificadas, são produzidas por espécies e linhagens de *Oscillatoria* (SKULBERG *et al.*, 1992), *Aphanizomenon* (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986) e *Anabaena* (CARMICHAEL *et al.*, 1990).

Estas neurotoxinas podem ter atividades farmacológicas diversas: Anatoxina-a é considerada um bloqueador neuromuscular, por mimetizar a ação da acetilcolina, não sendo entretanto degradada pela acetilcolinesterase; Anatoxina-a(s) age como inibidor de colinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina; Saxitoxina inibe a condução nervosa por bloqueamento da condução iônica de sódio e potássio (CARMICHAEL *et al.*, 1979; SPIVAK *et al.*, 1980, 1983; MAHMOOD & CARMICHAEL, 1987; CARMICHAEL, 1992, 1994).

As hepatotoxinas, produzidas por espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Nostoc* são responsáveis pelas intoxicações mais comuns envolvendo Cianofíceas.

A substância tóxica de *Microcystis aeruginosa* foi pela primeira vez descrita como sendo uma toxina de natureza peptídica por BISHOP *et al.*, 1959, já tendo sido demonstrado que o princípio ativo é uma endotoxina que é excretada quando as células encontram-se em fase senescente. Este tipo de toxina foi denominada **microcistina** (CARMICHAEL, 1988), encontrando-se relatados na literatura o isolamento e a purificação de microcistinas a partir de linhagens isoladas

provenientes de várias partes do mundo (MURTHY & CAPINDALE, 1970; ELLEMAN *et al.*, 1978; SIVONEN *et al.*, 1990a; ZHANG *et al.*, 1991; AZEVEDO *et al.*, 1994). Estes trabalhos têm demonstrado que as toxinas são constituídas por um heptapeptídeo (microcistinas) ou um pentapeptídeo (nodularina) monocíclicos contendo D e L aminoácidos. A variação de dois dos L aminoácidos caracterizaria as diferenças de toxicidade existentes entre elas. Até o momento, já foram identificadas 53 microcistinas diferentes em todo o mundo (CARMICHAEL, 1994).

A toxicidade das microcistinas é praticamente a mesma, quase todas apresentando DL₅₀ entre 60 e 70 µg/Kg de peso corpóreo e sintomas similares de envenenamento (CARMICHAEL, 1992) quando injetadas intraperitonealmente (i.p.) em camundongos Swiss.

Essas hepatotoxinas só são liberadas para o meio externo pela lise celular mas, por serem polipeptídeos com peso molecular normalmente em torno de 900 a 1100 daltons, não são retidas por sistemas convencionais de filtração de água, além de apresentarem-se como termoestáveis, o que torna complexa a resolução dos problemas causados por estas espécies (KEIJOLA, 1988).

TSUJI *et al.*, em 1994, propuseram metodologia para análise dessas toxinas na água, mas até o momento, não há uma metodologia rápida, eficiente e de baixo custo, para detecção dessas microcistinas em águas de abastecimento.

Sinais de envenenamento por intoxicações hepáticas têm sido observados tanto em animais domésticos como selvagens, em diversos países: Canadá (HUGUES *et al.*, 1958), África do Sul (TOERIEEN *et al.*, 1976; SCOTT, 1991), E.U.A. (CARMICHAEL *et al.*, 1980), Argentina (ODRIOZOLA *et al.*, 1984), Inglaterra (CODD & POON, 1988), Finlândia (SIVONEN, 1990a), Austrália (FALCONER, 1991), China (ZHANG *et al.*, 1991), Portugal (VASCONCELOS *et al.*, 1993), entre outros.

Os sinais de envenenamento são: fraqueza, anorexia, tremores, vômitos, esfriamento das extremidades e diarreia. A morte ocorre de poucas horas a poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, sendo observado um aumento de cerca de 100% do peso do fígado (Jackson *et al.*, 1984 citado em CARMICHAEL, 1992; CARMICHAEL & SCWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989).

Essas hepatotoxinas induzem mudanças em microfilamentos de actina (constituíntes do citoesqueleto), levando a uma densa agregação desses microfilamentos, próxima a região celular central, perdendo assim o suporte celular. Desta forma, a hemorragia intra-hepática seria decorrente da destruição das células parenquimais e sinusoidais (RUNNEGAR & FALCONER, 1986; ERIKSSON *et al.*, 1989; HOOSER *et al.*, 1991). Além disso, estas hepatotoxinas são potentes inibidores de proteínas fosfatases 1 e 2a, agindo portanto como promotores de tumores hepáticos, o que torna o relato da ocorrência de "blooms" que apresentam hepatotoxicidade altamente

preocupante, sob o ponto de vista de saúde pública (FALCONER & BUCKLEY, 1989; MATSUSHIMA *et al.*, 1990; MACKINTOSH *et al.*, 1990; ERIKSSON *et al.*, 1990; FALCONER, 1991; NAKANO *et al.*, 1991; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992; FUJIKI, 1992).

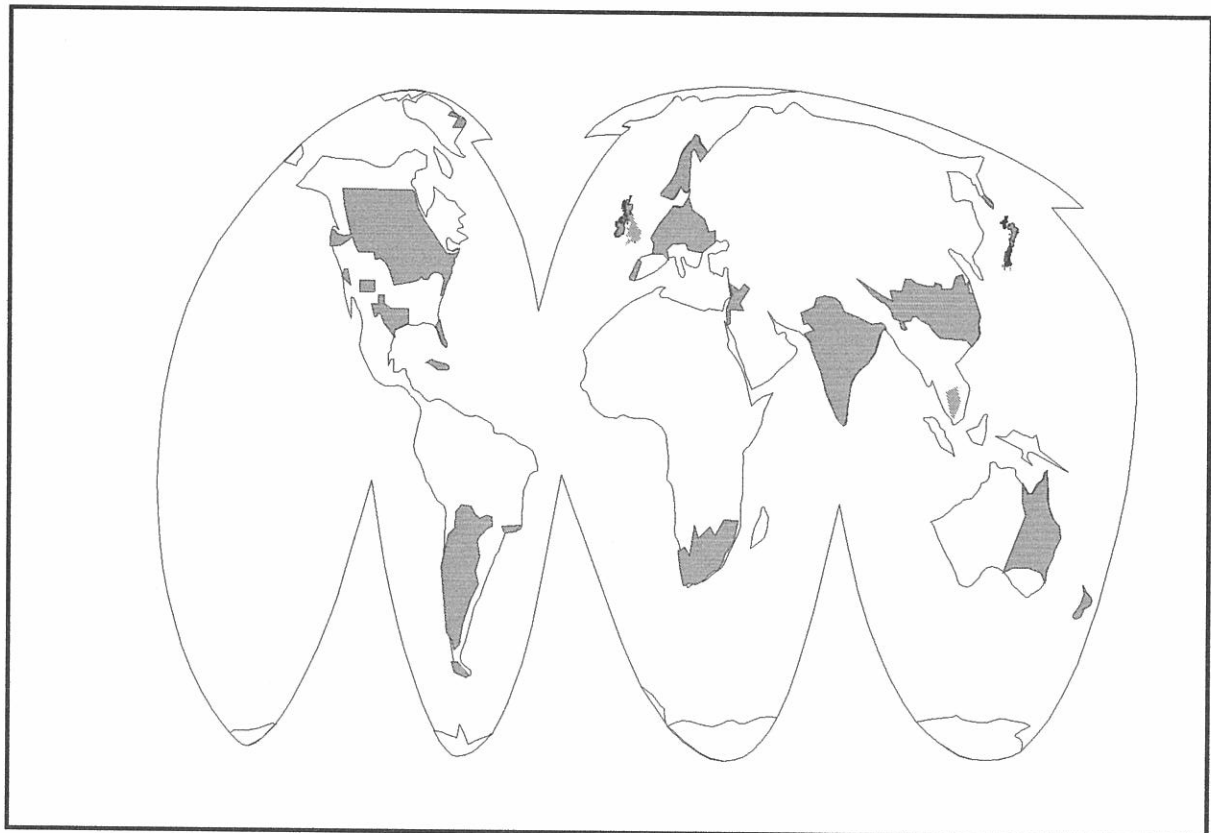


FIGURA 1: OCORRÊNCIA DE FLORAÇÕES TÓXICAS DE CIANOFÍCEAS RELATADAS EM DIFERENTES REGIÕES DO MUNDO, de acordo com GORHAM & CARMICHAEL (1988).

Alguns autores demonstraram que o aminoácido ADDA (Figura 2), é o que confere a atividade biológica ao heptapeptídeo (NAMIKOSHI *et al*, 1989; HARADA *et al.*, 1990a e 1990b).

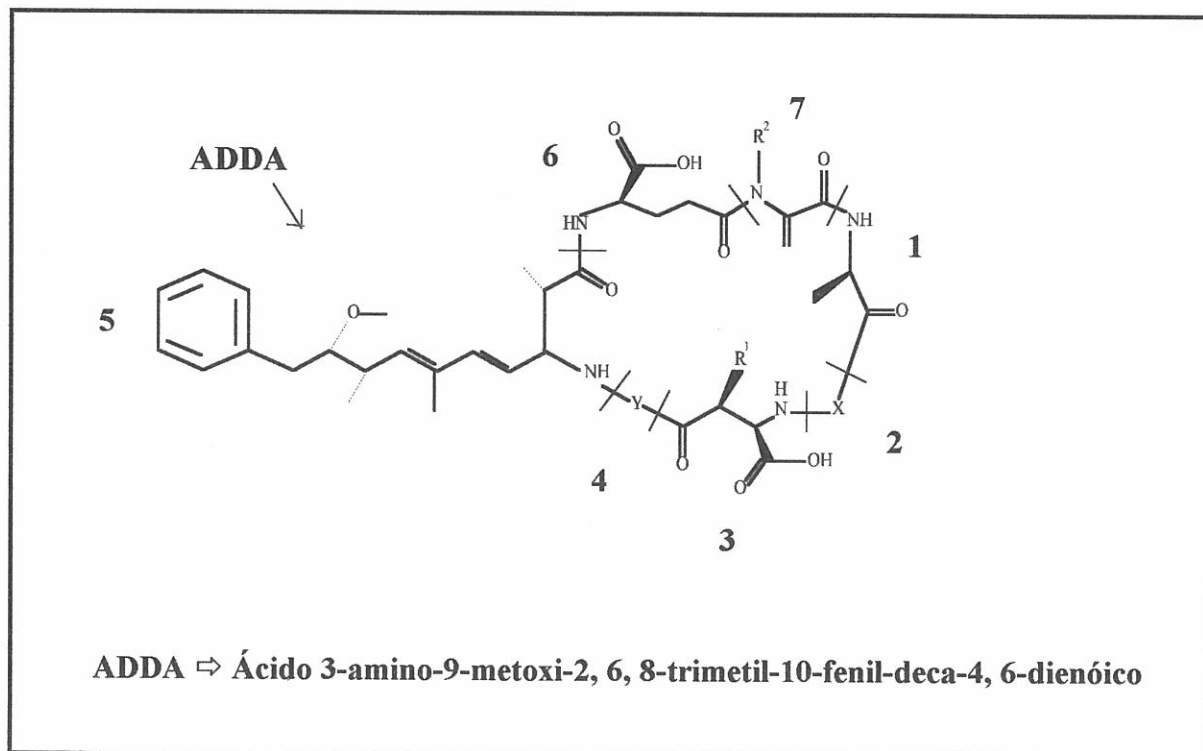


FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DAS MICROCISTINAS, de acordo com CARMICHAEL (1992).

- Fatores Ambientais Relacionados com a Produção de Toxinas:

Vários estudos sobre a influência de fatores ambientais e a regulação da produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa* têm sido realizados nos últimos anos. CODD & POON em 1988, demonstraram que culturas que foram transferidas de um meio completo para um meio onde houve a remoção de fósforo, não apresentaram mudança na toxicidade, enquanto que a remoção de nitrogênio e do carbono inorgânico causaram um decréscimo de aproximadamente 10 vezes na toxicidade.

Outros trabalhos verificaram efeitos de temperatura (WATANABE & OISHI, 1985; SIVONEN, 1990b), luz (CODD & POON, 1988; SIVONEN, 1990b), pH (WAN DER WESTHUIZEN *et al.*, 1988) e nutrientes (SIVONEN, 1990b; AGUIAR *et al.*, 1990) na produção dessas hepatotoxinas.

No Brasil, estudos iniciados no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas do NPPN-UFRJ, já demonstraram a existência de diferentes linhagens de várias espécies de Cianofíceas, identificadas como produtoras de hepatotoxinas (75% das linhagens já testadas) (OLIVEIRA *et al.*, 1992; AGUIAR *et al.*, 1993; BOBEDA, 1993; AZEVEDO *et al.*, 1994; COSTA & AZEVEDO, 1994). Todas estas linhagens foram isoladas de amostras de águas provenientes de reservatórios de abastecimento e de áreas de recreação localizadas principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Distrito Federal.

Embora ainda não tenhamos relatos confirmados de envenenamento humano por "blooms" de Cianofíceas no Brasil, **BEYRUTH et al.**, em 1992, relataram a ocorrência de morte de pombos e patos em lagos das cidades de Araras e São Paulo, respectivamente, suspeitando-se ser decorrente da ingestão de células tóxicas presentes em "blooms" de *Microcystis* ocorridos em 1979.

AZEVEDO et al., em 1994, isolaram e caracterizaram duas microcistinas na linhagem NPJB-1 da espécie *Microcystis aeruginosa*, isolada a partir de amostras fitoplanctônicas coletadas na Lagoa das Garças, localizada na cidade de São Paulo, sendo uma delas inédita na literatura mundial.

Por outro lado, o aumento crescente do nível de eutroficação de corpos d'água de nosso país vem possibilitando o desenvolvimento de "blooms" de Cianofíceas tóxicas em diversos reservatórios de água para abastecimento, lagoas e lagos, em vários estados do país (**AGUIAR et al.**, 1993; **COSTA & AZEVEDO**, 1994).

