

Sandra da Silva Fernandes

Biodisponibilidade de Cianotoxinas em Bivalves



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada*

Departamento de Zoologia-Antropologia

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Fevereiro / 2008

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, é com profundo reconhecimento que agradeço:

- ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos, orientador científico desta dissertação, por ter sugerido o tema, pela preciosa orientação em todas as fases do meu trabalho, pela leitura criteriosa dos textos e pela inestimável disponibilidade;
- aos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia Dr. Augusto Nobre (CIIMAR), Micaela Vale, Viviana Lopes, Pedro Leão, Joana Martins, Joana Azevedo, Joana Osswald, Isabel Nogueira, Bárbara Frazão, Cristiana Moreira, Zé Carlos Martins, Vítor Ramos, Rui Seabra e Rosário Martins pelo seu apoio, conselhos e pelo bom ambiente de trabalho criado;
- ao Professor Doutor Martin Welker (ANAGNOSTEC) pela preciosa ajuda com a análise da toxina por MALDI-TOF-MS;
- ao André, do Laboratório de Ecotoxicologia (CIIMAR), pela ajuda na análise enzimática;
- a todos os colegas de mestrado, pela amizade e colaboração;
- a todos os meus amigos, a sua amizade e incentivo;
- aos meus pais e restante família, o incentivo e o apoio prestado durante todo o meu percurso académico e o carinho e ensinamentos dispensados ao longo da vida;
- ao Xico, por ter segurado sempre, até por vezes à distância, a mão que escreveu esta dissertação.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a acumulação e a depuração de hepatotoxinas produzidas pela cianobactéria de água doce *Microcystis aeruginosa* no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*. Mexilhões foram alimentados diariamente com $1,5 \times 10^5$ células/ml da cianobactéria tóxica que produz microcistinas -FR, -LR e -WR, duas vezes por dia, durante quatro dias. Após este período, a água em que se encontravam os animais foi mudada e estes passaram a ser alimentados com a alga verde *Ankistrodesmus* sp. Durante duas semanas, a concentração da toxina nos mexilhões foi monitorizada usando um ensaio ELISA. Os mexilhões mostraram um nível máximo detectável de microcistinas (MCs) de 0,38 µg/g peso seco de mexilhão durante o período de acumulação e de 0,37 µgMC/g de peso seco de mexilhão durante o período de depuração. Ocorreu então uma tendência de diminuição com picos de toxina nos dias 8 e 12 do período de depuração. A actividade das enzimas de destoxicação glutathiona-S-transferases (GSTs) foi estudada e os resultados mostraram que os picos de toxina nos mexilhões coincidem com um aumento na actividade das GSTs. Estes resultados apoiam a teoria de que o aumento do nível de toxina nos mexilhões nos dias 4, 8 e 12 do período de depuração está relacionado com a renovação das proteínas fosfatases e consequente libertação das toxinas desligadas. Tendo em conta o presente trabalho, os programas de monitorização de florescências de algas prejudiciais que incluem as cianobactérias e as suas hepatotoxinas, nomeadamente em águas salobras como estuários de rios eutróficos, deveriam estabelecer períodos em que a colheita e o consumo de mexilhões contaminados deveriam ser proibidos para evitar perigos para a saúde humana.

ABSTRACT

The accumulation and depuration of hepatotoxins produced by the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* was studied. Mussels were fed daily $1,5 \times 10^5$ cells/ml of the toxic cyanobacterium, that produces microcystins -FR, -LR and -WR, twice a day, for four days. After that period animals were placed in toxin free water and were fed the green algae *Ankistrodesmus* sp. During two weeks the concentration of the toxin in the mussels were monitored using an ELISA assay. Mussels showed a maximum detectable level of microcystins (MCs) of $0,38 \mu\text{g/g}$ mussels dry weight (DW) during the accumulation period and of $0,37 \mu\text{g MC/g}$ mussel DW by day 4 of the depuration period. Then there was a decrease trend with peaks of toxin at days 8 and 12 of the depuration period. The activity of the detoxication enzymes glutathione-S-transferases (GSTs) was studied and the results showed that the peaks of toxin in the mussels coincide with an increase in the activity of GSTs. These results support the theory that the rise of the toxin level on days 4, 8 and 12 of the depuration period in the mussels is related to the renewal of protein phosphatases and subsequent release of unbound toxins. Taken into account the present work, monitoring programs for harmful algal blooms that include toxic cyanobacteria and their hepatotoxins, namely in brackish waters such as estuaries of eutrophic rivers, should establish periods when harvesting and consumption of contaminated mussels should be prohibited, in order to avoid human health hazard.

RESUME

L'accumulation et la dépuration d'hépatotoxines produites par la cyanobactérie d'eau douce *Microcystis aeruginosa* dans la moule *Mytilus galloprovincialis* ont été étudiées. Les moules ont été nourries avec $1,5 \times 10^5$ cellules/ml de la cyanobactérie toxique qui produit les microcystines -FR, LR et WR, deux fois par jour, pendant quatre jours. Après cette période, l'eau où se trouvaient ces animaux a été changée et les moules ont été nourries avec l'algue verte *Ankistrodesmus* sp. Pendant deux semaines la concentration de la toxine dans les moules a été monitorisée en utilisant un essai ELISA. Les moules ont montré un niveau détectable maximal de microcystines (MCs) de 0,38 µgMC/g de poids sec de moule pendant la période d'accumulation, et de 0,37 µgMC/g de poids sec de moule au jour 4 de la période de dépuración. Alors, il y a eu une tendance décroissante, avec des pics de toxine aux jours 8 et 10 de la période de dépuración. L'activité des enzymes de détoxification glutathione-S-transferases (GSTs) a été étudiée et les résultats ont montré que les pics de toxine dans les moules coïncident avec une augmentation dans l'activité des GSTs. Ces résultats soutiennent la théorie de que l'augmentation du niveau de la toxine dans les moules, les jours 4, 8 et 12 de la période de dépuración, est en rapport avec le renouvellement des protéines phosphatases et subséquente libération de toxines déliées. Considérant le travail présent, les programmes de monitorisation de fleurs d'eau nuisantes qui incluent les cyanobactéries toxiques et leurs hépatotoxines, à savoir dans les eaux saumâtres telles que les estuaires de rivières eutrophiques, devraient établir des périodes où la cueillette et la consommation de moules contaminées devraient être interdites pour éviter des problèmes pour la santé humaine.

ÍNDICE

1. Introdução	9
1.1. Cianobactérias: taxonomia, biologia e ecologia.....	9
1.2. Ocorrência de cianobactérias em água doce	10
1.2.1. Consequências ecológicas da ocorrência de cianobactérias tóxicas	11
1.2.2. Consequências da ocorrência de cianobactérias tóxicas para a saúde humana ..	13
1.3. Toxinas produzidas por cianobactérias.....	14
1.3.1. Caracterização química e toxicológica.....	15
1.3.2. Métodos de detecção e análise das cianotoxinas	19
1.4. Bioacumulação de toxinas em bivalves	20
1.4.1. Utilização de bivalves para monitorização de cianotoxinas.....	20
1.4.2. Bioacumulação e depuração de toxinas por bivalves.....	21
1.5. Objectivo	23
2. Material e Métodos.....	24
2.1. Aclimação dos mexilhões.....	24
2.2. Cultivo da cianobactéria <i>Microcystis aeruginosa</i> e da alga verde <i>Ankistrodesmus</i> sp.	24
2.3. Experiência de acumulação e depuração	24
2.4. Análise da toxina presente nos mexilhões	25
2.5. Análise da actividade das glutathione-S-transferases.....	26
2.6. Análise dos resultados.....	28
3. Resultados e Discussão.....	30
3.1. Análise da toxina presente nos mexilhões	30
3.2. Análise da actividade das glutathione-S-transferases.....	32
4. Conclusões	36
5. Considerações Finais	37
6. Referências Bibliográficas	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cianobactérias: taxonomia, biologia e ecologia

As cianobactérias, também chamadas algas azuis-verdes, são organismos procarióticos unicelulares, coloniais ou multicelulares filamentosos que apresentam algumas características do grupo Algae: parede celular, pigmentos fotossintéticos e capacidade de realizar fotossíntese (Chorus, 2001). Assim, as cianobactérias são microrganismos que, para sobreviverem, apenas necessitam de água, CO₂, alguns minerais e luz (Mur *et al.*, 1999). Nos ecossistemas de água doce, a maioria das cianobactérias faz parte do fitoplâncton, sendo produtores primários, contribuindo assim para a produtividade primária do ecossistema.

Estes organismos têm uma ampla distribuição geográfica, desde o Ártico ao Antártico, podendo ser aquáticos ou terrestres, vivendo livremente ou em associação com outros seres vivos (Bothe, 1982; Adams, 2000). Segundo alguns autores, a sua capacidade para ocuparem todos os habitats deve-se à sua longa história evolutiva, havendo registros fósseis de cianobactérias com 3500 milhões de anos (Shopf, 1993; Whitton & Potts, 2000).

Com o aumento da poluição e crescente eutrofização dos meios dulciaquícolas, tem vindo a verificar-se um aumento de densidade populacional de cianobactérias – florescências, ou *blooms*, cada vez mais frequente, em todo o mundo e ao longo de todo o ano. Estes fenómenos têm causado desequilíbrios ecológicos graves que estão muitas vezes associados à eutrofização das massas de água. As florescências ou *blooms* referem-se às ocorrências de populações fitoplanctónicas em densidades superiores à média, em determinado local (ca. 20 000 cél./ml em águas de recreio e para consumo humano) (Oliver & Ganf, 2000).

As florescências de cianobactérias constituem uma preocupação especial que se relaciona com a produção de toxinas por parte destes organismos. As cianobactérias são bactérias Gram-negativas capazes de produzir uma extensa gama de potentes toxinas como metabolitos secundários: as cianotoxinas.

A classe das cianobactérias inclui 150 géneros e cerca de 2000 espécies. 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 (tipo de filamentos, plano de divisão celular, etc.). Elas estão agora colocadas no grupo *Eubacteria* na taxonomia filogenética (Duy *et al.*, 2000). Existem diversos organismos produtores de cianotoxinas e outros que não produzem

cianotoxinas. Os organismos responsáveis por intoxicações por toxinas de cianobactérias incluem cerca de 40 géneros, mas os principais são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Planktothrix* (Carmichael, 2001).

1.2. Ocorrência de cianobactérias em água doce

As características fisiológicas das cianobactérias que parecem contribuir para o seu sucesso competitivo em relação a outros fitoplanctons e consequente formação de florescências, são: a presença de vacúolos gasosos que lhes confere mobilidade vertical, permitindo reduzir as perdas de biomassa por sedimentação e regular a sua profundidade na coluna de água, otimizando assim as condições de luz e de nutrientes em que se encontram; a capacidade de fixação de azoto por parte de certos géneros, especialmente quando a relação N:P é baixa; e a maior capacidade de acumulação de polifosfatos por parte de certas cianobactérias comparativamente com outras microalgas, permitindo a multiplicação das cianobactérias em situações de baixa concentração de fósforo (Sommer, 1985; Oliver & Ganf, 2000).

