

engenharia

ISSN 1413-4152
ISSN 1809-4457 online

sanitária

e ambiental

Órgão Oficial de Informação Técnica da ABES - Rio de Janeiro
Vol. 12 - Nº 1 - Jan / Mar 2007

ARTIGOS TÉCNICOS

Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II a - não inertes e classe II b - inertes

Acute toxicity tests by bioassays applied to the solubilized extracts of solid wastes class II a - non inert and class II b - inert
Néborá Liz Vendramin Brasil Rodrigues, Urivaldo Paulowsky

Monitoramento da atividade bacteriana de um sistema de lodos ativados bardenpho por meio da respirometria

Control of reaction sludge's system bacterian activity - bardenpho through respirometry
Adriana Guimarães Costa, Andréa Fagundes Ferreira, adrianus van Haandel

Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos

Acute toxicity evaluation for a *Microcystis* spp. strain by bioassay with male swiss albino mice
Emília Kiyomi Kuroda, Alessandro Minillo, Odete Rocha, Edson Rodrigues Filho, Luiz Di Bernardo

Aplicação de modelo de simulação-otimização na gestão de perda de água em sistemas de abastecimento
Leakage management with computational model in water supply system

Carlos César Gumier, Edemar Luvizotto Junior

Os microrganismos nas atividades de disposição de esgotos no solo - estudo de caso

The microorganisms in the sewage disposal in soil - a case study
Adriana de Souza Cavinatto, Wanderley da Silva Paganini

Desempenho operacional e ambiental de unidades de reciclagem e disposição final de resíduos sólidos domésticos financiadas pelo ICMS Ecológico de Minas Gerais

Operational and environmental performance of sanitary landfills and recycling facilities supported by the Ecological ICMS in Minas Gerais State, Brazil

José Francisco do Prado Filho, Frederico Garcia Sobreira

Avaliação da eficácia dos critérios de recebimento de efluentes não domésticos em sistemas de coleta e transporte de esgotos sanitários em São Paulo

Effectiveness of acceptance standards of non-household effluents to São Paulo state publicly owned treatment works
Irineu Delatorre Junior, Dione Mari Morita

Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos

Feasibility of application of Bartha's respirometric method to determine biodegradation of pollutants or wastes in latossols
Gabriela Sá Leitão de Mello, Dione Mari Morita, Sidneide Manfredini, Irma Nelly Gutierrez Rivera

Proposta de calibração de modelos hidrodinâmicos aplicados a unidades de contato utilizando uma função de distribuição de tempos de residência

A proposal of calibration of hydrodynamic models of contact units using a residence time distribution function
Edmilson Costa Teixeira, Julio Tomás Aquije Chacaltana, Renato do Nascimento Siqueira, Camila Gomes Pacheco

Integrando oferta e demanda de serviços de saneamento: análise hierárquica do panorama urbano brasileiro no ano 2000

Integrating supply and demand of water and sanitation services: hierarchical analysis of the urban brazil in 2000
Sonaly Rezende, Simone Wajnman, José Alberto Magno de Carvalho, Léo Heller

TRABALHO PREMIADO / 23º CONGRESSO

Impacto dos mediadores redox na remoção de cor de corantes azo e antraquinônico por lodo granular anaeróbio sob condições mesofílicas e termofílicas

Impact of redox mediators on colour removal of azo and anthraquinone dyes by anaerobic granular sludge under mesophilic and thermophilic conditions
André Bezerra dos Santos, Francisco Javier Cervantes, Jules Bernardus van Lier



ABES ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE
ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
Capítulo Nacional da AIDIS



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE UMA CEPA DE *MICROCYSTIS* SPP. POR MEIO DE TESTES COM CAMUNDONGOS

ACUTE TOXICITY EVALUATION FOR A *MICROCYSTIS* SPP. STRAIN BY BIOASSAY WITH MALE SWISS ALBINO MICE

EMÍLIA KIYOMI KURODA

Engenheira civil, mestre em Hidráulica e Saneamento e estudante de pós-graduação de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo

ALESSANDRO MINILLO

Oceanógrafo e Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental no Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo

ODETE ROCHA

Professora Titular do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos

EDSON RODRIGUES FILHO

Professor Adjunto do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos

LUIZ DI BERNARDO

Professor Titular do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo

Recebido: 25/11/05 Aceito: 24/11/06

SYSNO 1613568
PROD -001180
ACERVO EESC

RESUMO

Este estudo teve como objetivo complementar a caracterização da toxicidade de uma cepa de *Microcystis* spp., por meio de testes de toxicidade aguda com camundongos, após caracterização química preliminar de microcistinas - MCs realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodo HPLC-PDA e espectrometria de massas com ionização por electrospray MS-ESI. Os testes de toxicidade aguda com camundongos demonstraram, segundo classificação proposta por Lawton et al (1994b), que a cepa tóxica testada enquadra-se no grau de elevada toxicidade com valor de DL50_{24h} de extrato seco menor que 100 mg/kg p.c. (peso corpóreo) (13,7 mg/kg p.c.), de DL50_{24h} de microcistinas totais estimada de 24,2 µg/kg p.c. e concentração de MCs no material seco maior que 1,0 µg/mg p.s. (entre 1,64 e 1,86 µg/mg p.s.).

PALAVRAS-CHAVE: Análise de água, microcistinas, bioensaio, camundongos, DL50, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, cianobactéria, toxicidade, PROSAB.

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the toxicity of a strain of Microcystis spp. using acute toxicity bioassays with swiss albino mice and to characterize chemically the microcistins using high efficiency liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-PDA) and mass spectrometry with electrospray ionization (MS-ESI). The acute toxicity tests with mice showed that according to the classification proposed by Lawton et al (1994b), the toxic strain here tested corresponds to the degree of high toxicity with DL50_{24h} values for the dry extract lower than 100 mg/kg corporal weight (13,7 mg/kg corporal weight), while DL50_{24h} for total microcystin - MCs concentration around 24,2 µg/kg corporal weight. and concentration of MCs in the dry material higher than 1,0 µg/mg dry weight (between 1.64 and 1.86 µg/mg d.w.).

KEYWORDS: Water analysis, microcystins, bioassay, mice DL50, high efficiency liquid chromatography, mass spectrometry, cyanobacteria, toxicity, PROSAB.

INTRODUÇÃO

A presença de florações de algas e cianobactérias e seus subprodutos em rios, lagos e reservatórios destinados ao abastecimento, interfere diretamente na qualidade da água, podendo introduzir efeitos negativos tanto de ordens estético

ca e organoléptica pela produção de cor, odor e sabor, como de saúde pública devido à produção de compostos potencialmente tóxicos e carcinogênicos (Di Bernardo, 1995).

Baseado em bioensaios e em análises por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC, pelo menos

50 a 75% das amostras tem-se mostrado tóxicas (Cood, 2000). As toxinas de cianobactérias ou cianotoxinas apresentam mecanismos tóxicos específicos em vertebrados e podem ser classificadas de acordo com o modo de ação em neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas, BMMA

(beta-n methylamino-L-alanina), hepatotoxinas (microcistina, nodularina e cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lipopolissacarídeos, lingbiatoxinas e aplisiatoxinas).

As espécies já identificadas como produtoras de hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (Carmichael, 1994). Para Sant'Anna & Azevedo (2000), a espécie *Microcystis aeruginosa* é considerada a de distribuição mais ampla no território nacional, e a *Anabaena*, o gênero com maior número de espécies potencialmente tóxicas (*A. circinalis*, *A. flos-aquae*, *A. planctonica*, *A. solitaria* e *A. spiroides*).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, destacando-se as microcistinas (heptapeptídeo). Variações estruturais nos aminoácidos, grau de metilação e isomeria são usados para designar as diferentes MCs, tendo-se conhecimento da existência de mais de 60 microcistinas (Chorus & Bartram, 1999).