De acordo com **TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI (1992)**, a espécie *Microcystis aeruginosa* está se tornando dominante nos ambientes eutróficos. Entretanto não existem estudos sistemáticos sobre a variação da produção de toxinas por espécies de Cianofíceas que ocorrem em ambientes aquáticos brasileiros.

Desta forma, acreditamos que estudos bioquímicos e fisiológicos com espécies de Cianofíceas tóxicas isoladas de corpos d'água em nosso país, possam auxiliar no esclarecimento dos mecanismos físico, químico ou biológico de controle da produção de toxinas por estes microorganismos.

Assim, o estudo da variação quali-quantitativa na produção das hepatotoxinas, em diferentes concentrações de nutrientes, possibilitará melhor compreensão dos mecanismos de controle envolvidos na biossíntese dessas hepatotoxinas.

2 - OBJETIVOS:

- O presente trabalho teve por finalidade o estudo dos seguintes aspectos:

2.1 - Determinação do crescimento e toxicidade de *Microcystis aeruginosa*, linhagem NPJB-1, em diferentes concentrações de nutrientes;

2.2 - Extração e purificação das hepatotoxinas produzidas pelas células de *Microcystis aeruginosa* que se desenvolveram nessas diferentes condições;

2.3 - Verificação da variação quali-quantitativa das microcistinas produzidas por esta linhagem, nas diferentes condições de cultivo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

A linhagem de Cianofíceas estudada neste trabalho foi da espécie *Microcystis aeruginosa* (linhagem NPJB-1). Esta foi isolada, pelo método de microcapilar de vidro, a partir de uma floração ocorrida na Lagoa das Garças, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, e está sendo mantida no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas - NPPN - UFRJ, desde o ano de 1988.

Condições de Cultivo:

Esta linhagem foi estudada em culturas unialgais, utilizando-se o meio de cultivo ASM-1 (**Gorham et al., 1964** citado em **GIBSON & SMITH, 1982** - Tabela 1), em temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de $22\text{uE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida com a utilização de lâmpadas fluorescentes, pH 7,0 e fotoperíodo de 12 horas.

TABELA 1: Composição do meio de cultivo ASM-1 em $\mu\text{mol.l}^{-1}$

NaNO_3 -	2000,00	$\bullet\text{H}_3\text{BO}_3$ -	40,00
Na_2HPO_4 -	100,00	Na_2 EDTA -	20,00
$\bullet\text{CoCl}_2$ -	0,08	CaCl_2 -	200,00
MgSO_4 -	200,00	$\bullet\text{MnCl}_2$ -	7,00
$\bullet\text{FeCl}_3$ -	4,00	K_2HPO_4 -	100,00
$\bullet\text{CuCl}_2$ -	$0,08 \cdot 10^{-2}$	$\bullet\text{ZnCl}_2$ -	3,20
MgCl_2 -	200,00		

- Micronutrientes

3.1 - DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO:

As culturas desenvolveram-se, em triplicata, em erlenmeyers de 2 litros com 1,5 litro de meio ASM-1, sem aeração.

Os estudos foram divididos em 3 grupos experimentais:

Grupo 1 - Foram analisadas as variações dos parâmetros crescimento e produção de toxinas em gradiente de concentrações de Nitrogênio e Fósforo no meio de cultivo:

	NITROGÊNIO (μ moles/l)	FÓSFORO (μ moles/l)	
N/20	100	200	N/P 0,5
N/10	200	200	1
N/5	400	200	2
C (controle)*	2000	200	10
2N	4000	200	20
2NP	4000	400	10
5N	10000	200	50
5NP	10000	1000	10

* Concentração normal do meio ASM-1.

Grupo 2 - Experimentos nos quais foram variadas as concentrações de todos os nutrientes do meio ASM-1:

2.1 - Meio de Cultura **ASM-1/2** -> meio ASM-1 com as concentrações de nutrientes reduzidas à metade, em relação ao controle;

2.2 - Meio de Cultura **2ASM-1** -> meio ASM-1 com as concentrações de nutrientes duplicadas, em relação ao controle;

2.3 - Meio de Cultura **5ASM-1** -> meio ASM-1, com as concentrações de nutrientes aumentadas em 5 vezes, em relação ao controle.

Grupo 3 - Experimentos nos quais foram variadas as concentrações de micronutrientes do meio ASM-1:

3.1 - Meio de Cultura **MICRO/2** -> meio ASM-1 com as concentrações de micronutrientes reduzidas à metade, em relação ao controle;

3.2 - Meio de Cultura **MICRO/10** -> meio ASM-1 com as concentrações de micronutrientes reduzidas em 10 vezes, em relação ao controle.

Os inóculos utilizados em cada um dos cultivos foram previamente adaptados em ASM-1/10 para a exaustão dos nutrientes intra e extra-celulares, durante aproximadamente 6 dias, sendo seus volumes correspondentes a cerca de 5% do volume final das culturas.

Durante o crescimento das culturas foram analisados os seguintes parâmetros:

- número de células/ml;
- taxa de crescimento;
- rendimento celular;
- biomassa.

O número de células/ml foi determinado por contagens diárias, de amostras das culturas, em hemocitômetro de Fucks-Rosenthal.

A taxa de crescimento foi obtida através da fórmula:

$$K = \frac{\log N - \log N_0}{\Delta t}, \text{ onde:}$$

$N = n^0$ de céls. final $N_0 = n^0$ de céls. inicial

$\Delta t =$ tempo final - tempo inicial,

utilizando-se apenas os dados da fase exponencial (**FOGG & THAKE, 1987**).

O Rendimento Celular representa o número de células existentes no final da fase exponencial.

A Biomassa Celular foi calculada pela fórmula:

$$\text{Biomassa celular} = \frac{\text{peso seco final (mg)} \times 10^6 \text{ células}}{\text{n}^\circ \text{ de células final/ml}}$$

(mg/10⁶ céls.)

Foram realizados experimentos similares, em mariotes de 9 litros com 7 litros de meio ASM-1, com aeração, para obtenção de biomassa, em cada uma das condições experimentais já citadas, para realização de bioensaios visando a verificação da toxicidade das células e posterior extração, purificação e quantificação das toxinas,

Para tanto, quando as culturas atingiram o final da fase exponencial, essas tiveram as células lavadas e concentradas por centrifugação e liofilizadas.

3.2 - TESTES DE TOXICIDADE:

Os testes de toxicidade foram realizados através de bioensaios com camundongos Swiss, com pesos variando de 17 a 25 gramas. 10 mg das células liofilizadas, dos diferentes cultivos, foram ressuspensas em 10 ml de solução cloreto de sódio a 0,9%.

Foram feitas injeções intraperitoniais (i.p.), em pelo menos 3 animais, para o teste de concentração variando-se de 10 mg/ml a 0,1 mg/ml, por aplicação, até a observação da não-ocorrência de morte, chegando-se portanto à dose letal mínima (Dl_{min}).

Todos os sintomas de intoxicação foram observados e o tempo de ocorrência de morte registrado. Os animais mortos tiveram rapidamente os fígados retirados e pesados, para verificação de hepatotoxicidade por aumento do peso do fígado (**Jackson et al., 1984 citado em CARMICHAEL, 1992**).

O controle foi realizado, com pelo menos 3 animais, injetando-se intraperitonealmente, 1 ml de solução salina em cada animal.

3.3 - EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO QUALI-QUANTITATIVA DAS TOXINAS:

Hepatotoxinas produzidas por Cianofíceas têm sido purificadas através de métodos cromatográficos entre os quais se inclui Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE). Neste trabalho utilizou-se a cromatografia líquida com fase reversa, tendo octadecilsilano (C-18) como fase estacionária.

A extração das hepatotoxinas foi realizada pelo método proposto por **KRISHNAMURTHY et al. (1986)**, com ligeiras modificações. Assim, 500 mg do material liofilizado sofreu extração com 50 ml de solução MeOH/BuOH/H₂O (20:5:75 v/v), durante uma hora, à temperatura ambiente e com agitação.

Esta suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 7700 g, utilizando-se uma Centrífuga Sorval (modelo RC-5B com rotor HS-4) recolhendo-se o sobrenadante, repetindo-se mais duas vezes o mesmo procedimento de extração com o precipitado.

Os sobrenadantes obtidos foram reunidos e tiveram seus volumes reduzidos à 30% do volume original. Este extrato foi passado através de cartucho de octadecilsilano Bond Elut C₁₈, sendo o material retido eluído com 50 ml de H₂O, seguida de 50 ml de solução 20% (v/v) de MetOH em água e por último com 50 ml de metanol 100%.

Cada uma dessas frações foi evaporada à secura e ressolubilizada em água deionizada para serem realizados os

bioensaios para a identificação da fração tóxica. Esses bioensaios obedeceram à mesma metodologia descrita para o material celular liofilizado (item 3.2).

A separação das hepatotoxinas foi realizada em duas etapas, uma preparativa e outra analítica, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

Na etapa preparativa, utilizou-se uma coluna semi-preparativa (BONDAPAK C₁₈, 125 Å, 15-20 µm, 19 mm X 30 cm - WATERS), com fase móvel de acetonitrila/acetato de amônio 20 mM (pH=5) (30:70 v/v), fluxo de 4 ml/minuto, em condições isocráticas, durante 60 minutos. Em seguida realizou-se um gradiente de acetonitrila em água, variando-se a proporção de acetonitrila de 30% a 50%, em 30 minutos. Esta etapa foi realizada em equipamento SHIMADZU, bomba LC-10AS, detector de ultra-violeta/visível SPD-10A e integrador CR6A, em comprimento de onda 238 nm e sensibilidade de 0,5 uA.

Na etapa analítica, foi realizada a separação final das frações tóxicas em coluna analítica de octadecilsilano (ECONOSPHERE RP-18, 5 µm, 4,6 mm X 12,5 cm - MERCK), assim:

- a fração tóxica, separada em condições isocráticas na coluna semi-preparativa, foi purificada utilizando-se fase móvel de metanol/sulfato de sódio 50 mM (60:40 v/v), com fluxo de 1 ml/minuto, comprimento de onda 238 nm e 0,5 uA de sensibilidade. Esta etapa foi realizada utilizando-se o mesmo equipamento que na etapa semi-preparativa.

- a fração tóxica separada em condições de gradiente, na coluna semi-preparativa, foi purificada utilizando-se fase móvel de acetonitrila/água (40:60 v/v), com fluxo de 1ml/minuto, comprimento de onda 238 nm e sensibilidade de 0,5 uA. Esta etapa foi realizada utilizando-se aparelho SHIMADZU, bomba LC-10AD, detector "diodearray" SPD-M10A acoplado à um computador IBM Aptiva 486.

3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA:

3.4.1 - Análise de Variância e Comparação de Médias:

As análises estatísticas dos valores de Taxa de Crescimento, Biomassa, Rendimento Máximo, Dose Letal Mínima e Área Percentual das toxinas purificadas nas diferentes condições de cultivo, foram realizadas utilizando Análise de Variância e posterior Comparação de Médias (Teste de Tukey), ambas ao nível de significância de 5%.

Essas análises foram realizadas com a ajuda do pacote estatístico Statistix 4.0 (SIEGEL, 1985).

3.4.2 - Cálculo de DL₅₀:

Estudos com toxicidade aguda são frequentemente designados para expressar o potencial de uma toxina, utilizando-se a dose letal média (DL₅₀), valor que representa a dose estimada que causa morte de 50% da população que já foi exposta à toxina, em condições definidas.

Segundo **ECOBICHON (1992)** a classificação de DL₅₀ pode ser sub-dividida em:

Categoria	DL₅₀ (mg/Kg)
extremamente tóxico	< 1,0
muito tóxico	1,0 - 50,0
moderadamente tóxico	51,0 - 500,0
levemente tóxico	501,0 - 5000,0
praticamente não-tóxico	5001,0 - 15000,0
relativamente inócuo	> 15001,0

Os dados de toxicidade obtidos nos bioensaios foram utilizados para o cálculo de DL₅₀, com a ajuda do programa "Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays" (**HAMILTON et al., 1977**).

4 - RESULTADOS:

4.1 - Crescimento Celular:

4.1.1 - Grupo 1 → Crescimento de *Microcystis aeruginosa* em diferentes concentrações de Nitrogênio e Fósforo, em relação ao controle.

Nas Figuras 3 e 4 e Tabelas 2 e 3, estão representados os dados de crescimento obtidos com variações quantitativas das concentrações de Nitrogênio e Fósforo, em relação ao meio controle (C).

A análise estatística das taxas de crescimento deste grupo (Tabela 1 do Anexo) demonstrou que houve redução significativa apenas nas condições 2N e 5N, em relação ao controle.

Para os valores de biomassa deste grupo, a análise estatística (Tabela 2 do Anexo) demonstrou que não houve variação significativa em nenhuma das condições enquanto que, para os valores de rendimento máximo, houve redução significativa nas condições N/20, N/10 e N/5 (Tabela 3 do Anexo), em relação ao controle.

Embora seja observada uma variação da fase de adaptação (fase **lag**), a diminuição de Nitrogênio e Fósforo no meio de cultivo não alterou significativamente a taxa de crescimento destas células.