Globalmente, as toxinas de cianobactérias mais frequentemente encontradas em florescências de águas doces e salobras são os péptidos cíclicos da família microcistinas e das nodularinas. 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 toxina de cianobactéria estudada (Microcistina) ter sido isolada a partir de uma estirpe de *Microcystis aeruginosa* (Carmichael *et al.*, 1988). Assim, desenvolveram-se principalmente técnicas de investigação direccionadas para as microcistinas.

O facto das ocorrências das cianobactérias estarem a aumentar e a possibilidade de serem libertadas toxinas para os sistemas de água doce têm despertado todo o interesse nesta problemática. Assim, a comunidade científica internacional tem o objectivo de conhecer melhor as consequências destas ocorrências assim como os modos de as evitar, o que tem estado patente nos inúmeros trabalhos científicos relacionados com este tema, que têm surgido ao longo dos últimos anos (Chorus & Bartram, 1999; Whitton & Potts, 2000; Chorus, 2001).

1.2.1. Consequências ecológicas da ocorrência de cianobactérias tóxicas

As florescências de cianobactérias 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 lipopolissacáridos (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).

As células cianobacterianas produtoras de toxinas armazenam-nas durante a maior parte da sua vida, sendo apenas libertadas aquando da lise celular, quando as cianobactérias são ingeridas pelo zooplâncton ou peixes, quando rebentam no processo de tratamento de água para consumo ou quando se decompõem naturalmente.

Para além da libertação de cianotoxinas, os efeitos nefastos das florescências de cianobactérias são: formação de tapetes na superfície da água, dificultando as trocas na interface ar/água; alteração da viscosidade do meio; diminuição da zona eufótica; alteração do odor e do sabor da água; e situações de anóxia, 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 bioamplificáveis 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, 1995a, 1999; Amorim & Vasconcelos, 1999; Saker *et al.*, 2004). O facto das cianotoxinas serem acumuladas nestes organismos sem lhes provocarem efeitos letais, torna-os vectores de toxinas para os níveis tróficos superiores, incluindo o Homem.

As cianobactérias também são responsáveis por alterações nas populações de peixes, tendo-se registado casos de morte em massa aquando do aparecimento de florescências (Codd & Roberts, 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 (anóxia).

Os peixes apresentam sintomas de intoxicação por microcistinas semelhantes a alguns observados em 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).

O facto dos animais superiores como aves e mamíferos não serem capazes de distinguir uma florescência tóxica, torna-os susceptíveis a intoxicações por ingestão e imersão 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) (Tabela 1).

Relativamente aos níveis tróficos mais baixos, existem vários estudos laboratoriais com zooplantontes (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).

Tabela 1 – 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	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Odriozola <i>et al.</i> , 1984
Austrália	gado	hepatotoxicidade	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Jackson <i>et al.</i> , 1984
	gado	neurotoxicidade	<i>Anabaena circinalis</i>	Negri <i>et al.</i> , 1995
Canadá	gado	neurotoxicidade	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Carmichael & Gorham, 1978
	aves aquáticas	neurotoxicidade	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Pybus & Hobson, 1986
Finlândia	cães	hepatotoxicidade	<i>Nodularia spumigena</i>	Pearson <i>et al.</i> , 1984
	aves aquáticas, peixes, rato almiscarado	hepatotoxicidade	<i>Planktothrix agardhii</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 1986
Noruega	gado	hepatotoxicidade	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Skulberg, 1979
Inglaterra	cães	hepatotoxicidade	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Pearson <i>et al.</i> , 1990
Escócia	cães	neurotoxicidade	<i>Oscillatoria spp.</i>	Gunn <i>et al.</i> , 1992
	peixes	danos nas brânquias	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bury <i>et al.</i> , 1995
E.U.A.	cães	neurotoxicidade	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Mahmood <i>et al.</i> , 1988

1.2.2. Consequências da ocorrência de cianobactérias tóxicas para a saúde humana

As cianotoxinas provocam efeitos adversos na saúde humana, os quais estão evidenciados em estudos epidemiológicos e toxicológicos. 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 polipéptidos cíclicos parecem exercer efeitos crónicos, nomeadamente a promoção do crescimento de tumores hepáticos e outros. Os seus efeitos agudos incluem morte por hemorragia e insuficiência hepática (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Para além do risco de consumo de alimentos contaminados, o outro 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 prolongada das populações consumidoras que poderão sofrer efeitos crónicos como é o caso do tumor hepático (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

As hepatotoxinas – microcistinas e nodularinas – são as toxinas mais comuns na produção de intoxicações crónicas, registando-se geralmente um aumento da actividade das enzimas hepáticas no plasma dos indivíduos intoxicados, uma vez que estas toxinas actuam a nível hepático, através da alteração da forma dos hepatócitos. Além de poder encontrar-se na forma livre, uma parte significativa da toxina captada pode, a nível molecular, ligar-se covalentemente às proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) (MacKintosh *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Dawson, 1998). Desta forma, inibem a sua actividade de uma forma notavelmente semelhante à do ácido ocadaico, um potente promotor de tumores que também é a toxina responsável pela intoxicação diarreica por moluscos (Cohen *et al.*, 1990). As proteínas fosfatases 1 e 2A são enzimas que regulam muitos processos (divisão e crescimento celular, metabolismo, controlo hormonal, entre outros), como respostas a sinais do seu ambiente (MacKintosh & MacKintosh, 1994). Quando a toxina entra numa célula e bloqueia a função das proteínas fosfatases, as células perdem o controlo normal e respondem inapropriadamente aos sinais, resultando muitas vezes numa doença como o cancro, diabetes ou numa desordem imunológica (MacKintosh & MacKintosh, 1994). Esta inibição dá-se através de um mecanismo de dois passos (Craig *et al.*, 1996). Depois de uma rápida ligação não-covalente inicial, as microcistinas podem formar uma ligação covalente com as subunidades catalíticas das proteínas fosfatases, a Cys273 nas PP1 ou a Cys266 nas PP2A, através do resíduo de N-metilhidroalanina (Mdha) (MacKintosh *et al.*, 1995; Runnegar *et al.*, 1995b). As hepatotoxinas aumentam

assim os níveis básicos de fosforilação proteica nos hepatócitos, devido à inibição das fosfatases. O baixo valor de IC₅₀ (concentração que causa 50% de inibição) para a inibição de PP1 e PP2A através de microcistinas é relativamente baixo, o que demonstra que as interações toxina-fosfatase são extremamente fortes (MacKintosh & MacKintosh, 1994).

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 Brasil (Caruaru), em 1996, 117 pessoas hemodializadas sofreram de intoxicação por cianotoxinas, 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 vômitos, hepatomegalia 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).

1.3. Toxinas produzidas por cianobactérias

As toxinas de origem bacteriana, onde se incluem as cianotoxinas, são já conhecidas desde há mais de 100 anos. Dividem-se em duas classes: toxinas bacterianas proteicas e lipopolissacáridos (LPS), estando estes últimos presentes na membrana celular das bactérias Gram-negativas, incluindo as cianobactérias (Alouf, 2000). As cianobactérias produzem ainda alcalóides tóxicos.

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 mesmo dentro de uma mesma espécie, nem todas as estirpes são tóxicas. Por vezes, podemos encontrar, na mesma florescência, estirpes tóxicas coabitando com outras não tóxicas. No entanto, ainda não se sabe quais os factores que levam determinada estirpe a produzir, ou não, cianotoxinas. Sabe-se ainda que uma mesma estirpe pode produzir mais do que uma variante de determinada cianotoxina.

1.3.1. Caracterização química e toxicológica

É possível dividir as cianotoxinas em 3 grandes grupos, de acordo com a sua estrutura química: os péptidos cíclicos (incluindo as microcistinas e nodularinas hepatotóxicas), os alcalóides (incluindo as cilindrospermopsinas hepatotóxicas, as neurotoxinas e as citotoxinas) e os lipopolissacáridos, que são potencialmente irritantes (podem afectar qualquer tecido exposto). Além disso, existem duas cianotoxinas marinhas que pertencem ao grupo dos alcalóides (aplisiatoxina mais debromoaplisiatoxina e lingbiatoxina-a) que causam irritação gastrointestinal e/ou cutânea (Chorus & Bartram, 1999; Carmichael, 2001).

Estruturalmente, as hepatotoxinas dividem-se em dois grupos: as microcistinas e as nodularinas. O órgão alvo destes dois grupos, 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 estrutura dos hepatócitos atrofiando-os, impedindo o contacto entre eles e provocando hemorragias que fazem aumentar o peso do 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 rápida letalidade (*e.g.* 20 minutos após injeção intraperitoneal de uma estirpe de *Microcystis* (Vasconcelos, 1994)). 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 tornam as hepatotoxinas promotoras de tumores (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

As neurotoxinas actuam no sistema nervoso, acabando por causar morte por paralisia dos músculos respiratórios. As anatoxinas causam paralisia muscular por sobre-estimulação das células musculares, nomeadamente as respiratórias, que acabam por paralisar por cansaço. Tal acontece porque a anatoxina-a 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 conseqüente relaxamento (Carmichael, 1994). A 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), inibindo a enzima acetilcolinesterase.

A acção das citotoxinas 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.*, 1995a). Falconer & Humpage (2001) encontraram evidências experimentais *in vivo* que sugerem um efeito carcinogénico crónico 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 induz intensa actividade biológica, resultando daí uma resposta inflamatória do organismo, especialmente no fígado, choque séptico e morte (Castro, 1997).

Na tabela 2 estão representadas as características químicas das principais cianotoxinas aquáticas.

Tabela 2 – [Continua na página seguinte] Descrição dos diversos tipos de cianotoxinas aquáticas (Sivonen & Jones, 1999).