O uso dos bioensaios, complementados com técnicas qualitativas e quantitativas diversas disponíveis na atualidade, possibilitam a aquisição de importantes informações sobre a toxicidade de uma amostra, permitindo um maior entendimento do seu impacto no ambiente natural destinado ou não ao abastecimento de água, além dos mecanismos de ação nos organismos.

Baseado em estudos de toxicidade oral em níveis subcrônicos, realizados com camundongos (Fawell et al, (1994)) e com porcos (Falconer et al, (1994)), foi estabelecida como ingestão diária aceitável para microcistina-LR, o valor de 0,04 µg/Kg de peso corpóreo (Chorus & Bartram, 1999). A partir desse valor foi adotado pela Organização Mundial da Saúde - OMS um limite máximo aceitável de 1 µg/L de microcistinas, valor incorporado à Portaria MS/518 de 25 de março de 2004.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo complementar a caracterização da toxicidade de uma cepa de *Microcystis* spp., por meio de testes de toxicidade aguda com camundongos, após caracterização química preliminar de microcistinas - MCs realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodo HPLC-PDA e espectrometria de massas com ionização por electrospray MS-ESI.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização química preliminar das microcistinas

Culturas de *Microcystis* spp. NPLJ4, cepa comprovadamente tóxica gentilmente cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram mantidas em meio ASM-1, sob aeração, temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa da ordem de $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. No final da fase de crescimento exponencial das culturas, foram coletadas alíquotas para extração (congelamento / descongelamento por 3 vezes), purificação em fase sólida (cartuchos de C18) e preparação dos extratos semipurificados, de microcistinas de acordo com Krishnamurthy et al (1986), Lawton et al (1994a) e ENVIRONMENT AGENCY (1998) com adaptações, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodo - HPLC-PDA e espectrometria de massas com ionização por electrospray ESI/MS.

As análises por HPLC foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu (LC-10AD) com detector de UV/VIS (SPD-M10A) a 238 nm em condições isocráticas e fase reversa C18 (5 µm, $250 \times 10 \text{ mm}$) com fase móvel de acetonitrila : acetato de amônio (28:72 v/v) 20 mM, pH 5,0, fluxo = 1 mL/min, forno a 40°C (CTO-10A). As análises por MS foram feitas em espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo (QuattroLC da Micromass) equipado com fontes API. Foi utilizada a ionização por electrospray (ESI) no modo positivo, usando um potencial de 3,6 kV no capilar, 46 V no cone de amostragem e 8 V no cone extrator. A aquisição dos dados foi feita na região de m/z 300 a 1400. O extrato foi inserido na fonte de ionização por meio de uma bomba tipo seringas (Carlo Erba Phoenix 40), usando metanol : água (7:3 v/v) como solventes e fluxo de 150 µL/min.

Preparação do extrato para o teste de toxicidade

Para obtenção dos extratos para o teste de toxicidade, foram preparadas culturas da cepa tóxica de *Microcystis* spp. NPLJ4 e de cepa não tóxica de

Microcystis aeruginosa, sob condições descritas no item 5.1. Após 15 a 20 dias (fase final do crescimento exponencial), as culturas foram concentradas (Figura 1) e quantificadas pelo método de sedimentação de Uthermöhl (1958). Em seguida, os concentrados foram congelados, liofilizados (liofilizador LB 5000 TT da Terroni-Fauvel) e mantidos em freezer até o uso (Figura 2).

Os extratos foram preparados misturando-se porções do material liofilizado e solução salina (NaCl - 0,09%), de forma a obter as concentrações correspondentes às dosagens previstas para cada peso médio corpóreo dos animais previamente selecionados e volume de injeção. Após homogeneização, os extratos foram submetidos ao processo de congelamento / descongelamento e alíquotas dos extratos foram separadas e mantidas em freezer para análise posterior de microcistinas - MCs totais por imunoenensaio ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

Teste de toxicidade aguda - 24h

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com camundongos machos da espécie *Swiss albino* com peso corpóreo entre 16,4 e 28,2 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Os animais foram identificados e separados em grupos de 3 animais em função do peso corpóreo, com o intuito de equalizar os efeitos por dosagem aplicada e facilitar a interpretação dos resultados.