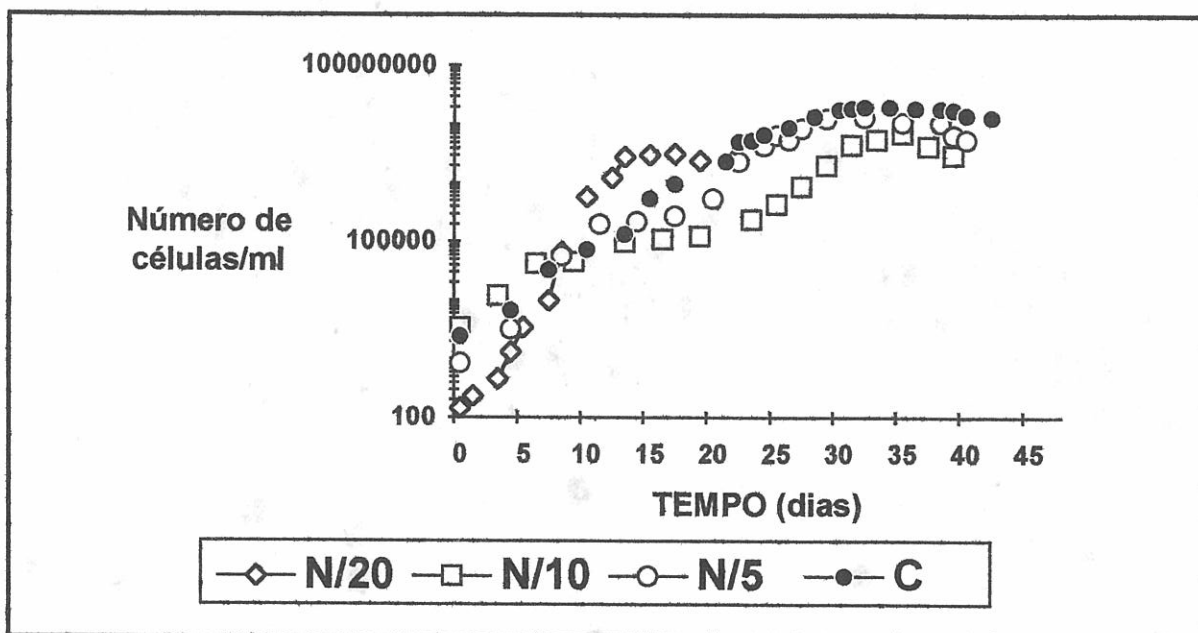


Figura 3: Curvas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* em culturas submetidas à concentrações de nitrogênio inferiores ao controle.

Tabela 2: Média dos Valores da Taxa de Crescimento Diário (K), Biomassa (mg/10⁶ células) e Rendimento Máximo (10⁶ células/ml), e respectivos desvios-padrão para as culturas submetidas à concentrações de nitrogênio inferiores ao controle.

	N/20	N/10	N/5	C
K (n ^o de divisões / dia)	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Biomassa (mg/10 ⁶ células)	3,40 ± 0,30	3,63 ± 0,15	3,17 ± 0,15	3,67 ± 0,06
Rendimento Máximo (10 ⁶ células/ml)	3,73 ± 0,46•	4,37 ± 0,30•	11,30 ± 0,26•	19,23 ± 1,20

• Valores estatisticamente diferentes, em relação ao controle, ao nível de significância 5% (Vide Tabelas 1, 2 e 3 do Anexo).

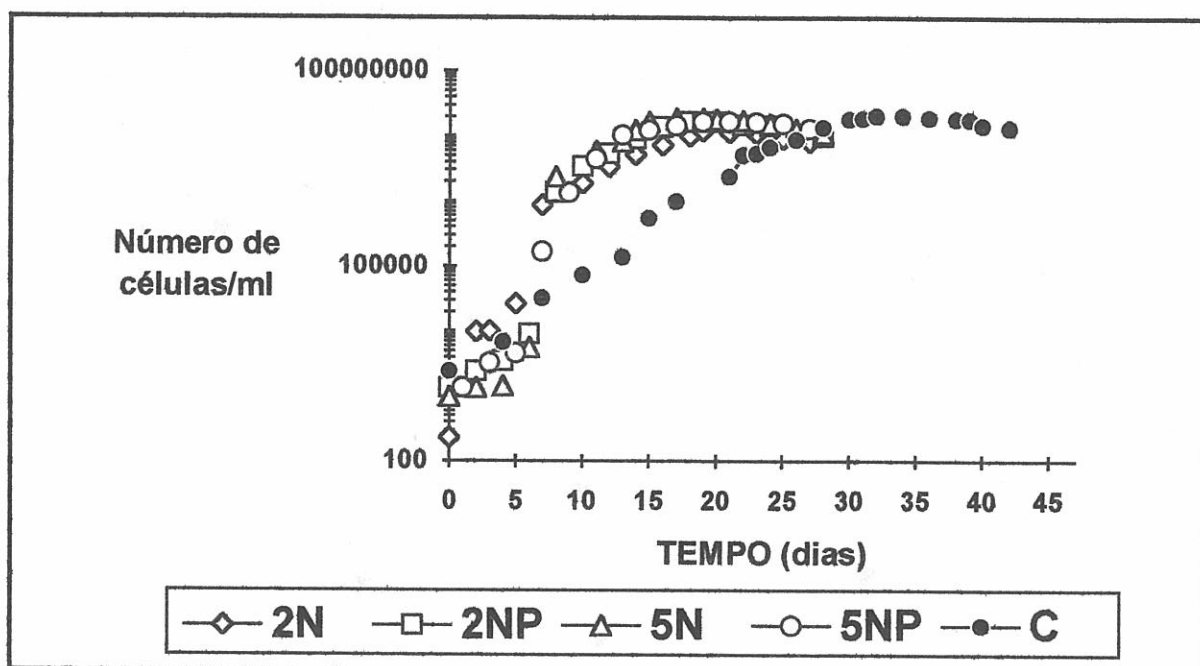


Figura 4: Curvas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* em culturas submetidas à concentrações de nitrogênio e fósforo superiores ao controle.

Tabela 3: Média dos Valores da Taxa de Crescimento Diário (K), Biomassa (mg/10⁶ células) e Rendimento Máximo (10⁶ células/ml), e respectivos desvios-padrão para as culturas submetidas à concentrações de nitrogênio e fósforo superiores ao controle.

	C	2N	2NP	5N	5NP
K (n ^o de divisões / dia)	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,01•	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01•	0,09 ± 0,02
Biomassa (mg/10 ⁶ células)	3,67 ± 0,06	4,00 ± 0,46	3,57 ± 0,06	3,70 ± 0,26	3,30 ± 0,30
Rendimento Máximo (10 ⁶ células/ml)	19,23 ± 1,20	17,30 ± 0,93	20,27 ± 2,10	16,63 ± 1,44	19,50 ± 0,87

• Valores estatisticamente diferentes, em relação ao controle, ao nível de significância 5% (Vide Tabelas 1, 2 e 3 do Anexo).

4.1.2 - Grupo 2 → Crescimento de *Microcystis aeruginosa* com variações das concentrações de todos os nutrientes, em relação ao controle.

Nas Figuras 5 e Tabela 4, estão representados os dados de crescimento obtidos com variações quantitativas de todos os nutrientes, em relação ao meio controle (C).

A análise estatística das taxas de crescimento (Tabela 1 do Anexo) deste grupo demonstrou que, apenas a condição 2ASM-1 mostrou um aumento significativo na velocidade do crescimento celular.

Para os valores de biomassa deste grupo, a análise estatística (Tabela 2 do Anexo) demonstrou que houve aumento significativo nas condições 2ASM-1 e 5ASM-1. Entretanto, os resultados desse aumento na biomassa celular na condição 5ASM-1, não foi acompanhado de um aumento significativo da taxa de crescimento.

Já na condição 2ASM-1 observou-se juntamente com o aumento da biomassa celular um aumento significativo na taxa de crescimento e no rendimento.

A diminuição de todos os nutrientes na condição ASM-1/2 mostrou apenas uma diminuição significativa no rendimento máximo de células, porém essas mantiveram sua taxa de crescimento e a biomassa celular semelhantes à condição controle.

Já a análise estatística do rendimento celular (Tabela 3 do Anexo) demonstrou que, nas três condições ocorreu variação significativa.

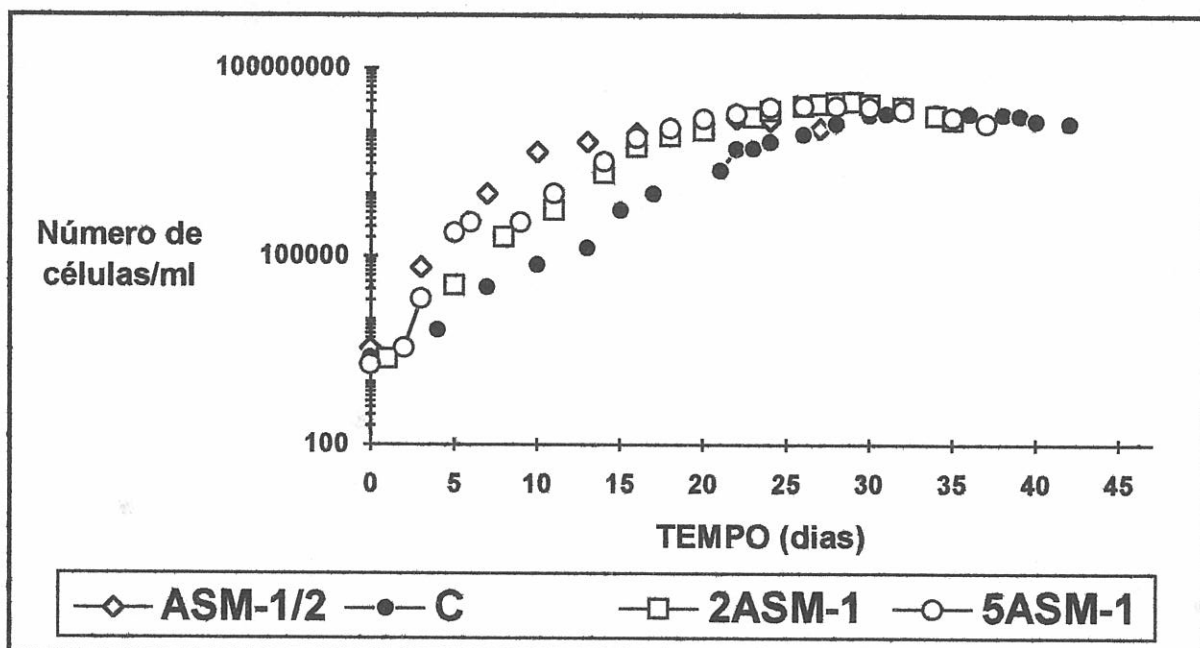


Figura 5: Curvas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* em culturas submetidas à variações de todos os nutrientes, em relação ao controle.

Tabela 4: Média dos Valores da Taxa de Crescimento Diário (K), Biomassa (mg/10⁶ células) e Rendimento Máximo (10⁶ células/ml), e respectivos desvios-padrão para as culturas submetidas à variações de todos os nutrientes, em relação ao controle.

	ASM-1/2	C	2ASM-1	5ASM-1
K (n ^o de divisões / dia)	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01•	0,14 ± 0,01
Biomassa (mg/10 ⁶ células)	3,03 ± 0,06	3,67 ± 0,06	6,40 ± 0,36•	8,30 ± 0,26•
Rendimento Máximo (10 ⁶ células/ml)	12,33 ± 1,44•	19,23 ± 1,20	26,37 ± 1,18•	23,30 ± 0,62•

• Valores estatisticamente diferentes, em relação ao controle, ao nível de significância 5% (Vide Tabelas 1, 2 e 3 do Anexo).

4.1.3 - Grupo 3 → Crescimento de *Microcystis aeruginosa* com variações das concentrações de micronutrientes, em relação ao controle.

As culturas submetidas à variações de microelementos no meio de cultivo (MICRO/2 e MICRO/10) não apresentaram crescimento. Cerca de três dias após o inóculo, não houve variação do número de células e, após 8 dias, as culturas apresentaram coloração amarelada, evidenciando morte celular. Portanto, não temos dados comparativos, em relação à condição controle.

4.2 - Testes de Toxicidade:

4.2.1 - Grupo 1 → Toxicidade das células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* das culturas submetidas à diferentes concentrações de Nitrogênio e Fósforo, em relação ao controle.

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados os valores da dose letal mínima, verificada a partir de bioensaios com animais que receberam injeções intraperitoneais de suspensão de células, crescidas em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

Na Tabela 5 podemos notar que esta dose letal mínima aumenta nas condições de nitrogênio inferiores ao controle e na Tabela 6 acontece fenômeno semelhante, destacando-se os valores de 5N e 5NP, bastante altos.

Estes dados demonstraram que, em todas estas condições houve diminuição da toxicidade em relação à condição controle, fato este que será discutido posteriormente.

A análise estatística das diferentes doses letais mínimas (Tabela 4 do Anexo) deste grupo demonstrou que em todas as condições houve variação significativa, em relação ao controle.

Nesta mesma análise, verificamos a ocorrência de grupos que não são diferentes significativamente entre si: condições 2N e 5NP, condições 2NP e N/10, condições N/10 e N/5.

Tabela 5: Toxicidade da suspensão de células de *Microcystis aeruginosa*, crescidas nas condições N/20, N/10, N/5 e C, em camundongos Swiss.

Dose Injetada (mg/Kg de peso do animal)	CONDIÇÃO DE CULTIVO			
	N/20	N/10	N/5	C
Intervalos				
400-500	-	-	-	-
200-399	(+) 308,64	(+) 234,74	(+) 233,65	-
180-199	-	-	-	(+) 180,96
100-179	(+) 101,44	(+) 111,73	-	-
85-99	-	(+) 94,79	(+) 93,9	(+) 88,1
75-84	(+) 83,04	-	-	-
65-74	(+) 66,22 •	-	-	(+) 66,01
55-64	(-) 62,11	(+) 59,52	(+) 55,47	-
45-54	-	(+) 47,62 •	(+) 48,78	(+) 53,5
35-44	-	-	(+) 40,82 •	(+) 31,06 •
25-34	-	(-) 30,67	(-) 28,57	(-) 28,74

(+) Dose Letal ⇨ ocorrência de morte

(-) Dose Sub-letal ⇨ não-ocorrência de morte

• Dose Letal Mínima

Tabela 6: Toxicidade da suspensão de células de *Microcystis aeruginosa*, crescidas nas condições 2N, 2NP, 5N e 5NP, em camundongos Swiss.