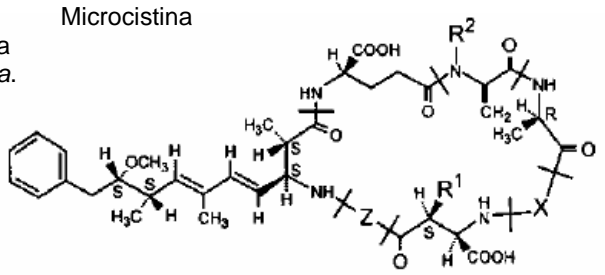
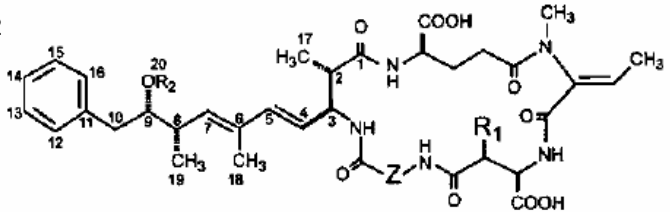
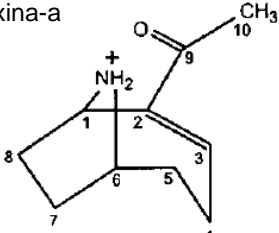
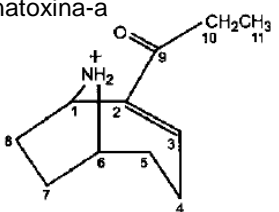
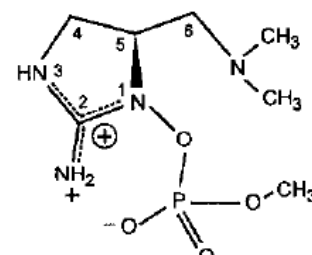
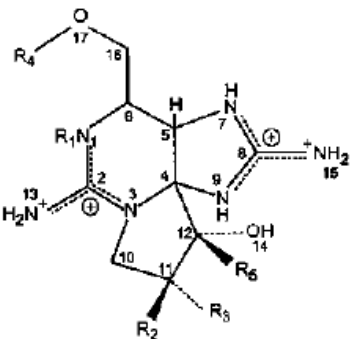
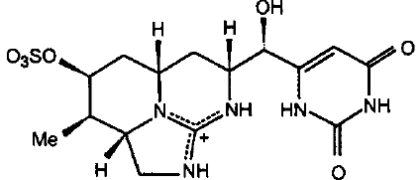
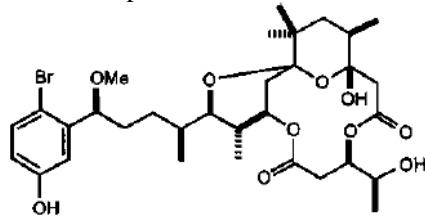
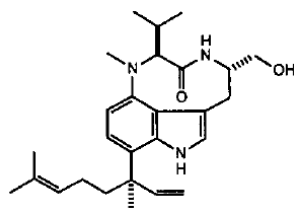
Tipo de toxina	Características químicas	Toxina	Estruturas-alvo nos mamíferos	Gêneros aquáticos produtores
hepatotoxina	heptapéptido cíclico; a maioria hidrossolúvel; ca. 60 variantes	Microcistina 	Fígado	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaena</i> <i>Anabaenopsis</i>
hepatotoxina	pentapéptido cíclico hidrossolúvel; 2 variantes	nodularina 	fígado	<i>Nodularia</i>
neurotoxina	alcalóide	anatoxina-a 	sinapses	<i>Anabaena</i> <i>Planktothrix</i> <i>Aphanizomenon</i>
neurotoxina	alcalóide	homoanatoxina-a 	sinapses	<i>Planktothrix</i>
neurotoxina	organofosforado	anatoxina-a(S) 	sinapses	<i>Anabaena</i>

Tabela 2 – [Continuação da página anterior] Descrição dos diversos tipos de cianotoxinas aquáticas (Sivonen & Jones, 1999).

Tipo de toxina	Características químicas	Toxina	Estruturas -alvo nos mamíferos	Géneros aquáticos produtores
neurotoxina	alcalóide; 16 variantes	saxitoxina	Axónios	<i>Aphanizomenon</i> <i>Anabaena</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i>
				
citotoxina	alcalóide	cilindrospermopsina	essencialmente fígado, mas também rim, baço, timo e coração	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i>
				
citotoxina	alcalóide	debromoaplisitoxina	pele, trato intestinal	<i>Schistoithrix</i> <i>Planktothrix</i> <i>Lyngbya</i>
				
citotoxina	alcalóide	lingbiatoxina-a	pele, trato intestinal	<i>Lyngbya</i>
				
irritante	lipopolissacáridos (LPS); Muitas variantes	LPS	potencialmente irritante: afecta qualquer tecido exposto	Todos

1.3.2. Métodos de detecção e análise das cianotoxinas

A detecção e análise das cianotoxinas podem ser feitas recorrendo a métodos químicos, bioquímicos, biológicos ou imunológicos. De todas as cianotoxinas, as microcistinas são as que têm métodos de detecção e quantificação mais desenvolvidos.

A análise química com cromatografia de fase líquida de alta resolução com detector UV (HPLC-UV) é hoje amplamente utilizada para a detecção, quantificação, purificação e isolamento de algumas cianotoxinas (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 por aí passam. 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 dos 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.

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 da 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 of 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). Como desvantagem tem o facto de não ser até ao momento quantitativa.

O facto das cianotoxinas alterarem o metabolismo enzimático tem sido aproveitado para a sua identificação. As microcistinas e nodularinas inibem as fosfatases proteicas, 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 microcistinas 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 muito 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 dois aminoácidos nelas presentes: Adda e arginina (An & Carmichael, 1994). Através de padrões de microcistina com concentrações conhecidas e de uma reacção colorimétrica anticorpo/antigene, traça-se uma recta padrão para determinar a concentração de microcistinas na amostra. O kit apresenta uma gama de sensibilidade de 0,1 ng/ml.

1.4. Bioacumulação de toxinas em bivalves

1.4.1. Utilização de bivalves para monitorização de cianotoxinas

De acordo com Vasconcelos (1995b), os moluscos, e em especial os mexilhões - *Mytilus* spp., são organismos vulgarmente utilizados em estudos de poluição aquática, possuindo enormes vantagens relativamente a outros invertebrados, porque:

- têm uma distribuição geográfica ubíqua, sendo, em muitas áreas, os componentes principais das comunidades bentónicas estuarinas e marinhas;
- são organismos sésseis e filtradores, amostrando o ambiente envolvente de uma forma bastante eficaz;

- acumulam rapidamente contaminantes químicos (pesticidas, hidrocarbonetos, metais, toxinas) nos seus órgãos com transformações metabólicas mínimas, reflectindo, por isso, de uma forma realista os níveis de contaminação ambiental;
- possuem muitas respostas fisiológicas subletais, sensíveis a poluentes a diferentes níveis (molecular, celular, individual, populacional, comunidades), reflectindo por isso grande parte dos mecanismos de toxicidade;
- as medições fisiológicas podem ser efectuadas no laboratório e no campo, podendo, por isso, utilizar-se as relações concentração-resposta, obtidas em laboratório, para interpretar as respostas medidas no meio natural.

As características atrás mencionadas e o facto de serem vulgarmente consumidos por populações humanas torna-os também alvo de programas de monitorização por parte de instituições ligadas à vigilância sanitária, tendo em vista evitar situações que ponham em risco a saúde humana (Vasconcelos, 1995b).

1.4.2. Bioacumulação e depuração de toxinas por bivalves

Os mexilhões podem ser facilmente mantidos em laboratório e são capazes de resistir a situações extremas, que muitas vezes ocorrem no ambiente natural, sendo assim ideais para estudos de bioacumulação (Vasconcelos, 1995b).

Sendo filtradores, os bivalves captam as partículas que existem em suspensão na água por filtração a nível das brânquias. A eficiência de filtração depende essencialmente do tamanho das partículas e da sua densidade na água. A água atravessa as lamelas branquiais através de movimentos ciliares, sendo as partículas transportadas até aos palpos labiais e boca (Dral, 1967). Ao mesmo tempo existe um mecanismo de limpeza, levado a cabo pelas brânquias, palpos labiais e outros órgãos, que promove a libertação de material em excesso através da cavidade do manto, sobre a forma de pseudofeces, que são expelidas periodicamente pela contracção cíclica dos músculos adutores (Jørgensen, 1981).

Existem vários estudos sobre a bioacumulação de microcistinas em bivalves tanto em laboratório (Eriksson *et al.*, 1989; Lindholm *et al.*, 1989; Vasconcelos, 1995a; Amorim & Vasconcelos, 1999; Yokoyama & Park, 2003) como no campo (Prepas *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997; Vanderploeg *et al.*, 2001; Yokoyama & Park, 2002).

Ambos os bivalves de água doce e os marinhos podem acumular toxinas de cianobactérias como as microcistinas (MCs). Mexilhões marinhos como *Mytilus galloprovincialis* mostraram acumular até 11 µgMC/g em experiências laboratoriais onde eram simuladas as condições encontradas em estuários de rios eutróficos (Vasconcelos, 1995; Amorim & Vasconcelos, 1999). Por outro lado, espécies de água doce como *Anodonta* sp. podem acumular as cianotoxinas saxitoxinas (Pereira *et al.*, 2004) e cilindrospermopsinas (Saker *et al.*, 2004).

Os dados obtidos a partir de experiências laboratoriais mostram que os moluscos bivalves são resistentes às toxinas de cianobactérias. Na maioria das experiências, nenhuma mortalidade (Amorim & Vasconcelos, 1999) ou taxas de mortalidade muito baixas foram registradas (Vasconcelos, 1995). Este facto mostra a possibilidade destes organismos serem eficientes vectores da toxina e possuírem mecanismos de destoxicação que podem evitar a acção da toxina contra eles.

As investigações mostram que as microcistinas que se encontram no estado livre no organismo dos mexilhões sofrem um processo denominado de destoxicação catalizada pelas glutathione-S-transferases (GSTs) (Pflugmacher *et al.*, 1998; Sipiä *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2007). Esta família de enzimas multi-funcionais pertence às vias de destoxicação da Fase II da biotransformação, responsáveis pela conjugação de substâncias electrofílicas e compostos oxidados à glutathione (GSH), para excreção directa, ou posterior metabolismo (Habig *et al.*, 1974). Além de poder encontrar-se na forma livre, uma parte significativa da toxina captada pode, a nível molecular, ligar-se covalentemente às proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) (MacKintosh *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Dawson, 1998), tornando-se não-detectável com os métodos comuns usados, tal como HPLC e ELISA (Vasconcelos, 1995a; Amorim & Vasconcelos, 1999).

A actividade das GSTs nos moluscos tem sido proposta como sendo um biomarcador de potencial poluição orgânica (Fitzpatrick *et al.*, 1997). Este complexo enzimático demonstrou reagir de um modo quantitativo às toxinas de cianobactérias (Pflugmacher *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2007). No que diz respeito ao papel dos diferentes órgãos do mexilhão na destoxicação de microcistinas, Vasconcelos *et al.* (2007) demonstram a importância do intestino, do manto e das brânquias. A maioria dos trabalhos foi realizada usando toxinas como as microcistinas (Pflugmacher *et al.*, 1998; Wiegand *et al.*, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2007), mas também outras cianotoxinas como as cilindrospermopsinas podem afectar a actividade do sistema das GSTs (Nogueira *et al.*, 2004a, b).