Para cada dosagem testada foram utilizados 3 camundongos, tendo sido aplicados volumes que variaram em função do peso médio dos animais entre 0,880 e 1 mL no teste T1 e entre 0,355 e 1,0 mL no teste T2, por meio de injeções intraperitoniais (i.p.). Após as injeções, os animais foram mantidos em local arejado com ração e água, sob observação contínua durante as 5 primeiras horas e posteriormente, em intervalos de 3 a 6 h até 24 horas. Para o cálculo estatístico da DL50_{24h} de extrato seco foi usado o programa Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al, 1977) com intervalo de confiança de 95%.

Análise de microcistinas MCs totais

A análise de microcistinas - MCs totais (intra + extracelulares) foi realiza-



Cultura logo após inoculação em meio ASM1

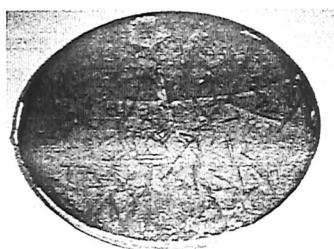


Cultura no início do processo de concentração



Cultura no final do processo de concentração

Figura 1 - Vista geral da culturas em diferentes fases do processo de concentração



Cultura congelada antes da liofilização



Cultura após liofilização

Figura 2 - Vista geral do material antes e após liofilização

da por imunoenensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) de placas da *Beacon Analytical Systems Inc.* O método de ELISA utilizado baseia-se na competição direta entre dois tipos de antígenos (a possível microcistina - MC presente na amostra, e em seguida, o antígeno marcador ligado a uma enzima), sobre um número limitado de anticorpos policlonais com reatividade cruzada também contra vários congêneres de microcistina, adsorvidos na parede da placa de reação. Após os processos de incubação - lavagem da placa - adição de substrato da enzima - incubação, procede-se a análise por absorção espectrofotométrica a 450 nm. A coloração resultante ao final dessa reação enzimática é inversamente proporcional à concentração da toxina presente na amostra analisada.

As alíquotas dos extratos foram previamente filtradas (pré-filtro GF/C) e em seguida diluídas em água deionizada em proporções variadas, de forma a possibilitar a quantificação pela curva de calibração construída especificamente para o lote de amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora os valores de índice de similaridade obtidos entre os espectros de UV a 238 nm dos picos da principal

microcistina - MC dos extratos e do padrão de MC-LR (Sigma M2912 Lot 31K 1647) sejam elevados, com valores de até 0,9999, os tempos de retenção dos picos correspondentes às MCs dos extratos variaram entre 9,8 e 10,4 min (Figura 3a) e foram bem diferentes dos tempos de retenção obtidos pelo pico do padrão de MC -LR, entre 7,3 a 7,8 min.

A análise posterior do extrato por espectrometria de massas revelou um espectro com $[M+H]^+$ a m/z 1037,8 (Figura 3b), indicando tratar-se de outro tipo de MC, possivelmente alguma variante da MC -LR (Matthiensen et al, 2000) ou outra desconhecida, pois o espectro do padrão de MC-LR apresentou $[M+H]^+$ a m/z 995,7.

Desta forma, pôde-se constatar que embora a principal MC presente no extrato e a MC-LR do padrão sejam quimicamente diferentes, os grupos cromóforos podem ser muito similares ou coincidentes, o que explica os elevados índices de similaridade obtidos.