Dose Injetada (mg/Kg de peso do animal)	CONDIÇÃO DE CULTIVO				
	C	2N	2NP	5N	5NP
Intervalos					
400-500	-	-	(+) 450,45	(+) 429,18	(+) 413,22
200-399	-	(+) 354,61	(+) 210,97	(+) 204,92	(+) 226,24
180-199	(+) 180,96	(+) 190,62	-	(+) 185,18 •	-
100-179	-	-	-	(-) 111,73	-
85-99	(+) 88,10	(+) 85,11	(+) 92,02	-	-
75-84	-	(+) 76,34 •	(+) 84,39	-	(+) 76,92 •
65-74	(+) 66,01	-	-	-	(-) 68,03
55-64	-	-	-	-	-
45-54	(+) 53,50	(-) 50,50	(+) 52,04 •	-	-
35-44	(+) 31,06 •	-	(-) 45,00	-	-
25-34	(-) 28,74	-	-	-	-

(+) Dose Letal ⇨ ocorrência de morte

(-) Dose Sub-letal ⇨ não-ocorrência de morte

• Dose Letal Mínima

4.2.2 - Grupo 2 → Toxicidade das células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* das culturas submetidas à variações de todos os nutrientes, em relação ao controle.

Na Tabela 7 são apresentados os valores da dose letal mínima, verificada a partir de bioensaios com animais que receberam injeções intraperitoniais de suspensão de células, crescidas em diferentes variações de todos os nutrientes.

Estes resultados nos demonstraram que, na possível condição "ótima" de crescimento (condição 2ASM-1), houve um aumento considerável da dose letal mínima, demonstrando que, apesar de ter havido um crescimento maior, as células tornaram-se menos tóxicas.

A análise estatística das diferentes doses letais mínimas (Tabela 4 do Anexo) deste grupo, demonstrou que em todas as condições, houve aumento significativo, em relação ao controle.

Tabela 7: Toxicidade da suspensão de células de *Microcystis aeruginosa*, crescidas nas condições ASM-1/2, ASM-1 (C) e 2ASM-1, em camundongos Swiss.

Dose Injetada (mg/Kg de peso do animal)	CONDIÇÃO DE CULTIVO			
	<i>ASM-1/2</i>	<i>C</i>	<i>2ASM-1</i>	<i>5ASM-1</i>
Intervalos				
400-500	(+) 499,00		(+) 416,70	(+) 487,00
340-399	-	-	-	(+) 345,00 •
300-339	(+) 323,00	-	-	(-) 338,00
200-299	-	-	(+) 226,00	(-) 297,00
170-199	-	(+) 180,96	(+) 171,30 •	(-) 198,00
130-169	(+) 135,00	-	(-) 164,50	(-) 140,00
100-129	(+) 102,00	-	(-) 122,00	(-) 107,00
85-99	(+) 87,00 •	(+) 88,10	-	-
75-84	(-) 84,00	-	-	-
65-74	-	(+) 66,01	-	-
55-64	-	-	(-) 57,00	(-) 56,00
45-54	-	(+) 53,50	-	(-) 54,00
35-44	(-) 37,00	(+) 31,06 •	(-) 42,00	-
25-34	-	(-) 28,74	-	-

(+) Dose Letal ⇨ ocorrência de morte

(-) Dose Sub-letal ⇨ não-ocorrência de morte

• Dose Letal Mínima

4.2.3 - Valores da DL₅₀ calculados para as culturas submetidas à diferentes concentrações de Nitrogênio e Fósforo, em relação ao controle.

Nas Figuras 6 e 7 estão representados os valores de DL₅₀ para as condições de nitrogênio inferiores ao controle e nitrogênio e fósforo superiores ao controle, respectivamente.

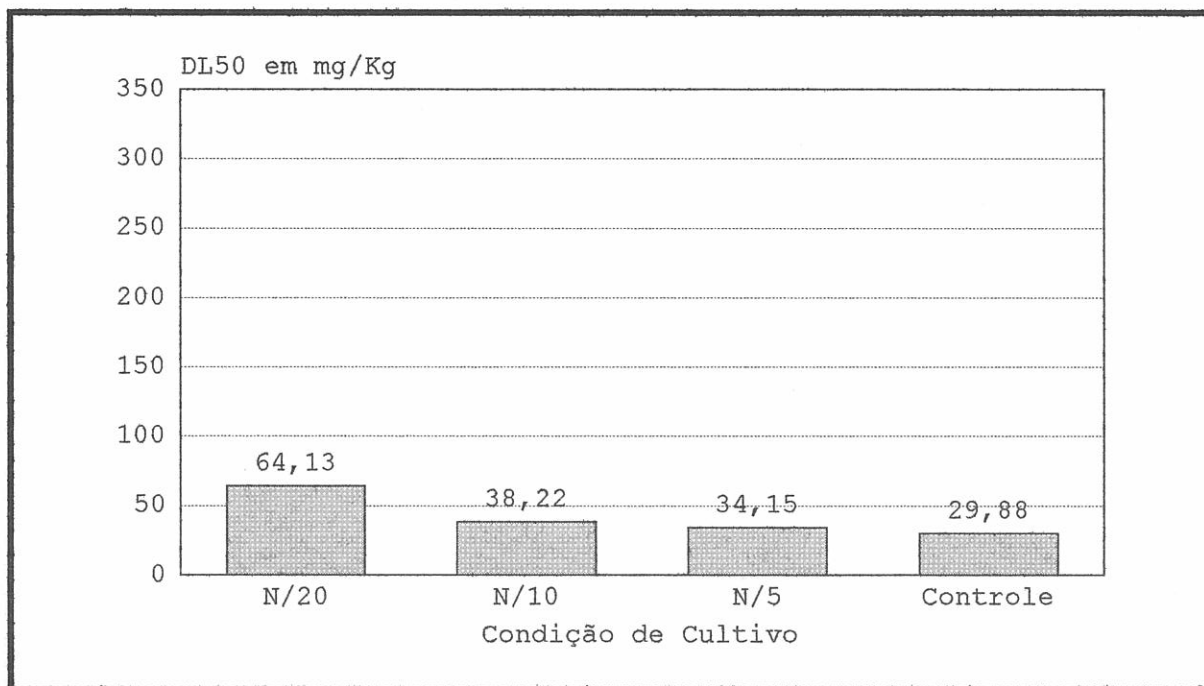


FIGURA 6: DL₅₀ para as culturas submetidas à concentrações de Nitrogênio, inferiores ao controle.

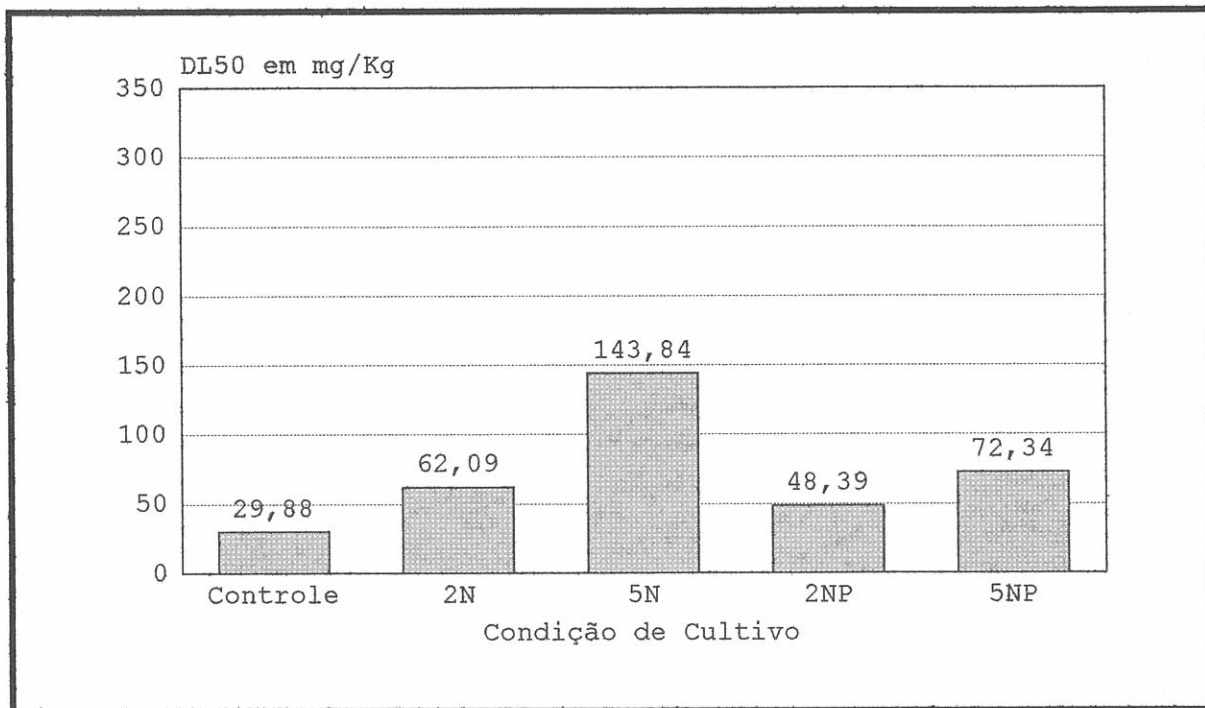


FIGURA 7: DL₅₀ para as culturas submetidas à concentrações de Nitrogênio e Fósforo, superiores ao controle.

4.2.4 - Valores da DL₅₀ calculados para as culturas submetidas à variações de todos os nutrientes, em relação ao controle.

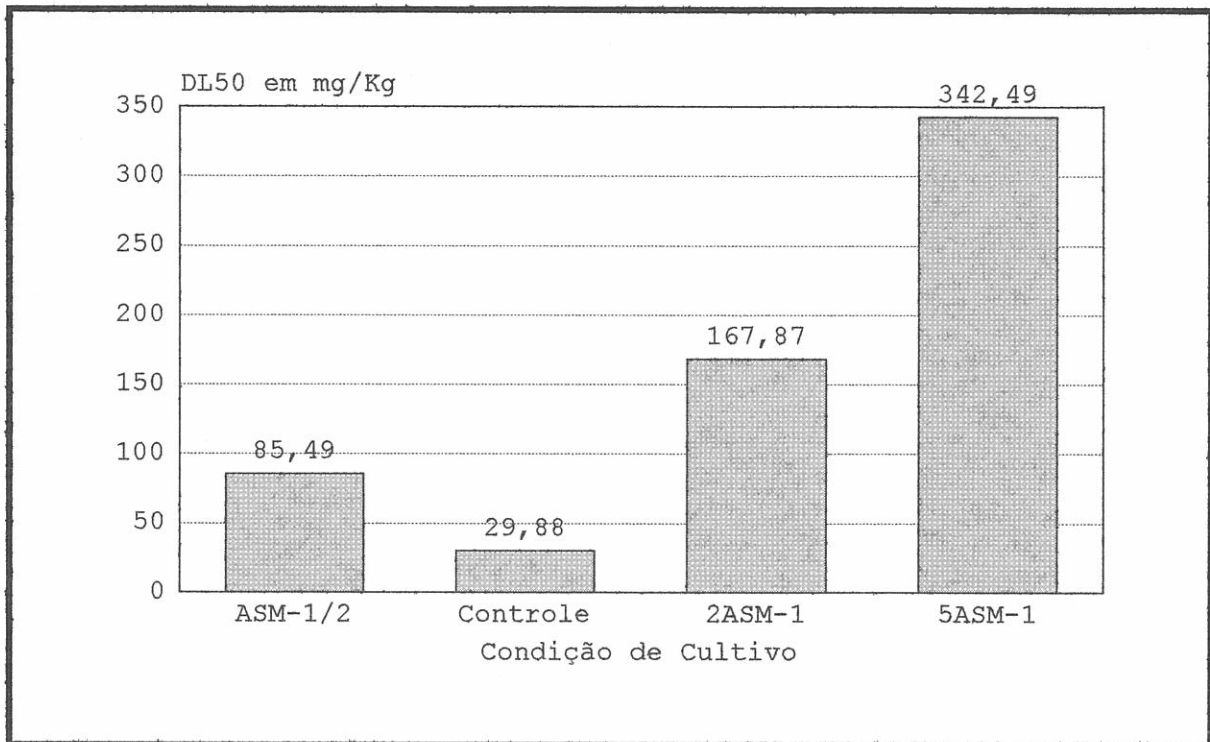


FIGURA 8: DL₅₀ para as culturas submetidas à variações de todos os nutrientes, em relação ao controle.

4.3 - Extração, Purificação e Verificação da Variação Quali-quantitativa das Toxinas:

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão representados os perfis cromatográficos após a separação em coluna semi-preparativa, das amostras ASM-1/2, ASM-1 (Controle) e 2ASM-1.