Os estudos sobre a bioacumulação de microcistinas em bivalves relatam que, durante as experiências de depuração, a quantidade de toxina nos tecidos diminui nos

primeiros dias e então de forma interessante aumenta nos dias seguintes (Vasconcelos, 1995a; Amorim & Vasconcelos, 1999; Saker *et al.*, 2004). Claramente, a toxina não pode derivar do meio, uma vez que os testes demonstram que nenhuma toxina está aí presente. Embora se saiba que a ligação entre as microcistinas e as PP1 e PP2A é muito forte e considerada irreversível (Takai *et al.*, 1995), os mexilhões parecem poder inactivar as PP1 e PP2A durante a depuração e assim libertar microcistinas (Vasconcelos, 1995a; Amorim & Vasconcelos, 1999), podendo então excretar estas toxinas não-ligadas nas fezes ou urina. Tal parece explicar o padrão de flutuação verificado durante as experiências de depuração das microcistinas pelos mexilhões, que também se observou para outros organismos, como certos crustáceos (Thostrup & Christoffersen, 1997; Vasconcelos *et al.*, 2001).

1.5. Objectivo

Este trabalho pretende fornecer um suporte para a teoria de que, nas experiências de depuração de microcistinas por parte dos mexilhões, o aumento no conteúdo de toxina, nos animais, que se verifica após uma rápida diminuição nos primeiros dias de depuração, se deve à quebra das ligações toxina/proteínas fosfatases e conseqüente libertação de toxinas através das enzimas glutathione-S-transferases.

Para tal, mexilhões foram sujeitos a uma experiência de acumulação/depuração de microcistinas. A toxina presente no organismo destes animais, ao longo do período da experiência, foi quantificada, a actividade das glutathione-S-transferases foi analisada; e os resultados obtidos foram tratados estatisticamente de modo a determinar a veracidade da hipótese testada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aclimação dos mexilhões

Mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) sem contacto prévio com cianobactérias tóxicas foram aclimatados às condições de laboratório (T= 16°C, pH= 7,8, salinidade= 33‰ e aeração contínua), em água do mar natural filtrada, durante 1 semana. Durante este período, os mexilhões não foram alimentados e a água foi mudada de dois em dois dias.

2.2. Cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e da alga verde *Ankistrodesmus* sp.

A cianobactéria usada nesta experiência foi uma estirpe tóxica de *Microcystis aeruginosa* – M6 – isolada da Lagoa de Mira (Portugal) (Garcia, 2001). Esta estirpe produz principalmente MC -FR, -LR e -WR. Tal foi confirmado por análise MALDI-TOF- MS seguida de fragmentação por Post-Source-Decay, para verificar a identidade dos péptidos relativos aos maiores sinais de massa (em anexo I estão representados os espectros de massa). Esta análise foi efectuada pelo Dr. Martin Welker (ANAGNOSTEC, Alemanha). Utilizaram-se células liofilizadas da estirpe M6 para obter o espectro de massa com um aparelho Voyager DE-Pro MALDI-TOF MS (Applied Biosystems, Foster City, USA) em modo reflector. O método experimental foi baseado em Spengler (1997) e Welker *et al.* (2006).

A estirpe tóxica de *Microcystis aeruginosa* e a alga verde não tóxica *Ankistrodesmus* sp. foram cultivadas em balões de 6 l usando 4 l de meio Z8 (Kotai, 1972). As condições de cultura foram: temperatura 25°C, aeração contínua, luz fluorescente com fotoperíodo de 14 horas.

2.3. Experiência de acumulação e depuração

Dois tanques de PVC de 60 l contendo 36 l água do mar natural filtrada e esterilizada foram usados para a experiência de acumulação e depuração, que teve a duração total de 18 dias. Em cada aquário foram colocados 140 mexilhões (peso fresco individual $0,506 \pm 0,085$ g).

Experiência de acumulação

O período de acumulação durou 4 dias. Durante este período de tempo, os mexilhões de cada aquário foram alimentados diariamente, duas vezes por dia (manhã e noite), com $5,4 \times 10^9$ células da estirpe tóxica de *M. aeruginosa*, perfazendo uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/ml e a água dos aquários nunca foi mudada. Diariamente, durante os 4 dias da experiência de acumulação foram retirados ao acaso seis animais para análise da toxina presente nos mexilhões e um para a análise da actividade das glutathiona-S-transferases. Os mexilhões retirados para a análise da toxina foram removidos das suas conchas, pesados, congelados com azoto líquido e armazenados a -80°C até uso posterior. Os mexilhões retirados para a análise da actividade das glutathiona-S-transferases foram dissecados em gelo separando brânquias, glândulas digestivas e músculos, sendo as diferentes partes imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C até uso posterior.

Experiência de depuração

No início do dia 5, removeu-se completamente a água de ambos os aquários, que foi substituída por água marinha filtrada e esterilizada, dando-se assim início ao período de depuração, que teve a duração de 14 dias. Durante este período de tempo, a água dos aquários foi mudada diariamente e os mexilhões alimentados de 2 em 2 dias com $3,6 \times 10^8$ células da alga verde não tóxica *Ankistrodesmus sp.*, perfazendo uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/ml. De 2 em 2 dias, foram retirados seis mexilhões para análise da toxina e um para análise da actividade das glutathiona-S-transferases que foram tratados do mesmo modo que o descrito anteriormente.

Durante os 18 dias da experiência de acumulação e depuração, os parâmetros físico-químicos da água dos aquários foram monitorizados de modo a detectar uma possível alteração das condições do meio.

2.4. Análise da toxina presente nos mexilhões

As toxinas presentes na suspensão de cianobactérias e nos mexilhões foram extraídas usando o método descrito por Amorim & Vasconcelos (1999), ligeiramente modificado.

Obtenção dos extractos para ELISA

Os mexilhões e as amostras da suspensão foram liofilizados e triturados num almofariz. A toxina foi extraída durante 24h, a 10°C, usando 5 ml de metanol a 80% /g de mexilhão e 20 ml de metanol a 80% /g de cianobactérias. Após 24h, as amostras foram decantadas, obtendo-se o 1º sobrenadante. As toxinas restantes nas *pellets* foram então extraídas, usando novamente as mesmas proporções de metanol a 80% /g de amostra. Desta vez, as amostras foram sujeitas a ultra-sons (60Hz) durante 2min e depois centrifugadas a 7000g durante 20min, após o que se retirou o 2º sobrenadante, que se combinou com o obtido anteriormente, tendo-se procedido à filtração do sobrenadante total.

As amostras foram depois diluídas 4x e purificadas usando colunas de C-18 activadas com 10 ml de metanol. Após a activação, a coluna a coluna era lavada com 20 ml de água ultra-pura, e depois com 20 ml de metanol a 20%. A fracção tóxica era depois recuperada com 10 ml de metanol. Estas soluções foram completamente evaporadas em banho-maria, a 40°C, e o resíduo ressuspense em água ultra-pura para análise da toxina.

Quantificação da toxina

Para a quantificação da toxina utilizou-se um teste ELISA, tendo-se antes filtrado as amostras por filtros de seringa (0,2 µm), removendo eventuais detritos. O ensaio (EnviroGard® Microcystins Plate Kit) usa anticorpos contra microcistina-LR, a microcistina mais comum. Este método tem uma sensibilidade de 0,1 ng/ml. O procedimento do ensaio foi efectuado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (apresentado em anexo II).

2.5. Análise da actividade das glutathiona-S-transferases

A actividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito por Habig *et al.* (1974) adaptado a microplacas de acordo com o método descrito por Frasco & Guilhermino (2002). Este método baseia-se no princípio de que as enzimas GSTs catalizam a conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH), originando um tioéter ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que pode ser monitorizado fotometricamente a 340 nm.

Preparação das amostras para ensaios enzimáticos em mexilhões

Homogeneizaram-se no *crusher*, em gelo, os tecidos dos mexilhões (brânquias, glândulas digestivas e músculos), usando 1mL de tampão fosfato 100 mM com EDTA 2mM (pH=7,5) (4°C). Centrifugaram-se as amostras a 15000g, durante 15 min, a 4°C e recuperou-se o sobrenadante que foi mantido a 4°C durante a análise enzimática (Lima *et al.*, 2007).

Quantificação da proteína total

Prepararam-se padrões com uma solução de bovino γ -globulin 1 mg/ml e pipetaram-se as amostras para a microplaca. Adicionou-se a solução Bio-Rad (1 Bio-Rad: 4 ddH₂O). Os volumes utilizados foram os assinalados na tabela 3 (4 réplicas por amostra):

Tabela 3 – Volumes utilizados na quantificação da proteína total.

	V padrão (μ l)	V H ₂ O (μ l)	V amostra (μ l)	V Bio-Rad (μ l)
P1	0	0	0	0
P2	0	10	0	250
P3	2	8	0	250
P4	5	5	0	250
P5	10	0	0	250
x	0	0	10	250

Colocou-se a microplaca agitação durante 15 minutos e a absorvância foi lida a 600 nm para quantificar o conteúdo em proteína das amostras e ajustá-lo e a 0,5 mg.mL⁻¹, com uma solução de tampão fosfato 100 mM (pH=6,5). Depois voltou-se a preparar os padrões e a pipetar as amostras de acordo com a tabela 3 para determinar o conteúdo de proteína total nas amostras de concentração ajustada (4 réplicas por amostra).

Determinação da actividade da GST em microplaca

Antes de começar o ensaio, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente (25°C). Preparou-se a solução de reacção com uma solução de tampão fosfato 100 mM (pH=6,5), uma solução de GSH reduzida 10 mM em tampão fosfato e uma solução de CDNB 60 mM em etanol e preparou-se a microplaca de acordo com a tabela 4 (4 réplicas por amostra).

Tabela 4 – Volumes utilizados na determinação da actividade das GSTs.

	Branco	Amostra
Tampão fosfato	100 µl	0 µl
Solução de Reacção	200 µl	200 µl
Amostra	0 µl	100 µl

Leu-se imediatamente a absorvância a 340 nm a cada 20 segundos durante 5 minutos, mantendo a temperatura a 25°C. A actividade da GST é expressa em nmol de substrato hidrolisado por minuto por miligrama de proteína:

$$OD = C \cdot \epsilon \cdot l$$

$$\text{Actividade (nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\Delta \text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \times (1/9,6) \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \times (VT/VA) \times (1/0,9)}{1}$$

$$\text{Actividade (nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína)} = \frac{\text{actividade (nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1})}{\text{concentração de proteína (mg} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

Em que:

OD = declive máximo ($\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1}$)

C = concentração média de proteína na amostra ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

$\epsilon = 9,6$ = coeficiente de extinção molar do tioéter ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

$l = 0,9$ = profundidade do poço atravessada pela luz (cm)

VA = volume da amostra em cada poço (100 µl)

VT = volume total em cada poço (300 µl)

2.6. Análise dos resultados

A análise dos resultados consistiu no tratamento estatístico dos dados obtidos, recorrendo ao Teste *t* de Student, com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para determinar se duas amostras podiam ser provenientes de duas populações subjacentes que possuíssem a mesma média.