Os valores da DL50 (camundongos, i.p.) de 60 diferentes MCs são reportados em Sivonen & Jones (1999) e variaram em média entre 50 e 300 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo. Diferenças minoritárias na estrutura podem levar a diferenças pronunciadas na toxicidade. Valores reportados de DL50 (i.p.) foram

de 250 e 180 $\mu\text{g/Kg}$ para $[D\text{-Asp}^3]\text{MC-RR}$ e $[Dha^7]\text{MC-RR}$, respectivamente, mas de 600 $\mu\text{g/Kg}$ para MC-RR. Em contraste, a $[D\text{-Asp}^3]\text{MC-LR}$ é uma variante com menor toxicidade (DL50 entre 90 e 300 $\mu\text{g/Kg}$) do que MC-LR (DL50 entre 25 e 150 $\mu\text{g/Kg}$).

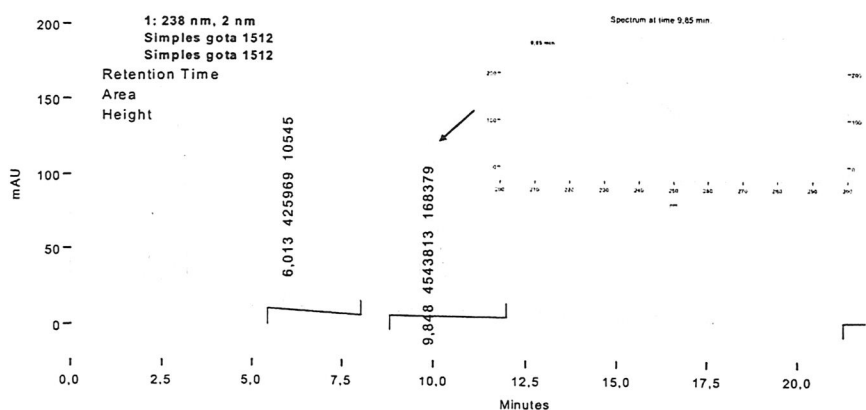
Esses dados revelam a importância e necessidade da realização de testes de toxicidade com organismos como complemento às sofisticadas técnicas qualitativas e quantitativas, por possibilitar a aquisição de importantes informações sobre a toxicidade de uma amostra, especialmente nos casos em que os padrões de toxinas não são comercialmente disponíveis.

As culturas concentradas tóxica NPLJ4 e não tóxica, apresentaram densidades de $3,8 \times 10^7$ cel/mL e de $1,1 \times 10^7$ cel/mL, respectivamente.

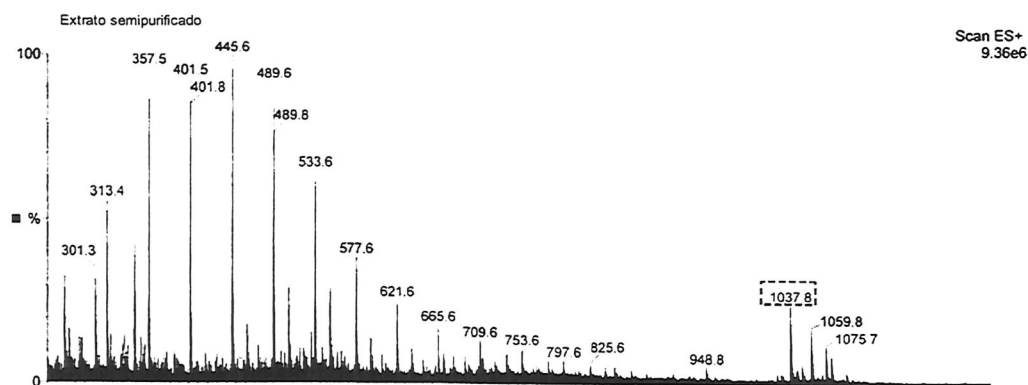
Visando o enquadramento da cepa de acordo com a classificação sugerida por Lawton et al (1994b), o teste preliminar T1 foi realizado com dosagens de 125, 250, 500, e 1000 mg/kg p.c. (mg de material seco / kg de peso médio corpóreo dos camundongos), para a cepa tóxica NPLJ4, e com a dosagem mais elevada (de 1000 mg/kg p.c.) para a cepa não tóxica utilizada como controle tipo A. Além deste controle, foi estabelecido o controle tipo B, realizado com aplicação de 1 mL de solução salina.