Nesses perfis foram obtidos, para a separação das toxinas, em condições isocráticas, os seguintes tempos de retenção:

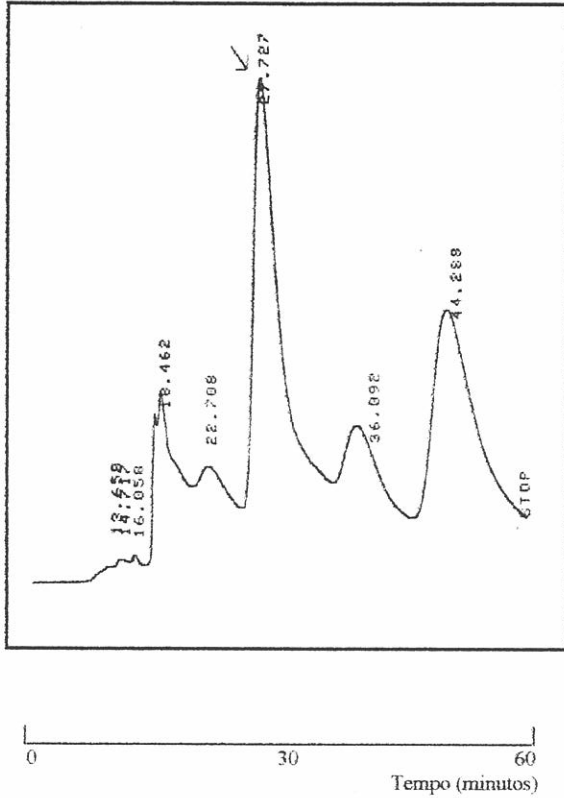
- ASM-1/2 = 28 minutos
- ASM-1 (C) = 31 minutos
- 2ASM-1 = 28 minutos

E, em condições de gradiente:

- ASM-1/2 = 20 minutos
- ASM-1 (C) = 23 minutos
- 2ASM-1 = 17 minutos

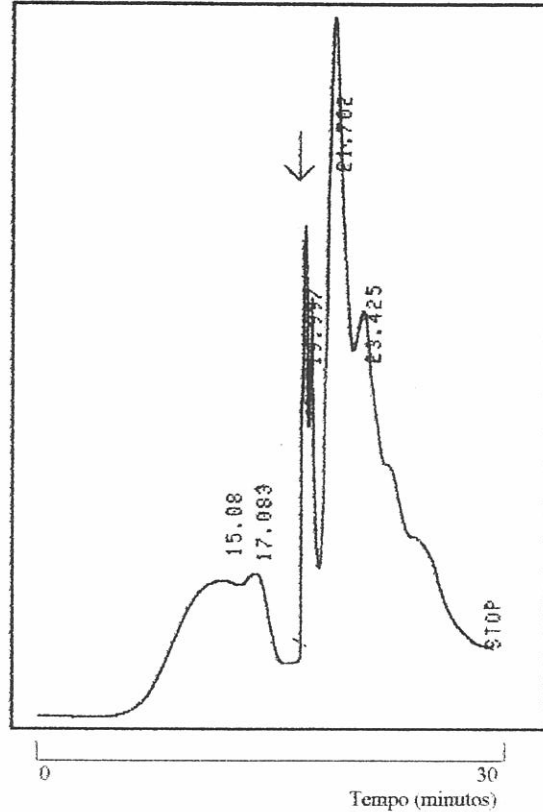
4.3.1 → Condição ASM-1/2

Resposta do Detetor (A)



(A)

Resposta do Detetor (A)



(B)

Figura 9: Perfil Cromatográfico obtido após a separação da amostra ASM-1/2, em coluna preparativa, em condições isocráticas (A) e gradiente (B), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

- Os picos assinalados (↓) correspondem as frações que se mostraram tóxicas em bioensaios.

4.3.2 → Condição ASM-1 (Controle)

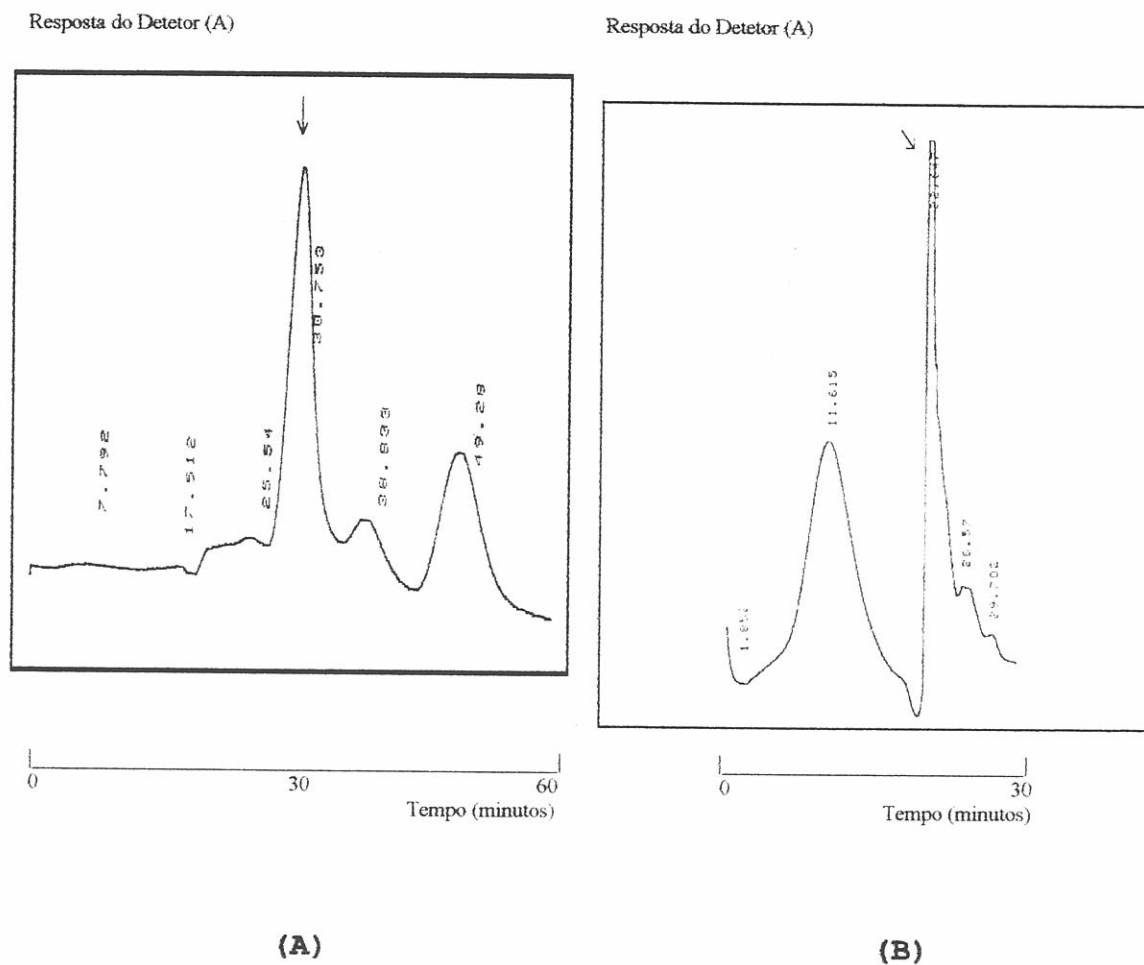
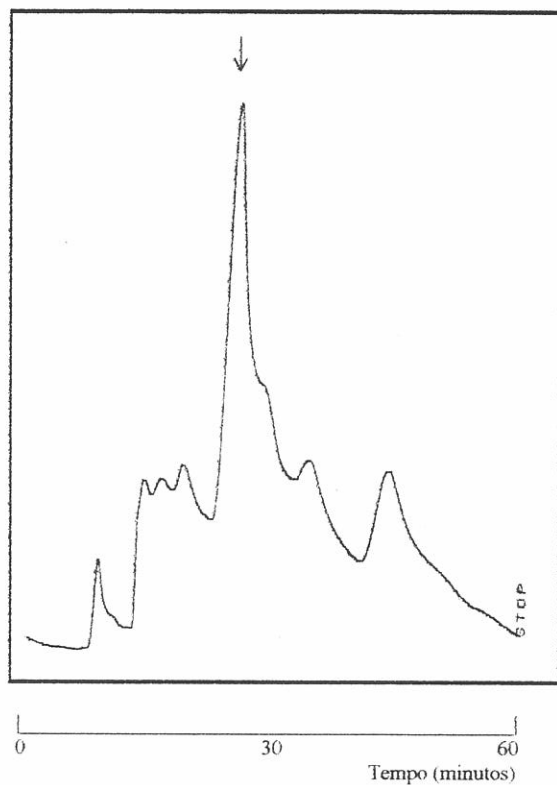


Figura 10: Perfil Cromatográfico obtido após a separação da amostra ASM-1 (C), em coluna preparativa, em condições isocráticas (A) e gradiente (B), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

- Os picos assinalados (↓) correspondem as frações que se mostraram tóxicas em bioensaios.

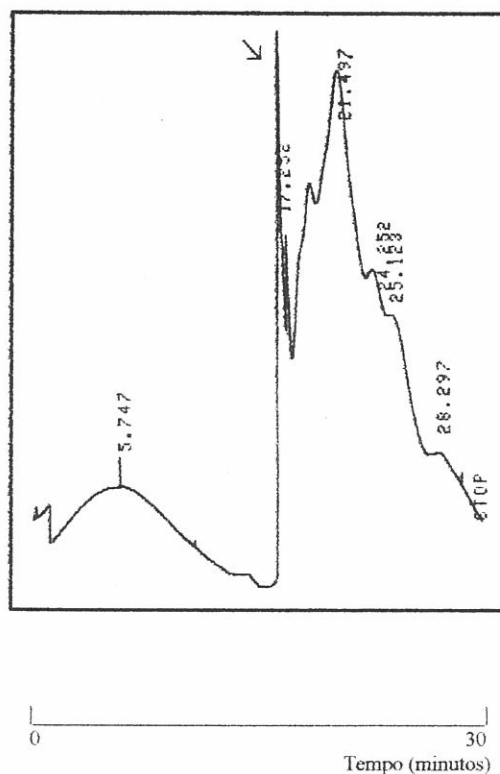
4.3.3 → Condição 2ASM-1

Resposta do Detetor (A)



(A)

Resposta do Detetor (A)



(B)

Figura 11: Perfil Cromatográfico obtido após a separação da amostra 2ASM-1, em coluna preparativa, em condições isocráticas (A) e gradiente (B), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

- Os picos assinalados (↓) correspondem as frações que se mostraram tóxicas em bioensaios.

Nas Figuras 12,13 e 14 estão representados os perfis cromatográficos após a separação, em coluna analítica, das **microcistinas LR e LF**, em condições isocráticas, nas diferentes condições de cultivo.

4.3.4 → Condição ASM-1/2

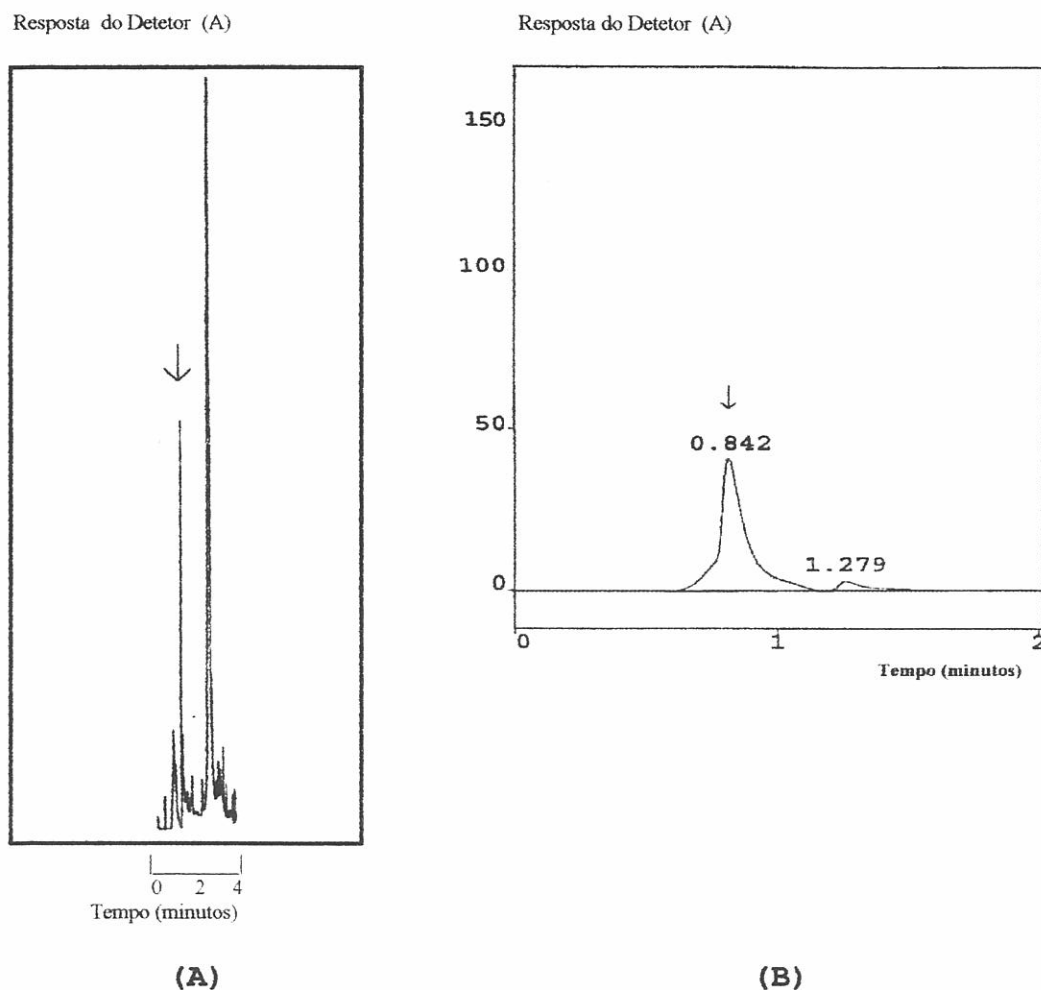


Figura 12: Perfil Cromatográfico obtido após a separação da amostra ASM-1/2, em coluna analítica, em condições isocráticas, das microcistinas LR(A) e LF(B), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

- Os picos assinalados (↓) correspondem as frações que se mostraram tóxicas em bioensaios.