Teste t de Student

Temos:
$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{pd} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}, \text{ sendo } s_{pd} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

com $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade

Em que:

t = Teste t de Student

x_1 = amostra controlo

x_2 = amostra que se pretende comparar com a amostra controlo

Spd = desvio-padrão

n = número de elementos da amostra

s^2 = variância da amostra

Variância da amostra

Temos:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Em que:

\bar{x} = média aritmética da amostra

n = número de elementos da amostra

x_i = cada um dos elementos da amostra

$n - 1$ = número de graus de liberdade

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da toxina presente nos mexilhões

Durante o período de experiência os principais parâmetros físico-químicos da água foram bastante estáveis e registou-se uma mortalidade de mexilhão de apenas 5%. Durante toda a experiência, os mexilhões não mostraram qualquer fechamento de válvula, retracção de bisso ou outros sintomas de *stress*. Os animais mostraram a produção de pseudofezes pouco tempo depois de serem alimentados. A quantidade média de microcistinas nas células de *Microcystis* durante a experiência foi de 7,1 µgMC/10⁸ células. O valor total de microcistinas detectadas por ELISA nos mexilhões durante a experiência de acumulação e depuração foi de 7,8 µg. A evolução do conteúdo de toxina nos mexilhões pode ser observada na Figura 1.

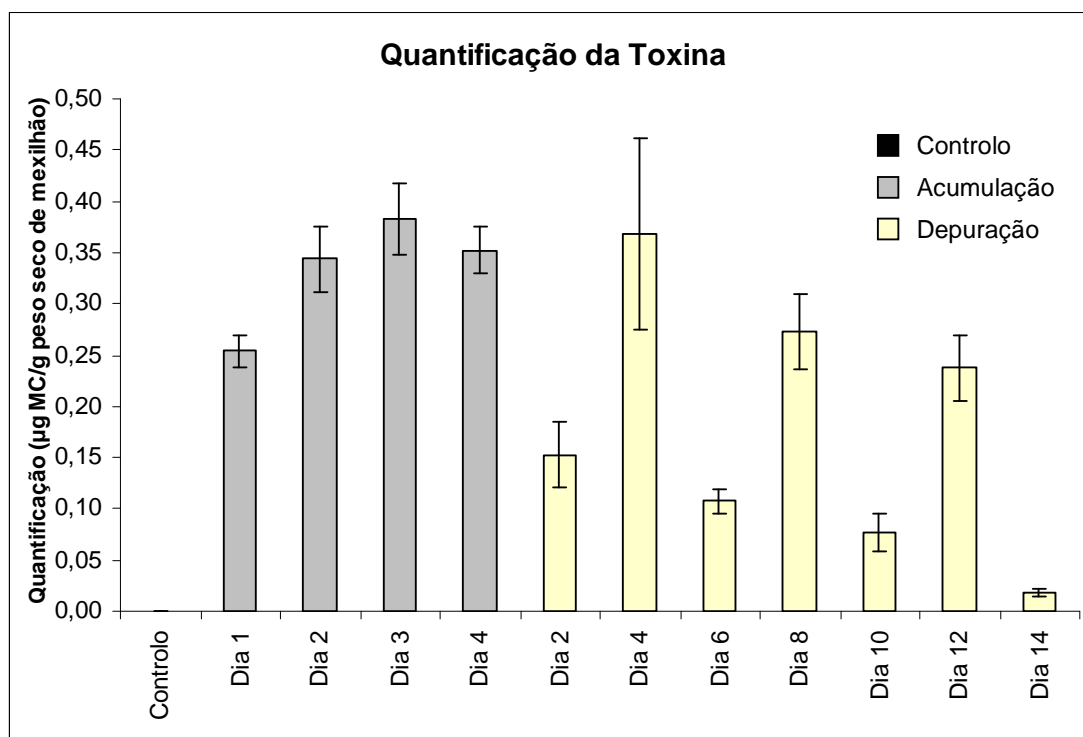


Figura 1 – Concentrações de microcistina nos mexilhões (µg/g), durante os períodos de acumulação e depuração. As colunas representam a média de três réplicas. As barras representam o desvio-padrão.

A toxina foi detectada nos mexilhões no primeiro dia da experiência de acumulação, o que mostra que a acumulação da toxina foi rápida. Em média, o conteúdo de toxina aumentou até ao 3º dia do período de acumulação, diminuiu durante os primeiros 3 dias do

período de depuração, aumentando de forma significativa no dia 4. Seguiu-se um novo decréscimo até ao dia 6, altura em que o conteúdo de toxina nos mexilhões volta a aumentar, atingindo um pico no dia 8. Depois, a tendência foi novamente de diminuição até ao dia 12, altura em que o conteúdo de toxina nos mexilhões atinge um novo pico.

Em cada dia da experiência de acumulação, foi fornecida a quantidade de 767 µg de MC em cada um dos dois aquários. No entanto, visto que a quantidade de toxina fornecida diariamente não foi totalmente acumulada por parte dos mexilhões e que foram diariamente retirados 21 animais, a quantidade teórica de microcistina disponível por g de mexilhão não foi a mesma ao longo da experiência. O nível de acumulação máxima detectável durante a fase de acumulação foi 0,38 µg/g peso seco de mexilhão, tendo ocorrido no dia 3 desse período. Assim a saturação parece depender não da quantidade de toxina disponível mas do conteúdo em toxina que as células de cianobactérias apresentam. Estirpes muito tóxicas poderão gerar conteúdos em toxinas nos mexilhões bem mais elevados.

Durante o período de depuração, os mexilhões mostraram um nível máximo detectável de 0,37 µgMC/g de peso seco de mexilhão no dia 4. A quantidade de microcistina medida é a parte que não está firmemente ligada às proteínas fosfatases ou a quantidade que está presente no tracto digestivo dos mexilhões.

Nesta experiência, o objectivo era o de simular a situação que acontece em estuários sujeitos a marés. Neste caso, os mexilhões podem ser expostos a densidades elevadas de cianobactérias durante curtos períodos de tempo cada dia, quando a maré-alta alcança os bancos de mexilhões.

Durante o período de depuração é interessante notar a flutuação do conteúdo de toxina nos mexilhões com o tempo. A diminuição de 50% no conteúdo de toxina no segundo dia depois de os alimentar com uma alga verde não tóxica parece estar relacionada com o facto dos mexilhões poderem ter esvaziado as suas áreas digestivas do seu conteúdo em *Microcystis*. Neste caso, a toxina estava presente nos tecidos de mexilhão não ligada a proteínas fosfatases, e então facilmente extraível. Durante os dias seguintes verificou-se um aumento no conteúdo de toxina dos mexilhões. Este facto já tinha sido descrito em outros trabalhos (Vasconcelos, 1995; Amorim & Vasconcelos, 1999). A flutuação das toxinas detectáveis pode estar relacionada com o mecanismo de acção das microcistinas. Estando ligadas covalentemente às proteínas fosfatases 1 e 2A (MacKintosh *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Dawson, 1998), uma parte significativa da toxina pode tornar-se não-detectável usando métodos comuns tal como HPLC e ELISA. Como não existiam microcistinas na água, uma vez que esta foi mudada diariamente, uma possível explicação para flutuação das toxinas detectáveis é que durante este período de depuração alguma da microcistina que estava ligada a proteínas fosfatases foi desligada e libertada pelos mexilhões.

3.2. Análise da actividade das glutathione-S-transferases

Os sistemas enzimáticos de detoxificação como as GSTs são úteis na avaliação da resposta animal a toxinas e xenobióticos porque normalmente são induzidos pela presença destes tóxicos no ambiente (Vasconcelos, 2007), uma vez que estas enzimas catalizam a conjugação das toxinas e dos xenobióticos com a glutathione. Este processo é muito importante uma vez que a remoção de electrófilos reactivos permite a protecção de grupos nucleofílicos vitais em macromoléculas como as proteínas e os ácidos nucleicos.

Quando os mexilhões foram expostos às células tóxicas de *Microcystis aeruginosa*, a reacção apresentada pelos seus diversos órgãos foi muito diferente (figura 2).