Para as dosagens de extrato da cepa NPLJ4 aplicadas, todos os camundongos morreram em menos de 1 h e manifestaram efeitos comumente descritos em intoxicações por hepatotoxinas (Falconer (1991) e Carmichael (1992)), como baixa mobilidade, fotofobia e paralisia dos membros inferiores, letargia, perda de brilho nos olhos, inchaço da região abdominal, contrações musculares, respiração ofegante, paradas respiratórias, seguidas por coma e morte (Figura 4).

A inibição bioquímica particular das proteínas fosfatases tipo 1 e 2A, resultam na desorganização do citoesqueleto dos hepatócitos e como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas (Carmichael, 1994). A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais, provocando acúmulo de sangue neste órgão e inchaço do mesmo, condição esta que pôde ser observada na maioria dos casos de cobaias que tiveram a morte em poucas horas dos ensaios realizados.

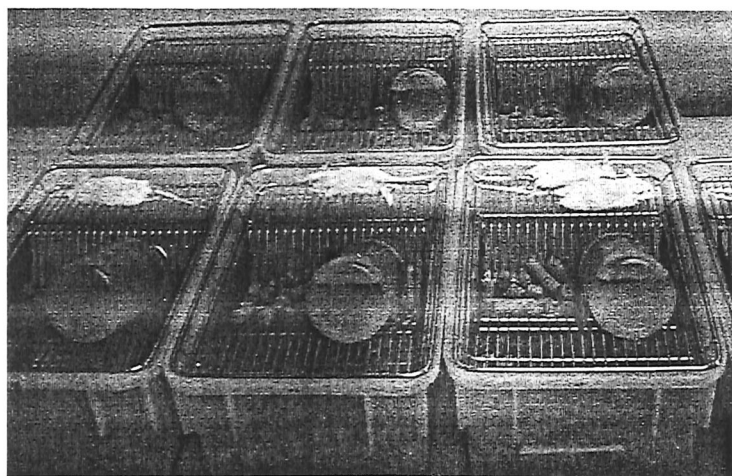


a) Cromatograma



b) Espectro de massas

Figura 3 - Cromatograma e espectro de massas do extrato semipurificado de microcistinas produzidas pela cepa tóxica NPLJ4



prostração



inchaço na região abdominal

Figura 4 - Vista dos camundongos durante e após o teste

Em função dos resultados obtidos foram preparadas, logo em seguida, diluições do extrato de 125 mg/kg p.c. e novo extrato para dosagem de 10 mg/kg p.c., de forma a possibilitar a continuidade do teste com as dosagens de 62,5, 31,25, 15,625 e 10 mg/kg p.c. (mg de material seco / kg de peso médio corpóreo dos camundongos). Como o peso médio dos camundongos selecionados para essas dosagens diferiu do peso médio considerado na preparação do extrato de 125 mg/kg p.c., aplicou-se um fator de correção no volume a ser injetado para cada dose. Os resultados de interesse obtidos no teste T1 são apresentados na Tabela 1.

Os camundongos do controle A realizado com dosagem de 1000 mg/kg p.c. de extrato da cepa não tóxica ficaram imóveis após as injeções intraperitoniais mas começaram a apresentar sinais de restabelecimento após cerca de 5 h.

A curva de calibração construída para análise de microcistinas - MCs apresentou correlação (%Bo e concentração de MCs) $R^2 = 0,9913$ e foi devidamente validada com o emprego de padrão externo com concentração previamente conhecida, apresentando porcentagem de recuperação de 118% (80 a 130 % - faixa estabelecida pelo fabricante para validação da análise). As análises apresentaram valores de coeficiente de variação relativa máxima de 8,3%. Na Figura 5 são apresentadas as concentrações de microcistinas - MCs totais ($\mu\text{g/L}$) dos extratos analisados por imunoenensaio ELISA e as correspondentes dosagens de MCs totais ($\mu\text{g/kg}$) (μg de MCs totais / kg de peso médio corpóreo dos camundongos) calculadas em função do volume injetado e do peso médio corpóreo dos camundongos.