4.3.5 → Condição ASM-1 (Controle)

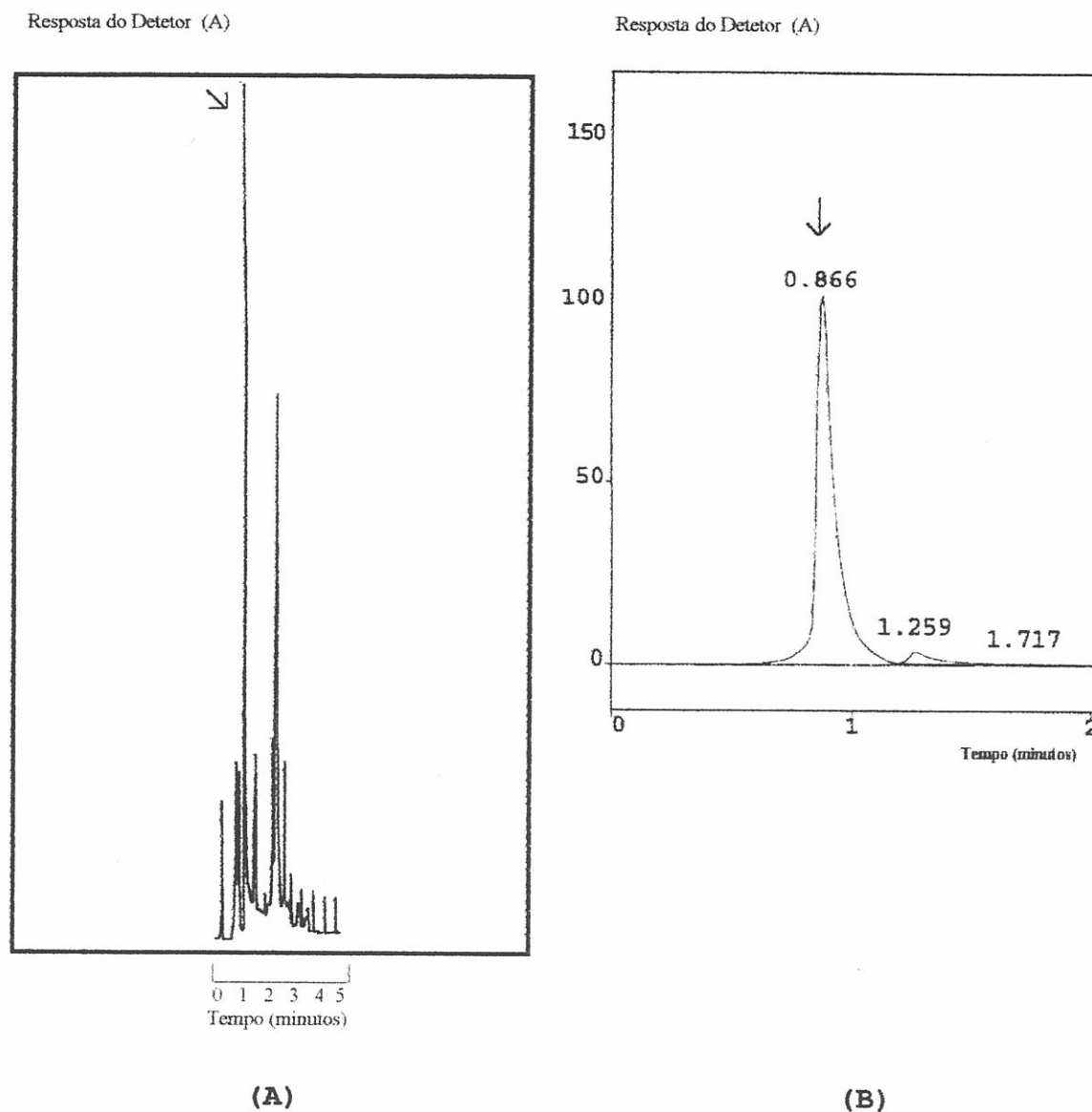


Figura 13: Perfil Cromatográfico obtido após a separação da amostra ASM-1 (C), em coluna analítica, em condições isocráticas, das microcistinas LR(A) e LF(B), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

- Os picos assinalados (↓) correspondem as frações que se mostraram tóxicas em bioensaios.

4.3.6 → Condição 2ASM-1

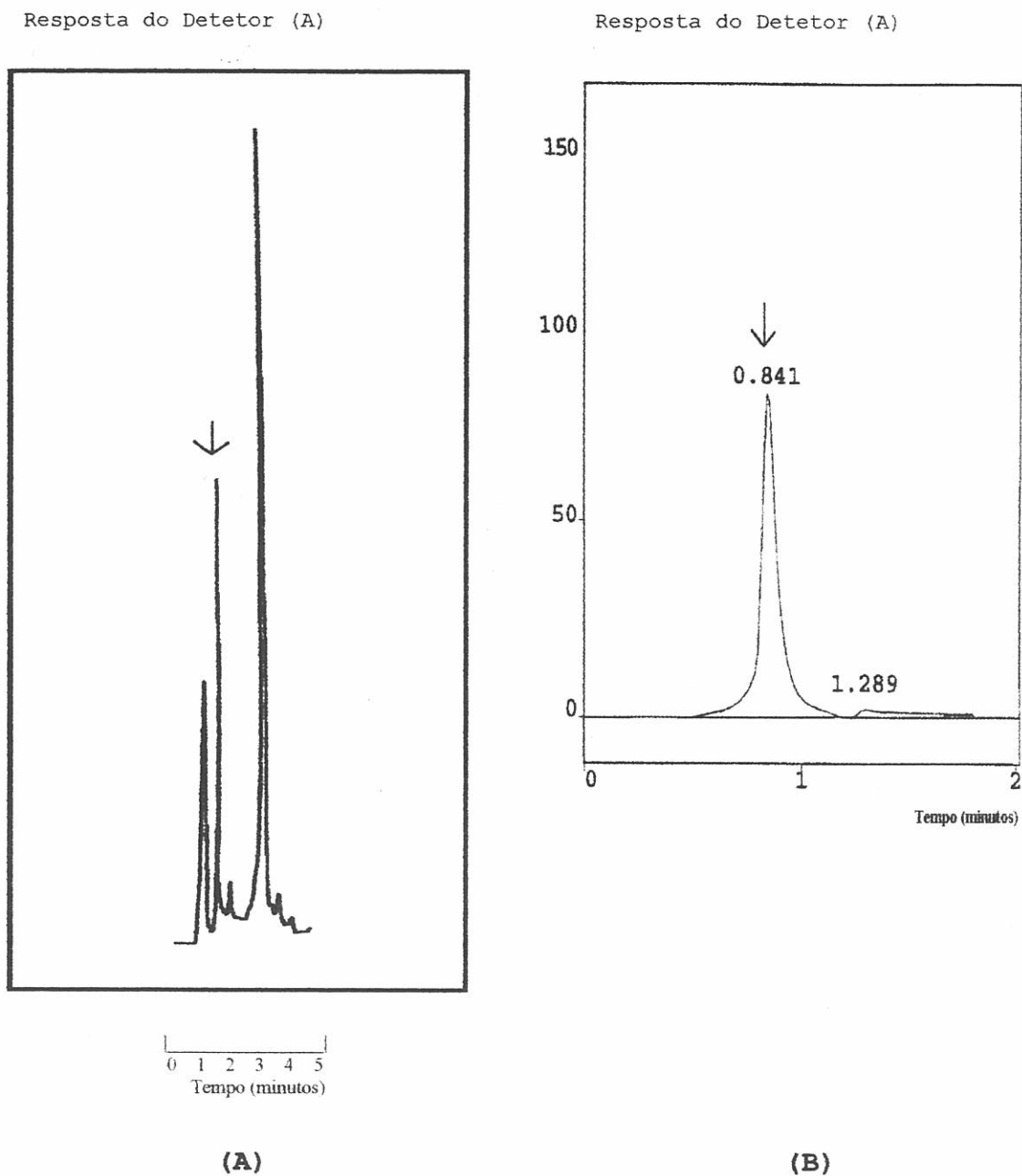


Figura 14: Perfil Cromatográfico obtido após a separação da amostra 2ASM-1, em coluna analítica, em condições isocráticas, das microcistinas LR(A) e LF(B), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-CLAE).

- Os picos assinalados (↓) correspondem as frações que se mostraram tóxicas em bioensaios.

4.3.6 → Variação percentual das microcistinas LR e LF, separadas em condições analíticas, em relação à área total do cromatograma, nas diferentes condições de cultivo.

Nas Tabelas 8 e 9 são representados os valores da área percentual das microcistinas LR e LF, respectivamente, com os cálculos de Médias e Desvio-padrão obtidos em cinco réplicas de cada uma das condições de cultivo.

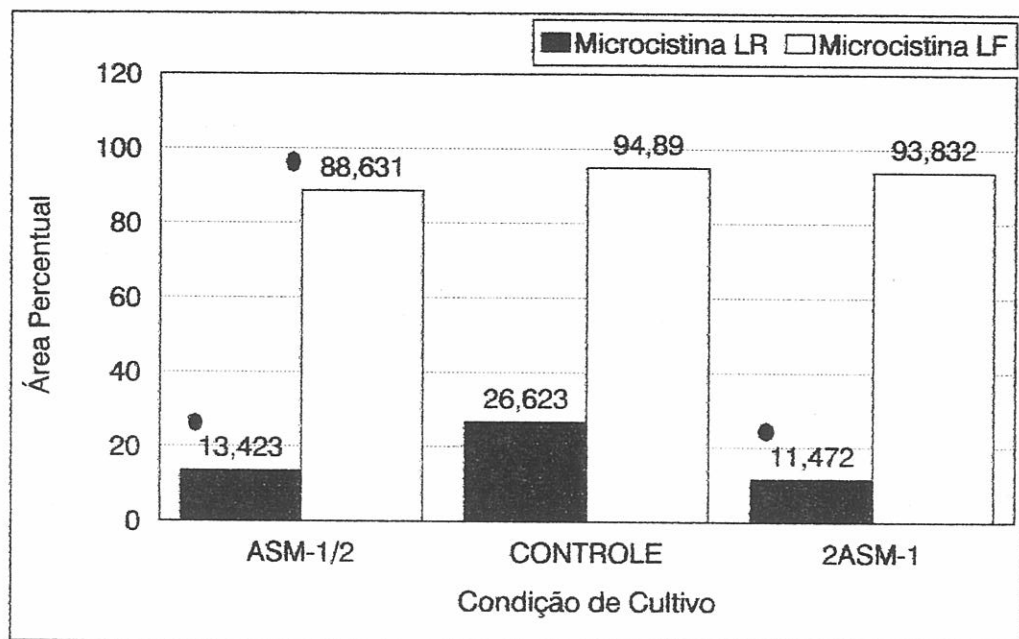
Tabela 8: Valores da área percentual da microcistina **LR**.

	ASM-1/2	ASM-1 (C)	2ASM-1
Réplica 1	13,7660	27,6335	11,7206
Réplica 2	13,2502	26,6468	12,1335
Réplica 3	13,1870	28,2508	11,2471
Réplica 4	13,5197	25,0645	11,1197
Réplica 5	13,3932	25,5214	11,2671
	X = 13,42	X = 26,62	X = 11,50
	s = 0,21	s = 1,21	s = 0,38

Tabela 9: Valores da área percentual da microcistina LF.

	ASM-1/2	ASM-1 (C)	2ASM-1
Réplica 1	89,1710	95,9416	93,6344
Réplica 2	89,4402	94,9905	94,5562
Réplica 3	88,5676	93,8771	94,0750
Réplica 4	87,8183	94,5112	93,5014
Réplica 5	88,1592	95,1282	93,3917
	X = 88,63	X = 94,89	X = 93,83
	s = 0,61	s = 0,68	s = 0,43

- Na Figura 15 estão representados graficamente, os valores das médias das variações percentuais das microcistinas LR e LF, nas diferentes condições de cultivo.



● Valores estatisticamente diferentes, em relação ao controle, ao nível de significância 5% (Vide Tabelas 5 e 6 do Anexo).

Figura 15: Variação percentual média das microcistinas LR e LF, em relação à área total do cromatograma, nas diferentes condições de cultivo.

- A análise estatística das variações percentuais médias das microcistinas LR e LF (Tabelas 5 e 6 do Anexo), demonstrou que, nas condições ASM-1/2 e 2ASM-1, houve variação significativa, em relação ao controle, na produção da microcistina LR enquanto que, apenas na condição ASM-1/2, esta variação foi significativa, na produção da microcistina LF.

5 - DISCUSSÃO:

5.1 - Crescimento Celular:

O crescimento de *Microcystis aeruginosa* em concentrações de Nitrogênio inferiores à condição controle mostrou que a diminuição deste nutriente não afetou a velocidade do crescimento, analisada pela taxa de crescimento diária, desta linhagem. Este fato pode ser explicado como resultado de uma adaptação prévia às condições de baixas concentrações nutricionais, já que o inóculo provinha de uma condição pobre em nutrientes (Tabela 2, Figura 3).

É importante ressaltar também que alguns gêneros fitoplanctônicos não heterocistados, que ocorrem comumente em águas continentais (*Microcystis*, *Gomphospharia*, entre outros), já foram identificados como possíveis fixadores de nitrogênio gasoso (REYNOLDS, 1984). Portanto, essa propriedade, que não foi por nós analisada, talvez possa ter contribuído para a manutenção das taxas de crescimento semelhantes à condição controle, em baixas concentrações de nitrogênio.

Esses resultados contradizem alguns descritos na literatura relativos à cultivos de Cianofíceas (WATANABE & OISHI, 1985; SIVONEN, 1990b), nos quais os autores demonstraram que decréscimos nas concentrações de Nitrogênio e Fósforo reduziram significativamente as taxas de crescimento.

Entretanto, quando analisamos o crescimento dessa linhagem em condições de Nitrogênio e Fósforo superiores à condição controle fica evidenciado que apenas nas condições 2N e 5N apresentaram uma redução significativa das taxas de crescimento (Tabela 3, Figura 4). Estes dados

demonstram que o aumento do nitrogênio não pode isoladamente amparar um bom crescimento celular, provavelmente por um desequilíbrio na relação N/P. **SMITH (1983)** relata que ambientes que apresentam uma relação N/P em proporções menores que 10:1 apresentam-se com maior dominância de espécies de Cianofíceas.

SIVONEN (1990b) também relatou que em concentrações luxuriantes destes nutrientes, o crescimento também decai, possivelmente devido ao desequilíbrio existente entre aqueles nutrientes.

Os resultados mostraram também a diminuição da fase de adaptação (fase **lag**), em condições de deficiências nutricionais. Este fato pode ser explicado pela menor necessidade de adaptação do sistema enzimático, já que as condições as quais as células foram submetidas durante o experimento são semelhantes às condições do inóculo, o que concorda com resultados citados em **FOGG & THAKE (1987)** para experimentos de variação de duração da fase **lag**, com diferentes espécies fitoplanctônicas.

Os resultados de biomassa celular nas diferentes condições experimentais não mostraram-se significativamente diferentes, em relação ao controle (Tabelas 2 e 3), demonstrando que em nenhuma das condições testadas, houve aumento significativo da massa celular ou uma variação significativa do armazenamento de substâncias, já que não houve variação da biomassa por célula.