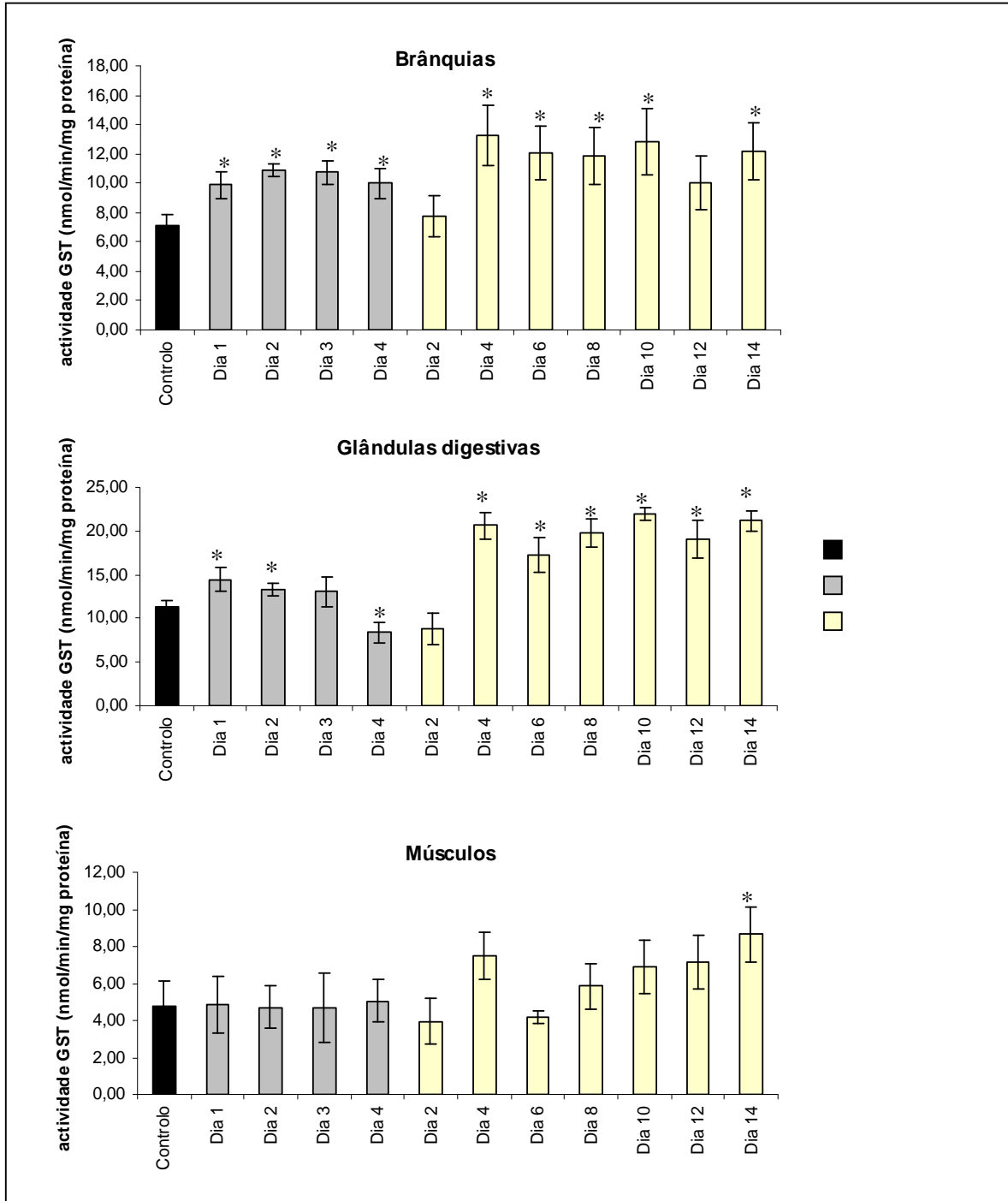


Figura 2 – Actividade das GSTs (nmol/min/mg de proteína) nos órgãos de mexilhão expostos a células tóxicas de *M. aeruginosa*, comparada com a dos órgãos dos animais controlo. As colunas representam a média de três réplicas. As barras representam o desvio-padrão. As diferenças significativas relativamente ao grupo de controlo estão assinaladas (*).

Durante a acumulação da toxina ocorreu um aumento da actividade das GSTs nas brânquias mostrando uma resposta para esta via de destoxicação. As glândulas digestivas e os músculos dos mexilhões expostos parecem ser menos afectados, não tendo apresentado alterações significativas na actividade das GSTs durante esse período. A actividade das GSTs nas glândulas digestivas chega mesmo a apresentar valores inferiores aos registados nos mexilhões de controlo. Este resultado pode dever-se ao facto dos tóxicos intermediários produzidos nas glândulas digestivas durante o metabolismo poderem inactivar as enzimas, resultando na redução dos níveis de actividade das GSTs neste órgão, como apontaram Cheung *et al.* (2001) em estudos realizados com *Perna viridis*. O facto das brânquias estarem mais expostas à toxina do que as glândulas digestivas pode fazer com que apresentem maiores taxas de destoxicação e, conseqüentemente, maiores actividades de GSTs.

Nesta experiência, a actividade da GSTs nos mexilhões *M. galloprovincialis* expostos às células tóxicas variou de 2,60 a 22,02 nmol/min/mg de proteína. É muito difícil comparar a actividade destas enzimas usando diferentes fontes de dados devido a métodos experimentais e condições de exposição diferentes. No entanto, de acordo com Vasconcelos *et al.* (2007) é possível assumir que a actividade da GST do mexilhão é comparável à de outros organismos como *Dreissena polymorpha*, *Danio rerio*, *Scenedesmus armatus*, mas é mais baixa que *Ceratophyllum demersum* ou *Chaoborus crystalinus*. Isto pode mostrar que o sucesso de *M. galloprovincialis* em resistir a conteúdos elevados de microcistinas na água durante longos períodos de tempo (Vasconcelos, 1995; Amorim & Vasconcelos, 1999) também pode ser devido a uma baixa captação da toxina nos tecidos do mexilhão ou até mesmo a uma diminuição na filtração de células de *Microcystis* e das suas toxinas durante as florescências (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Durante o período de depuração, a actividade das GSTs aumentou nas brânquias, nas glândulas digestivas e nos músculos, sofrendo flutuações, e chegando a atingir valores muito superiores àqueles registados durante o período de acumulação. Este resultado pode dever-se ao facto de deixar de existir inibição enzimática por parte do agressor, uma vez que este deixou de existir no meio, resultando no aumento dos níveis de actividade das GSTs. Tal também foi registado por Vasconcelos *et al.* (2007) que observaram que mexilhões expostos a toxinas puras tinham actividades das GSTs superiores aos expostos a extractos brutos de cianobactérias. Os dias em que se registaram os picos de actividade enzimática das GSTs coincidiram na sua maioria com os que se verificaram na análise do conteúdo de toxina nos mexilhões.

Ao analisar a importância de cada órgão na destoxicação de microcistinas através da via da actividade das GSTs, observa-se claramente que a actividade aumentada foi

encontrada nas glândulas digestivas e nas brânquias. No entanto, os músculos também podem ter um papel na destoxicação destas toxinas, mostrando que em organismos como os mexilhões, altamente expostos ao seu ambiente circundante, todas as partes de corpo podem ter um papel nos mecanismos de destoxicação. O maior aumento da actividade das GSTs verificou-se nas glândulas digestivas. Tal pode ser explicado pelo facto das microcistinas actuarem a nível hepático.

Vários autores mostraram que a actividade da GST poderia ser usada como um potencial biomarcador orgânico em mexilhões como *M. Galloprovincialis* (Fitzpatrick *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2007). No que diz respeito ao papel dos diferentes órgãos do mexilhão na destoxicação de microcistinas, os resultados deste trabalho mostram a importância das glândulas digestivas e das brânquias.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que existe uma possibilidade de acumulação de microcistinas por mexilhões que vivem em estuários onde ocorrem florescências de cianobactérias produtoras desta toxina. Pensa-se que os resultados apresentados representam uma situação natural que aconteceria nos nossos estuários contaminados com florescências de cianobactérias tóxicas.

A teoria de que, durante a destoxicação das microcistinas os mexilhões parecem poder inactivar as PP1 e PP2A e assim libertar microcistinas, é sustentada pelos resultados deste trabalho, uma vez que os dias em que se registaram os picos de actividade enzimática das GSTs durante o período de depuração coincidiram com os que se verificaram na análise do conteúdo de toxina nos mexilhões. No entanto, é necessário analisar a actividade destas proteínas experiências de acumulação e depuração, com padrões de flutuação semelhantes aos aqui verificados, para concluir acerca desta teoria.

Os resultados demonstram ainda que metabolitos existentes nas células de cianobactérias produtoras de microcistinas podem diminuir a actividade das GSTs nos mexilhões; quando o contacto com as cianobactérias é suprimido, as GSTs aumentam a sua actividade, aumentando assim o processo de biotransformação.

Embora não exista nenhum valor guia para a quantidade de MC em animais que pode ser ingerida sem produzir efeitos prejudiciais, de acordo com o padrão de flutuação da quantidade de toxina nos mexilhões detectado nesta experiência, é perigoso consumir moluscos que tenham sido expostos a cianobactérias tóxicas, uma vez que as toxinas permanecem nos mexilhões vários dias após ter desaparecido a florescência, não sendo detectáveis pelos métodos mais comuns.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para confirmar a teoria de que os mexilhões podem inactivar as PP1 e PP2A, durante a destoxicação e assim libertar microcistinas, é necessário, para além do trabalho aqui apresentado, a realização de ensaios que visem analisar a actividade destas proteínas durante experiências de acumulação e depuração com padrões de flutuação semelhantes aos aqui verificados.

Para além deste trabalho futuro e tendo em conta os resultados do presente, recomenda-se que os programas de monitorização de florescências de algas prejudiciais que incluem as cianobactérias e as suas hepatotoxinas, nomeadamente em águas salobras como estuários de rios eutróficos, estabeleçam períodos em que a colheita e o consumo de mexilhões contaminados sejam proibidos, para evitar perigos para a saúde humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. G., 2000. Symbiotic interactions. In Whitton, B. A. & Potts, M. (Eds). *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 523-561.
- Alouf, J. E., 2000. Bacterial protein toxins. An overview. In Holst, O. (Ed). *Bacterial toxins - Methods and protocols. Methods in molecular biology* 145. Humana Press. Totwa. New Jersey. pp. 1-26.
- Amorim, A. & Vasconcelos, V.M., 1999. Dinamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 37: 1041-1052.
- An, J. & Carmichael, W. W., 1994. Use of a colorimetric protein phosphatases inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32: 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.
- Bothe, H., 1982. Nitrogen fixation. In Carr, N. G. & Whitton, B. A. (Eds). *The biology of cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 87-104.
- 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., Andersen, 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. *Journal of Fish Diseases* 20: 81-91.
- Carmichael, W. W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, January: 64-72.
- Carmichael, W. W., 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHabs". *Human and Ecological Risk Assessment* 7: 1393-1407.
- Carmichael W. W., Beasley V. R., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K., Krishnamurthy, T., Yu, M. ,J., Moore, R. E., Rinehart, K., Runneger, M., Sulberg, O. M., & Watanabe, M., 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26: 971-973.
- Castro, A. T. P., 1997. Aspectos da resposta imunológica específica e inespecífica à infecção. *Sociedade Portuguesa de Imunologia* 3: 11-35.
- Cheung, C. C. C., Zheng, G. J., Li, A. M. Y., Richardson, B. J. & Lam, P. K. S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* 52: 189-203.
- Chorus, I. & Bartram, J. (Eds), 1999. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. London. New York. 416 pp.
- Chorus, I. (Ed), 2001. *Cyanotoxins: occurrence, 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 microcystins. *Applied Environmental Microbiology* 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: 78-100.
- Cohen, P., Holmes, C. F. B. & Tsukitani, Y., 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 15: 98-102.
- Craig, M., Luu, H. A., McCreedy, T. L., Williams, D., Andersen, R. J., Holmes, C. F. B., 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochemistry and Cell Biology* 74: 569-578.
- Dahlmann, J., Rühl, A., Hummert, C., Liebezeit, G., Carlsson, P. & Graneli, E., 2001. Different methods for toxin analysis in the cyanobacterium *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae). *Toxicon* 39: 1183-1190.
- Dawson, R. M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36: 953-962.
- Dral, A. D. G., 1967. The movement of the latero-frontal cilia and the mechanism of particle retention in the mussel *Mytilus edulis* L. *Netherlands Journal of Sea Research* 3: 391-422.
- Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. & Connell, D. W., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (bluegreen algal) toxins in water. In Apeldoorn, M. E., Egmond, H. P., Speijers, G. J. A. & Bakker, G. J. I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 7-60.
- Erhard, M., Döhren, H. & Jungblut, P., 2001. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. In Chorus, I. (Ed), 2001. *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pp. 344-353.
- Eriksson J. E., Meriluoto, J. A. O. & Lindholm, T. 1989 Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. *Hydrobiologia* 183: 211-216.
- Falconer, I. R., 2001. Toxic cyanobacterial blooms problems in Australian waters: risks and impacts on human health. *Phycologia* 40: 228-233.
- Falconer, I. R. & Humpage, A. R., 2001. Preliminary evidence for *in vivo* tumour initiation by oral administration of extracts of the blue green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 16: 192-195.
- Fitzpatrick, P. J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A. R., 1997. Assessment of a glutathione-S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers* 2: 51-56.
- Francis, G., 1878. Poisonous australian lakes. *Nature* 18: 11-12.
- Frasco, M. F. & Guilhermino, L. (2002). Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 149-156.