Entretanto, os resultados de rendimento máximo celular, mostram redução significativa nas condições N/20, N/10 e N/5 (Figura 3, Tabela 2) demonstrando que, em condições de escassez de nitrogênio, as células pararam de se dividir e morreram mais rapidamente do que nas outras condições testadas, diminuindo assim, os valores de rendimento máximo. Estes resultados podem ser explicados a partir da importância

do nitrogênio na participação da formação de proteínas, um dos componentes básicos da biomassa. **ESTEVEES (1988)** relatou que o nitrogênio, presente em baixas concentrações, pode atuar como fator limitante na produção primária de ecossistemas aquáticos.

Todos estes resultados revelam que pequenas variações nutricionais (por exemplo, a condição N/5) podem modificar a resposta do rendimento máximo de uma linhagem de uma determinada espécie.

O crescimento de *Microcystis aeruginosa* com variações das concentrações de todos os nutrientes, em relação ao controle (Figura 5, Tabela 4), mostrou que a diminuição de todos os nutrientes (condição ASM-1/2) não acarretou uma diferença significativa na taxa de crescimento. Estes dados indicam que, mesmo em condições de escassez de nutrientes, a linhagem NPJB-1 não diminuiu a velocidade de crescimento, apenas diminuindo o rendimento celular. Ou seja, a divisão celular exponencial é interrompida num tempo menor, atingindo portanto mais rapidamente a fase estacionária do cultivo.

Não houve também variação da biomassa celular na condição de diminuição dos nutrientes, mostrando mais uma vez que, em condições nutricionais reduzidas, não há acúmulo significativo de substâncias para reserva, nesta linhagem.

Já na condição 2ASM-1 houve aumento significativo em todos os parâmetros analisados (Tabela 4). Estes resultados mostraram que, além desta condição permitir crescimento mais rápido (aumentando a taxa de crescimento), as células permaneceram por mais tempo em fase exponencial de crescimento (aumentando o rendimento celular) e reservando uma quantidade maior de substâncias e/ou aumentando o volume celular. Esta condição foi considerada como condição "ótima"

de crescimento, em relação a todas as outras condições testadas, inclusive o controle.

Nesta condição, fica evidenciada a importância do equilíbrio dos nutrientes na velocidade do crescimento de uma célula algal, fato este imprescindível para experimentos com culturas em massa.

Entretanto, na condição 5ASM-1 (Tabela 4), o aumento significativo da biomassa celular e do rendimento celular não foi acompanhado por aumento na taxa de crescimento. Estes resultados podem demonstrar que concentrações luxuriantes podem tornar-se inibitórias do crescimento celular, como relatou **SIVONEN (1990b)**, em trabalhos com a Cianofícea *Oscillatoria agardhii*, também produtora de hepatotoxina.

Estes resultados revelam a condição considerada "ótima" (condição 2ASM-1) como uma possível condição a ser utilizada, para esta linhagem, em cultivos em massa, com fins biotecnológicos.

É necessário ressaltar que todas as outras condições de cultivo mantiveram-se constantes (temperatura, luz, pH e fotoperíodo).

5.2 - Testes de Toxicidade:

Os resultados dos testes de toxicidade, com algas crescidas em meios com diferenças nutricionais, (Tabelas 5 e 6, Figuras 6 e 7), nos demonstraram que a $DL_{mínima}$ e a DL_{50} aumentaram em todas as condições testadas, em relação à condição controle.

De acordo com **ECOBICHON (1992)**, as células desta linhagem podem ser consideradas, em relação à DL_{50} , em todas as condições testadas, como muito tóxicas a moderadamente tóxicas.

Os valores obtidos para toxicidade das células que cresceram em condições de redução de nitrogênio, estão de acordo com os dados apresentados por **CODD & POON (1988)**, que observaram que a remoção de nitrogênio causa um decréscimo de até 10 vezes na toxicidade de espécies de Cianofíceas hepatotóxicas.

WATANABE & OISHI (1985) relataram que decréscimos nas concentrações de fósforo têm um efeito mínimo na variação da toxicidade de *Microcystis aeruginosa*, enquanto que decréscimos nas concentrações de nitrogênio passam a ter efeitos maiores nesta produção. Estes dados concordam com os resultados expostos na Tabela 5, na qual as condições N/20, N/10 e N/5 apresentaram redução na toxicidade.

SIVONEN (1990b) demonstrou que variações nas concentrações de Nitrogênio e Fósforo podem influenciar a toxicidade das células, aumentando ou diminuindo a dose letal mínima e que, níveis de saturação de fósforo estão relacionados com a produção destas toxinas.

Entretanto, na Tabela 6 podemos observar que aumentos nas concentrações de Nitrogênio e Fósforo não levaram a um aumento da toxicidade, demonstrando que a produção destas hepatotoxinas não parece ser influenciada por um simples

fator (no caso, esses nutrientes), mas sim por um conjunto de condições ambientais tais como: intensidade luminosa, temperatura, pH, que dificilmente podem ser estudados de forma integrada, em condições laboratoriais.

Os resultados da análise estatística da dose letal mínima, apresentados na Tabela 4 do anexo, demonstraram que em todas as condições houve diferença significativa, em relação ao controle. Nesta análise ficou evidenciada a formação de sub-grupos, nos quais as $Dl_{mínimas}$ são iguais: condições 5NP e 2N; condições N/5, N/10 e 2NP.

Estes resultados sugerem que variações nas proporções dos nutrientes Nitrogênio e Fósforo não parecem afetar diretamente a produção de toxinas por esta linhagem.

Os resultados obtidos e expostos na Tabela 7 e Figura 8, demonstraram que a condição "ótima" de crescimento (condição 2ASM-1) não é idêntica à condição "ótima" para a produção destas toxinas, o que concorda com os dados obtidos por **VAN DER WESTHUIZEN & ELOFF (1985)** que observaram que nas condições "ótimas" de crescimento celular em relação à temperatura e luz, não houve a maior produção de toxina em células de *Microcystis aeruginosa*.

Por outro lado, **Brown (1974)** citado em **WICKS & THIEL (1990)** investigou o efeito de diferentes concentrações de alguns nutrientes na toxicidade de *Microcystis aeruginosa* e, em todas as condições testadas, nas quais houve aumento das concentrações dos nutrientes, houve aumento na toxicidade, enquanto que, nas condições onde houve redução dos nutrientes, houve redução da toxicidade.

Estes resultados levantam a questão de que parâmetros de crescimento selecionados para estudos de cultura em massa nem sempre são bons parâmetros para avaliação da produção destas toxinas. E que, os resultados obtidos com linhagens

diferentes da mesma espécie, podem ser conflitantes em relação à produção de toxinas por essas células.

Durante a realização dos bioensaios, foi observado que todos os animais mortos apresentaram sintomas comuns à intoxicação por hepatotoxinas e o peso dos fígados foram verificados logo após a morte dos animais. Pela análise das peças foi possível determinar que a morte realmente ocorreu por hemoaglutinação no sistema porta-hepático, pois todos os fígados mostravam-se bastante escurecidos e com um aumento de cerca de 100% de peso, em relação aos animais controles.

Diante desses resultados, foram escolhidas as condições ASM-1/2, ASM-1 (Controle) e 2ASM-1 para verificação da variação quali-quantitativa da produção dessas hepatotoxinas.

5.3 - Extração, Purificação e Verificação da Variação Quali-quantitativa das Toxinas:

Os resultados apresentados nas Figuras 9, 10 e 11 mostraram-se concordantes com os encontrados no trabalho de AZEVEDO *et al.* (1994). Estes autores trabalharam com essa mesma linhagem de algas, cultivada na condição controle e separaram duas microcistinas, LR e LF, sendo esta última inédita na literatura mundial.

Nas Tabelas 8 e 9, Figura 15 estão representados os valores da variação percentual, em relação à área total do cromatograma, das microcistinas LR e LF, nas diferentes condições de cultivo. Esta variação demonstrou ser bastante acentuada em relação à microcistina LR.

Estes resultados comprovaram a razão pela qual houve um aumento da DL₅₀ (Figura 8) e conseqüente diminuição da toxicidade, nas condições ASM-1/2 e 2ASM-1, já que se notou um decréscimo acentuado da produção da microcistina LR nestas condições.

Tais resultados possuem importância muito grande em ecotoxicologia já que, embora tenham sido feitas referências sobre efeitos diretos da eutroficação no aumento da produção de toxinas, os dados por nós obtidos demonstram que condições de altas concentrações de nutrientes podem promover um aumento no número de células de Cianofíceas, mas não influenciar diretamente a produção de toxinas por célula. Entretanto é importante ressaltar que a condição controle (ASM-1) representa uma condição hipereutrófica, uma vez que os ambientes aquáticos tropicais são considerados eutróficos a partir de $100\mu\text{g/l}$ de NO_3 ou $40\text{-}60\mu\text{g/l}$ de PO_4 (**TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1992**).

A análise estatística destes valores, representada nas Tabelas 5 e 6 do Anexo, nos demonstrou que em relação à microcistina LF, só houve diminuição significativa da condição de cultivo ASM-1/2, enquanto que para a microcistina LR, nas duas condições (ASM-1/2 e 2ASM-1) houve diminuição significativa, em relação ao controle. Esta análise indica que essas variações nutricionais causam decréscimos na produção de toxina, mas que, esses decréscimos foram acentuadamente maiores na produção da microcistina LR. Estes resultados indicam interferência seletiva sobre a via bioquímica da produção das mesmas.

Este decréscimo na biossíntese dessas toxinas pode estar relacionado com um estresse nutricional. Alguns autores já haviam, teoricamente, levantado estas questões. **LUKAC & AEGERTER (1993)** levantaram a hipótese que a produção de microcistinas seja uma resposta à estresses ambientais específicos.

Estes resultados tornam-se relevantes, frente às constatações relativas à microcistina LR como promotora de

tumores hepáticos (FALCONER & BUCKLEY, 1989; MATSUSHIMA *et al.*, 1990; MACKINTOSH *et al.*, 1990; ERIKSSON *et al.*, 1990; FALCONER, 1991; NAKANO *et al.*, 1991; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992; FUJIKI, 1992) e portanto, um controle adequado das concentrações de nutrientes num ecossistema aquático pode representar não apenas um cuidado com a ecologia do sistema mas também ser relevante do ponto de vista de saúde pública.

6 - CONCLUSÕES:

1) As variações nutricionais reduziram significativamente as taxas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* - linhagem NPJB-1, nas condições de cultivo 2N, 5N e ASM-1/2, e aumentaram significativamente nas condições 2ASM-1 e 5ASM-1, em relação ao controle;

2) As variações nutricionais apenas aumentaram significativamente os valores de biomassa celular nas condições de cultivo 2ASM-1 e 5ASM-1, sendo o rendimento celular reduzido nas condições de cultivo N/20, N/10, N/5 e ASM-1/2 e aumentado nas condições 2ASM-1 e 5ASM-1, para esta linhagem;

3) A condição de cultivo 2ASM-1 foi considerada a melhor condição para o crescimento celular desta linhagem quanto aos parâmetros: taxa de crescimento, biomassa e rendimento celular;

4) Variações nutricionais podem influenciar a produção de hepatotoxinas na linhagem NPJB-1. As condições "ótimas" de cultivo para o crescimento celular não coincidiram com as condições "ótimas" para a produção de hepatotoxinas; portanto, parâmetros de crescimento selecionados neste trabalho para estudos de cultura em massa não se mostraram bons parâmetros para avaliação da produção destas hepatotoxinas;

5) Não foi constatada correlação entre o aumento das concentrações de nutrientes e o aumento da produção destas hepatotoxinas, nesta linhagem, para as condições testadas;

6) A redução da hepatotoxicidade nas condições ASM-1/2 e 2ASM-1 deveu-se principalmente, à diminuição da produção da microcistina LR.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AARONSON, B.T. & DUBINSKY, Z. (1980). Microalgae as a source of chemicals and natural products. In: Shelef, G. & Soeder, C.J. (edit.). Algal Biomass Production and use. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p.575-601.
- AGUIAR, D.G.; BOBEDA, C.R.R. & AZEVEDO, S.M.F.O. (1990). Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento e produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa*, em condições de cultivo. 3^o Congresso Brasileiro de Limnologia; Porto Alegre.
- AGUIAR, D.G.; BOBEDA, C.R.R. & AZEVEDO, S.M.F.O. (1993). Toxicity of *Microcystis aeruginosa* strains isolated from bodies of water in Rio de Janeiro. *Toxicon*, 31:107-108.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. (1994). Isolation and characterization of Hepatotoxic microcystins from a Brazilian Cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 06:261-265.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.;
LOVELL, R.A. & VALENTINE, W.M. (1989). Intoxication in
livestock and water fowl. Clinical toxicology -
veterinary clinics of north america. *Food Animal
Practice*, 5:345-361.

BEYRUTH, Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; CARVALHO,
M.C. & PEREIRA, H.A.S.L. (1992). Toxic algae in
freshwater of são Paulo. In: Cordeiro-marino, M.;
Azevedo, M.T.P.; Sant'anna, C.L.; Tomita, N.Y. &
Plastino, E.M. (eds), *Algae and Enviroment: A General
Approach*. Sociedade Brasileira de Ficologia, Companhia
de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo,
pp.53-64.

BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J. & GORHAM, P.R. (1959).
Isolation and identification of the fast-death factor
in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian of
Biochemistry and Physiology*, 37:453-471.

BOBEDA, C.R.R. (1993). Isolamento, purificação e
caracterização de microcistinas (heptapeptídeos
cíclicos) encontradas em uma floração de Cianobactérias
ocorrida no Reservatório do Funil (Resende, RJ). *Tese
de Mestrado, NPPN, UFRJ*.

- BROOK, W.P. & CODD, G.A. (1987). Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacology and Toxicology*, 60:187-191.
- CARMICHAEL, W.W.; BIGGS, D.F. & GORHAM, P.R. (1975). Toxicology and pharmacology action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science*, 187:542-544.
- CARMICHAEL, W.W.; BIGGS, D.F. & PETERSON, M.A. (1979). Pharmacology of anatoxin-a produced by freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon*, 17:229-236.
- CARMICHAEL, W.W. & GORHAM, P.R. (1980). Freshwater cyanophyte toxins: types and their effects of microalga biomass. In *Algal Biomass, Production and Use*, SHELEFG & SOEDER, C.J. (edit.). Esevier/North-Holland Biomedical Press, p. 437-448.
- CARMICHAEL, W.W. & SCHWARTZ, L.D. (1984) Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. *Farmers Bulletin* 2275, Washington D.C., U.S. Dept. of Agriculture.

- CARMICHAEL, W.W. (1988). Toxins of freshwater algae. In *Handbook of Natural Toxins*, ed. Tu, A.T. pp. 121-147, New York, Marcel Dekker.
- CARMICHAEL, W.W.; MAHMOOD, N.A. & HYDE, E.G. (1990). Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae) . In *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, HALL, S. & STRICHARTZ, G. (edit.), pp. 87-106, Washington D.C., American Chemical Society.
- CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72:445-459.
- CARMICHAEL, W.W. (1994). The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270(1):64-72.
- CODD, G.A. & POON, G.K. (1988). Cyanobacteria toxins. In *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*; Rogers, L.J. & Gallon, J.G. (edit.); 283-296 pp.; Oxford; Oxford Science Publishers.
- COSTA, S.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. (1994). Implantação de um Banco de Cultivo de Cianofíceas Tóxicas. *IHERINGIA, Sér.Bot.*, 45:69-74.

- ECOBICHON, D.J. (1992). *The Basis of Toxicity Testing*, CRC Press, Inc., 160 pp.
- ELLEMAN, T.C.; FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B. & RUNNEGAR, M.T.C. (1978). Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (*Anacystis cyanea*) bloom. *Australian Journal of Biological Sciences*, 31:209-218.
- ERIKSSON, J.E.; PAATERO, G.I.L.; MERILUOTO, J.A.O.; CODD, G.A.; KASS, G.E.N.; NICOTERA, P. & ORRENIUS, S. (1989). Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Experimental Cell Research*, 185:86-100.
- ERIKSSON, J.E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J.A.O.; KARAKI, H.; HAN, Y-G. & HARRTSHORNE, D. (1990). Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibitors of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 173:1347-1353.
- ESTEVEZ, F.A. (1988). *Fundamentos de Limnologia*, Editora Interciência/FINEP, Rio de Janeiro, 575 pp.
- FALCONER, I.R. & BUCKLEY, T.H. (1989). Tumor promotion by *Microcystis* s.p., a blue-green alga occurring in water supplies. *Medical Journal of Australia*, 150:351.

- FALCONER, I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6:177-184.
- FOGG, G.E. & THAKE, B. (1987). Algal Cultures and Phytoplankton Ecology, 3rd editon, The University of Wiscosin Press, 269 pp.
- FUJIKI, H. (1992). Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? *Molecular Carcinogenesis*, 5:91-94.
- GIBSON, C.E. & SMITH, R.V. (1982). Freshwater plankton. In: Carr, N.G. & Whitton, B.A. (edit.), *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell Scientific Publications, pag. 463-490.
- GORHAM, P.R. & CARMICHAEL, W.W. (1988). Harzards of freshwater blue-green (cyanobacteria). In: *Algae and Human Affairs*, Lembi, C.A. & Waaland, J.R. (edit.); ch 16; 403-431 pp.; Cambridge; Cambridge University Press.

- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. (1977).
Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median
Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ.
Sci. Technol.*, 11(7):714-719. Correction 12(4) 417.
(1978).
- HARADA, K-I.; MATSUURA, J.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.;
OISHI, S.; DAHLEN, A.M.; BEASLEY, V.R. & CARMICHAEL,
W.W. (1990a). Isolation and characterization of the
minor components associated with microcystins LR and RR
in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon*,
28(1):55-64.
- HARADA, K-I.; OGAWA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE,
M.F.; ITEZONO, Y. & NAKAYAMA, N. (1990b). Structural
determination of geometrical isomers of microcystins LR
and RR from cyanobacterial by two-dimensional NMR
spectroscopic techniques. *Chemical Research in
Toxicology*, 3(5):473-481.
- HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; WAITE, L.L.; KUKLENSCHMIDT,
M.S.; CARMICHAEL, W.W. & HASCHEK, W.M. (1991). Actin
filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo*
and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the
blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary
Pathology*, 28:258-266.

- HUGHES, E.O.; GORHAM, P.R. & ZHENDER, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystia aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 4:225-236.
- JACKSON, A.R.B.; MCINNES, A.; FALCONER, I.R. & RUNNEGAR, M.T.C. (1984). Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology*, 21:102-113.
- KEIJOLA, A.M. (1988). Removal of Cyanobacterial Toxins in Water Treatment Processes: Laboratory and Pilot-Scale Experiments. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 3:643-656.
- KIVIRANTA, J.; NAMIKOSHI, M. SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & RINEHART, K.L. (1992). Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon*, 30:1093-1098.
- KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL, W.W. & SARVER, E.W. (1986). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 24:865-873.

- LUKAC, M. & AEGERTER, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31(3):293-305.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P. & CODD, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, 264:189-192.
- MAHMOOD, N.A. & CARMICHAEL, W.W. (1986). The pharmacology of anatoxin-a(S), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon*, 24:425-434.
- MAHMOOD, N.A. & CARMICHAEL, W.W. (1987). Anatoxin-a(S), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon*, 25:1221-1227.
- MATSUSHIMA, R.; YOSHIZAWA, S.; WATANABE, M.F.; HARADA, K-I; FURUZAWA, M.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. (1990) In vivo and in vitro effects of protein phosphatase inhibitors, microcystin and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171:867-874.

- MURTHY, J.R. & CAPINDALE, J.B. (1970). A new isolation and structure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48:508-510.
- MYNDERSE, J.R.; MOORE, R.E.; KASSHIWAGI, M. & NORTON, T.R. (1977). Antileukemic activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplysitoxin from *Lyngbya*. *Science*, 196:538-540.
- NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N. & NAKANO, M. (1991). Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:327-330.
- NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R. & CARMICHAEL, W.W. (1989). Total synthesis ADDA, the unique C20 aminoacid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetrahedron Letters*, 30:4349-4352.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGUNUMA, M.; KOHYMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118:420-424.

- ODRIOZOLA, E.; BALLABENE, N. & SALAMANCO, A. (1984).
Intoxication en ganado bovino por algas verde-azuladas.
Rev. Argentina de Microbiologia, 16(4):219-224.
- OLIVEIRA, A.C.P.; AGUIAR, D.G. & AZEVEDO, S.M.F.O. (1992).
Estudo ecológico integrado da Lagoa da Barra, Maricá,
RJ. IV - Avaliação da toxicidade das espécies de
Cianofíceas dominantes. Simpósio sobre Estrutura,
Funcionamento e Manejo de Ecossistemas - UFRJ, Rio de
Janeiro, 27-29 de maio de 1992.
- OLIVEIRA-FILHO, A.M.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AGUIAR, D.G. &
SANTOS, C.E. (1993). Toxic cyanobacteria for the
control of mosquito larvae. *Toxicon*, 31:157-158.
- REYNOLDS, C.S. (1984). The Ecology of Freshwater
Phytoplankton (Cambridge Studies in Ecology), Cambridge
University Press, 384 pp.
- RUNNEGAR, M.T.C. & FALCONER, I.R. (1981). Isolation,
characterization and pathology of the toxin from the
blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. In W.W.
Carmichael (edit.) *The Water and Environment Algal
Toxins and Health*; 325-342 pp.; New York: Plenum Press.

- RUNNEGAR, M.T.C. & FALCONER, I.R. (1986). Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultra-structural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 24:109-115.
- SAARIO, E.; ABDEL-HAMEED, A. & KIVIRANTA, J. (1994). Larvicidal microcystin toxins of cyanobacteria affect midgut epithelial cells of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 8:398-400.
- SCOTT, W.E. (1991). Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in Southern Africa. *Water. Sci. Tech.*, 23:175-180.
- SHILO, M. (1967). Formation and mode of action algal toxins. *Bacteriological Reviews* 31(3): 180-193.
- SIEGEL, J. (1985). *Statistix. User's Manual. Analytical Software, USA, 317 pp.*
- SIVONEN, K. (1990a). Toxic cyanobacteria in Finnish freshwaters and Baltic sea. Academic Dissertation in Microbiology. Department of Microbiology. University of Helsinki.

SIVONEN, K. (1990b). Effect of temperature, light, nitrogen and phosphorus on hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:2658-2666.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; ANDERSON, R.A.; MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E. & SKULBERG, R. (1992). Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11:321-329.

SMITH, V.H. (1983). Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in Lake Phytoplankton. *Science*, 221:669-670.

SPIVAK, C.E.; WITKOP, B. & ALBUQUERQUE, E.X. (1980). Anatoxin-a: a novel potent agonist at the nicotinic receptor. *Molecular Pharmacology*, 18:384-394.

SPIVAK, C.E.; WATERS, J.; WITKOP, B. & ALBUQUERQUE, E.X. (1983). Potencies and channel properties induced by semirigid agonist at frog nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular Pharmacology*, 23:337-343.

TOERIEN, D.F.; SCOTT, W.E. & PITOUT, M.J. (1976).
Microcystis toxins' isolation, identification,
implications. *Water South Africa (Pretoria)*, 2:160-162.

TUNDISI, J.G. & MATSUMURA-TUNDISI, T. (1992).
Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative
analysis, case studies, perspectives. In *Algae and
Environment: a General Approach*; Cordeiro-Marino, M.;
Azevedo, M.T.P.; Sant'anna, C.L.; Tomita, N.Y. and
Plastino, E.M. (edit.); 1-33 pp.; São Paulo; Sociedade
Brasileira de Ficologia.

TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; WATANABE, M.F.; SUZUKI,
S.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T. & HARADA, K-
I. (1994). A Clean-up method for analysis of trace
amounts of microcystins in lake water. *Toxicon*,
32(10):1251-1259.

VAN DER WESTHUIZEN, A.J. & ELOFF, J.N. (1985). Effect of
temperature and light on the toxicity and growth of the
blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006).
Planta, 163:55-59.

- VAN DER WESTHUIZEN, A.J.; ELOFF, J.N. & KRUGER, G.H.J. (1988). Effect of culture age and pH of the culture medium on the composition of the toxins of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* UV-006. *S. Afr. J. Bot.*, 554(4):372-374.
- VASCONCELOS, V.M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. (1993). Isolation of microcystin-LR from a *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) waterbloom collected in the drinking water reservoir for Porto, Portugal. *J. Environ. Sci. Health*, A28(9):2081-2094.
- WATANABE, M.F. & OISHI, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:1342-1344.
- WICKS, R.J. & THIEL, P.G. (1990). Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hyperertrophic African Reservoir. *Environ. Sci. Technol.*, 24:1413-1418.

ZHANG, Q-X.; CARMICHAEL, W.W.; YU, M.J. & LI, S-H. (1991).
Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater
cyanobacterial (blue-green algae) waterblooms collected
in central China. *Environmental Toxicology and
Chemistry*, 10:313-321.

ANEXOS

TABELA 1: Valores e comparação de médias pelo Teste de Tukey, após Análise de Variância, para o parâmetro **Taxa de Crescimento**.

VARIÁVEL	MÉDIA	GRUPOS
2ASM-1	0,1833	I
5ASM-1	0,1433	I
ASM-1 (C)	0,1167	I I
N/5	0,1067	I I
2NP	0,1067	I I
N/10	0,0967	I I I
5NP	0,0933	I I I
N/20	0,0867	I I I
ASM-1/2	0,0833	I I I
2N	0,0767	I I
5N	0,0667	I

Existem 5 grupos nos quais as médias não são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância 5%.

TABELA 2: Valores e comparação de médias pelo Teste de Tukey, após Análise de Variância, para o parâmetro **Biomassa Celular**.

VARIÁVEL	MÉDIA	GRUPOS
2ASM-1	8,3000	I
5ASM-1	6,4000	I
2N	4,0000	I
5N	3,7000	I I
ASM-1 (C)	3,6667	I I
N/10	3,6333	I I
2NP	3,5667	I I
N/20	3,4000	I I
5NP	3,3000	I I
N/5	3,1667	I
ASM-1/2	3,0333	I

Existem 4 grupos nos quais as médias não são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância 5%.

TABELA 3: Valores e comparação de médias pelo Teste de Tukey, após Análise de Variância, para o parâmetro **Rendimento Celular**.

VARIÁVEL	MÉDIA	GRUPOS
2ASM-1	26,367	I
5ASM-1	23,300	I I
2NP	20,267	I I
5NP	19,500	I I
ASM-1 (C)	19,233	I I
2N	17,267	I I
5N	16,633	I
ASM-1/2	12,333	I
N/5	11,300	I
N/10	4,3667	I
N/20	3,7333	I

Existem 6 grupos nos quais as médias não são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância 5%.

TABELA 4: Valores e comparação de médias pelo Teste de Tukey, após Análise de Variância, para o parâmetro **Dose Letal Mínima**.

VARIÁVEL	MÉDIA	GRUPOS
5ASM-1	345,00	I
5N	185,23	I
2ASM	171,30	I
ASM-1/2	87,000	I
5NP	76,867	I
2N	76,333	I
N/20	66,200	I
2NP	52,000	I
N/10	47,600	I I
N/5	40,767	I
ASM-1 (C)	31,100	I

Existem 9 grupos nos quais as médias não são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância 5%.

TABELA 5: Valores e comparação de médias pelo Teste de Tukey, após Análise de Variância, para as concentrações da microcistina LR.

VARIÁVEL	MÉDIA	GRUPOS
ASM-1	26,623	I
ASM-1/2	13,423	I
2ASM-1	11,498	I

Todas as 3 médias são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância 5%.

TABELA 6: Valores e comparação de médias pelo Teste de Tukey, após Análise de Variância, para as concentrações da microcistina LF.

VARIÁVEL	MÉDIA	GRUPOS
ASM-1	94,890	I
2ASM-1	93,832	I
ASM-1/2	88,631	I

Existem 2 grupos nos quais as médias não são significativamente diferentes entre si, ao nível de significância 5%.