- Garcia, C., 2001. *Isolamento e toxicologia de estirpes de Microcystis aeruginosa da Lagoa de Mira*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- 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 Organization. Geneva. pp. 95-107.
- Habig, W., Pabst, M. J. & Jacoby, W. B., 1974. Glutathione-S-transferase: the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 1730-1739.
- Harada K. -I., Suzuki, M., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., Carmichael, W. W., Rinehart, K. L. Jr., 1988. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon* 26: 433-439.
- 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.
- Ito, E., Kondo, F. & Harada, K. -I., 1997. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35: 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* 798: 147-157.
- Jørgensen, C. B., 1981. Feeding and cleaning mechanisms in the suspension feeding bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 65: 159-163.
- Kaebernick, M. & Neilan, B. A., 2001. Ecological and molecular investigations on cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1-9.
- Keevil, C. W., 1991. Toxicology and detection of cyanobacterial (blue-green algae) toxins. *In* Codd, G.A. & Roberts, C. (Eds.). Public health aspects of cyanobacteria (blue-green algae). *PHLS Microbiology Digest* 8: 91-95.
- Kotai, J., 1972. *Instruction for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae*. Norwegian Institute for Water Research. Oslo., 11/69. 5 pp.
- Kuiper-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*. E & FN Spon. London. New York. pp. 134-178.
- Lima, I., Moreira, S. M., Osten, J. R. V., Soares, A. M. V. M. & Guilhermino, L., 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* 66: 1230-1242.
- 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.
- 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: 187-192.

- Mackintosh, C. & MacKintosh, R. W., 1994. The inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and an extremely sensitive and rapid bioassay for toxin detection. *In* Codd, G. A., Jefferies, T. M., Keevil, C. W., Potter, E. (Eds.), *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 90-99.
- Mackintosh, R. W., Dalby, K. N., Campbell, D. G., Cohen, P. T. W., Cohen, P. & MacKintosh, C., 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Letters* 371: 236-240.
- Meriluoto, J., Lawton, L. & Harada K. -I., 2000. Isolation and detection of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. *Methods in Molecular Biology* 145: 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*. E & FN Spon. London. New York. pp. 15-40.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, Carmichael, W. W. & Fujiki, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118: 420-424.
- Nogueira, I., Saker, M., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Vasconcelos, V., 2004a. Toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 19: 453-459.
- Nogueira, I., Pereira, P., Dias, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Franca, S., Vasconcelos, V., 2004b. Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. *Toxicon* 44: 773-780.
- Oberemm, A., 2001. Effects of cyanotoxins on early life stages of fish and amphibians. *In* Chorus, I. (Ed), 2001. *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pp. 241-248.
- Oliver, R. L. & Ganf, G. G., 2000. Freshwater blooms. *In* Whitton, B. A. & Potts, M. (Eds). *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 149-194.
- Pereira, P., Dias, E., Franca, S., Pereira, E., Carolino, M., Vasconcelos, V., 2004. Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel, *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology* 68: 339-350.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K. A., Krause, E., Codd, G. A. & Steinberg, C. E. W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1425: 527-533.
- Prepas, E. E., Kotak, B. B., Campbell, L. M., Evans, J. C., Hrudey, S. E. & Holmes, C.F.B., 1997. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquat Sciences* 54: 41-46.
- 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.). *Aquatic Toxicology* 20: 131-146.

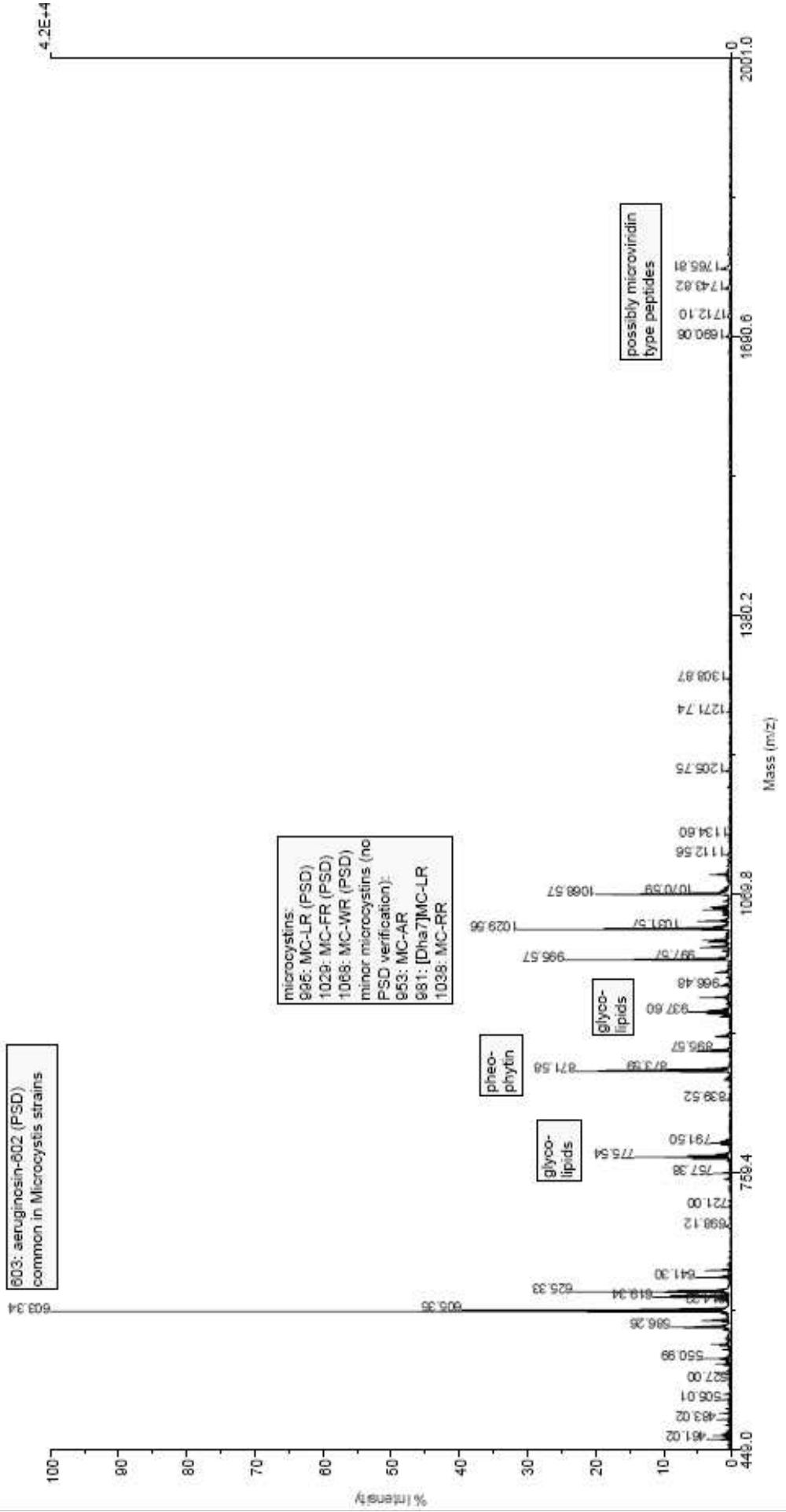
- Rivasseau, C., Racaud, P., Deguin, A. & Henion, M. C., 1999. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 394: 243-257.
- Runnegar M. T. C., Gerdes, R. G. & Falconer, I. R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 29: 43-51.
- Runnegar M. T. C., Kong, S. M., Zhong, Y. Z. & Lu, S. C., 1995a. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 49: 219-225.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S.-M., Lee, E.Y.C. & Zhang, L., 1995b. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 162-169.
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A. & Vasconcelos, V.M., 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon* 43: 185-194.
- Shopf, J. W., 1993. Microfossils of the Early Archean Apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640-646.
- Sipiä, V. O., Kankaanpää, H. T., Lahti, K., Carmichael, W. W. & Meriluoto, J. A. O., 2001. Detection of nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea. *Environmental Toxicology* 16: 121-126.
- 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*. E & FN Spon. London. New York. pp. 41-111.
- Sommer, U., 1985. Comparison between steady state and non steady state competition: experiments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 30: 335-346.
- Spengler, B., 1997. Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *Journal of Mass Spectrometry* 32:1019-1036.
- Takai, A., Sasaki, K., Nagai, H., Mieskes, G., Isobe, M., Isono, K. & Yasumoto, T., 1995. Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatases 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: method of analysis of interaction of tight-binding ligands with target proteins. *Biochemical Journal* 306: 657-682.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R. & Schlatter, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 30: 215-224.
- Thostrup, L. & Christoffersen, K., 1997. Accumulation of microcystin-LR in *Daphnia magna*. *Abstracts of the VIII International Conference on Harmful Algae*. Vigo, Spain. pp. 199.
- Vanderploeg, H. A., Liebig, J. R., Carmichael, W. W., Agy, M. A., Johengen, T. H., Fahnenstiel, G. L. & Nalepa, T. F., 2001. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 58: 1208-1221.

- Vasconcelos, 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in portuguese freshwaters. In Codd, G. A., Jefferies, T. M., Keevil, C. W. & Potter, E. (Eds.). *Detection methods for cyanobacterial toxins*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. pp. 133-135.
- Vasconcelos, V. M., 1995a. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology* 32: 227-237.
- Vasconcelos, V. M., 1995b. *Toxicologia de cianobactérias*. Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Vasconcelos, V. M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 249-254.
- Vasconcelos, V. M., Oliveira, S. & Teles, F. O., 2001. Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon* 39: 1461-70.
- Vasconcelos, V.M., Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2007. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon* 50: 740-745.
- Watanabe, M. F., Park, H. D., Kondo, F., Harada, K., Hayashi, H. & Okino, T., 1997. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Natural Toxins* 5: 31-35.
- Welker, M., Marsalek, B., Sejnohova, L., von Döhren H., 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides* 27: 2090-2103.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K. A., Steinberg, C. E. W., Codd, G. A., 1999. Uptake and effects of microcystins-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 14: 89-95.
- Williams, D. E., Dawe, S. C., Kent, M. L., Andersen, R. J., Craig, M. & Holmes, C. F. B., 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* 35: 1617-1625.
- Whitton, B. A. & Potts, M. (Eds), 2000. *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 1-11.
- Yokoyama, A. & Park H. D., 2003. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environmental Toxicology* 18: 61-67.
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M. F., Harada, K., Ichihara, A., Carmichael, W. W., Fujiki, H., 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116: 609-614.
- Yu, S. -Z., 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 10: 674-682.

ANEXO I

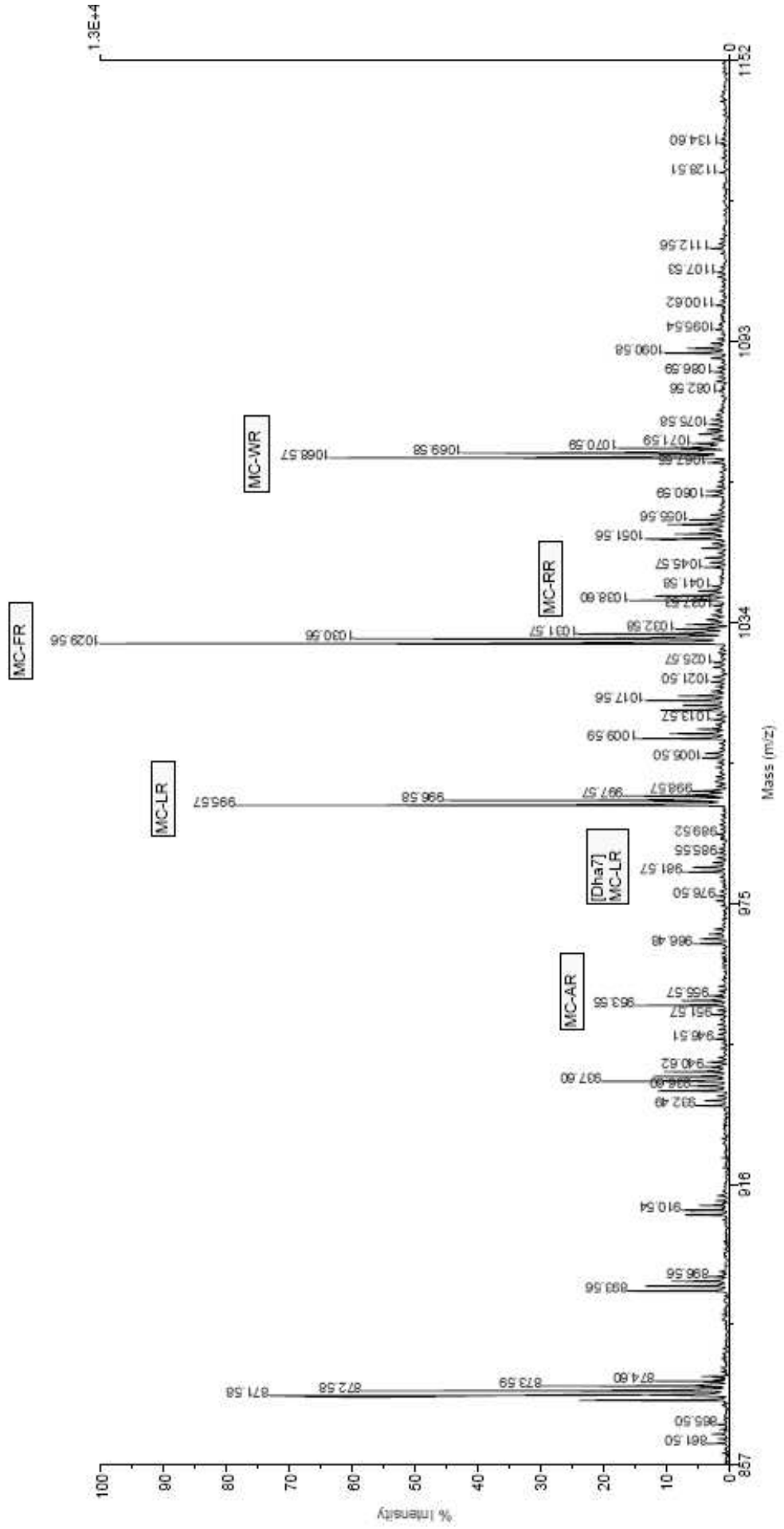
ESPECTRO DE MASSA MOLECULAR OBTIDO POR
MALDI TOF – MS DA ESTIRPE M6

Voyager Spec #1->BC=>NF0.7[BP = 803.3, 42356]



84#G=Microcystis#SP=#TYP=#ST=LEAN SF M6#GT=#TEM=#A=#I=#C=U Porto; Fernandes, Sandra#Matrix=DHB#Cos=#Sample=#PSD=#
D:\...LANAG_012_4893_0005.dat
Acquired: 13:28:00, November 27, 2007

Voyager Spec # 1=>EO=>NF0.7[BP = 603.3, 42356]



64#G-Microcystis#SP=#TYP=#ST=#LEAN SF M#eGT=#TEM=#A=#M=#C=U Porto; Fernandes, Sandra#Matrix=DHB#Cos=#Sample=#PSD=#
D:_VANAG_012_4583_0005.dat
Acquired: 13:28:00, November 27, 2007

ANEXO II

PROTOCOLO PARA O PROCEDIMENTO DE ANÁLISE
ELISA, FORNECIDO CONJUNTAMENTE COM O KIT
ENVIROGARD® MICROCYSTINS PLATE KIT



Strategic Diagnostics Inc.



EnviroGard[®] Microcystins Plate Kit

Part Number 7540000

Intended Use

The EnviroGard Microcystins Plate Kit is a quantitative laboratory test for the detection of microcystins residues in water.

Test Principles

The EnviroGard Microcystins Plate Kit is calibrated with a non-toxic microcystins-LR surrogate at levels equivalent to 0.1, 0.4, and 1.6 parts per billion (ppb) microcystins-LR. The kit uses polyclonal antibodies that bind either microcystins or a microcystins-enzyme conjugate. These antibodies are immobilized to the walls of the test wells. Microcystins in the sample compete with the microcystins-enzyme conjugate for a limited number of antibody binding sites.

Because the same number of antibody binding sites are available on every test well, and each test well receives the same number of microcystins-enzyme conjugate molecules, a sample which contains a low concentration of microcystins allows the antibody to bind many microcystins-enzyme conjugate molecules. The result is a dark blue solution. Conversely, a high concentration of microcystins allows fewer microcystins-enzyme conjugate molecules to be bound by the antibodies, resulting in a lighter blue solution.

NOTE: Color is inversely proportional to Microcystins concentration.

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

Performance Characteristics

The EnviroGard[®] Microcystins Plate Kit does not differentiate between microcystins-LR and other microcystins variants but detects their presence to differing degrees. The following table shows the concentration at 50% inhibition (50% B₀) for these compounds. Concentration is in ppb.

VARIANTS	50% B/B ₀
microcystins-LR	0.31
microcystins-RR	0.32
microcystins-YR	0.38
NODLN	0.47

Precautions

- Microcystins in environmental samples may be toxic. Use adequate precautions when handling these samples.
- Store all plate kit components at 4°C to 8°C (39°F to 46°F) when not in use.
- Do not store test kit components for more than 8 hours at ambient temperatures (20°C to 37°C or 68°F to 99°F). **Do not expose substrate to direct sunlight.**
- Do not freeze plate kit components or expose them to temperatures greater than 37°C (99°F).

- Allow all reagents to reach ambient temperature (18°-27°C or 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 particulate found in untreated ground or surface waters may affect the sensitivity level of this plate kit.

Contents of the Kit

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

Materials Needed but not Supplied

- 10 cc syringes
- 0.45 micron, non-sterile filter units
- Disposable-tip pipette and disposable tips that will measure 100 microliters (µL)
- Marking pen (indelible)
- Tape or Parafilm®
- Timer (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 particulate. A syringe-operated Millex-HV₁₃ (or comparable) filter is suitable for this purpose.
- If a lower sensitivity for microcystins is required (<0.1 ppb), a solid-phase extraction device such as a C₁₈ reverse phase Sep-Pak is necessary to concentrate the sample.

Assay Procedure

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

1. Three strips may be used to run the Negative Control, three Calibrators and fourteen 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	S9	S9	S10	S10	S11	S11	S12	S12	S13	S13	S14	S14
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 S14) 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 Microcystins-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, invert the strip holder, and discard the contents of the wells into a sink. Vigorously flood the wells to overflowing with tap or distilled water, and discard contents into a sink. Repeat this wash step four times. Invert the plate and tap out as much water as possible on a stack of paper towels. Alternatively, use a 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 S14).
 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
 10. Add 100 µL of Stop Solution to each well and mix thoroughly. This will turn the solution yellow. **WARNING: Stop solution is 1.0 N HCL.**
 11. Read the plate within 30 minutes of adding the Stop Solution.

Interpreting Results

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.

Calculating Results

1. After you read all of the wells, average the OD of each set of calibrators and samples, and calculate the %B₀ as follows:

$$\%B_0 = \frac{\text{average OD of calibrator or sample}}{\text{average OD of negative control}} \times 100$$

The %B₀ 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 %B₀ 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 %B₀ of each Calibrator against its microcystins concentration on a semi-log scale
3. Determine the microcystins concentration of each sample by finding its %B₀ value and the corresponding concentration level on the graph.
4. Interpolation of sample concentration is only valid if the %B₀ of the sample falls within the range of the %B₀'s set by the calibrators. If the %B₀ of a sample is lower than that of the highest calibrator, dilute that sample so it falls on the standard curve when you run the assay again, then multiply by the dilution factor.

Ordering Information

Description	Catalog Number
Microcystins EnviroGard Plate Kit	7540000

Technical Assistance

To Place an Order or Receive Technical Assistance, please call, fax, or email Strategic Diagnostics Inc. at:

Call toll-free **800-544-8881**

Or **302-456-6789 Phone**
302-456-6782 FAX
techservice@sdx.com

Warranties and Liabilities

Strategic Diagnostics Inc. ("SDI") warrants the Products manufactured by it will be free of defects in materials and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period equal to the shorter of one year from date of shipment of the Product(s) or the expiration date marked on the Product packaging. Application protocols published by SDI are intended to be only guidelines for the Buyers of the Products. Each Buyer is expected to validate the applicability of each application protocol to in their individual applications. **SDI MAKES NO OTHER WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED. THERE IS NO WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE.**

SDI's sole obligation with respect to the foregoing warranties shall be, at its option, to either replace or to refund the purchase price of the Product(s) or part thereof that proves defective in materials or workmanship within the warranty period, provided the customer notifies SDI promptly of any such defect. **SDI SHALL NOT BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES RESULTING FROM ECONOMIC LOSS OR PROPERTY DAMAGES SUSTAINED BY BUYER OR ANY CUSTOMER FROM THE USE OF THE PRODUCT(S).**

Copyright© 2004, Strategic Diagnostics Inc., EnviroGard is a trademark of Strategic Diagnostics Inc.

Parafilm is a trademark of the American Can Corporation.