Em função dos resultados obtidos, um novo teste T2 foi realizado, aplicando-se as dosagens de 8, 10, 12, 14, 16 e 18 mg/kg p.c. (mg de material seco / kg de peso médio corpóreo dos camundongos) do extrato da cepa tóxica NPLJ4, com o intuito de obter maior precisão da DL₅₀^{24h}. Neste ensaio utilizou-se o mesmo extrato e variou-se o volume aplicado entre 0,355 e 1 mL por meio de injeções intraperitoniais (i.p.), a fim de resultar nas dosagens preestabelecidas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2. Na Figura 6 são apresentadas fotos dos camundongos do controle (ativos) e das dosagens de 8 mg/kg p.c. (imobilidade) e 18 mg/kg p.c. (imobilidade e fotofobia). Na Figura

Tabela 1 – Resultados do Teste T1 com camundongos

Tipo extrato	Dose extrato(*) (mg/kg p.c.)	Peso do animal (g)	Peso médio (g)	Desvio padrão	Tempo de morte (h:min)
Controle A cepa não tóxica	1000	20,78	20,4	0,512	-
		20,61			-
		19,82			-
Controle B NaCl 0,09%	0	24,58	21,8	4,643	-
		24,38			-
		16,44			-
Cepa tóxica NPLJ4	10	22,78	22,0	0,775	-
		21,99			-
		21,23			-
Cepa tóxica NPLJ4	15,625	21,18	21,0	0,197	04:28
		21,08			01:30
		20,8			01:58

(*) : mg de material seco / kg de peso médio corpóreo dos camundongos

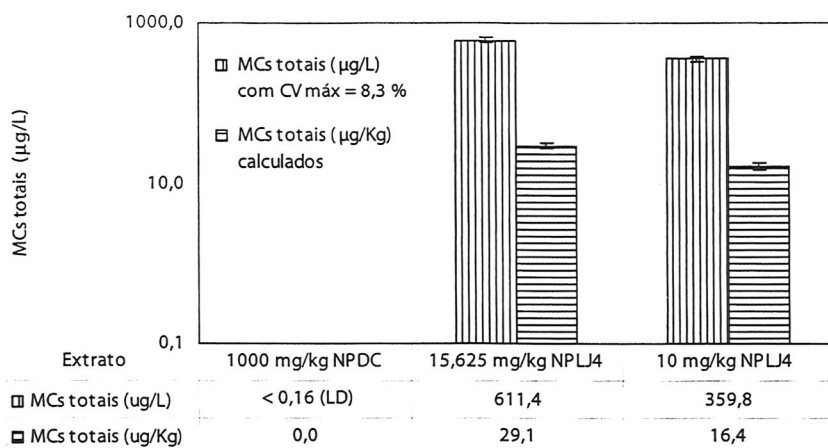


Figura 5 - Concentrações de MCs totais dos extratos de interesse utilizados no teste T1

ra 7 são apresentadas as concentrações de MCs totais ($\mu\text{g/L}$) do extrato analisado por imunoenensaio ELISA e as correspondentes dosagens de MCs totais ($\mu\text{g/kg}$) (μg de MCs totais / kg de peso médio corpóreo dos camundongos) calculadas em função do volume injetado e do peso médio corpóreo.

De acordo com os resultados obtidos da Tabela 2, observou-se a morte de todos os animais submetidos à dosagem de 18 mg/kg p.c. do extrato e a resistência de todos os animais submetidos à dosagem de 8 mg/kg p.c., o que confirma a faixa de sensibilidade obtida no teste T1.

A faixa de sensibilidade encontrada no teste T1 é bastante similar à encontrada no teste T2 em relação

às dosagens de extrato seco T1 (10 a 15,625 mg/kg p.c.) e T2 (8 a 18 mg/kg p.c.), e especialmente, em relação às dosagens de MCs totais: T1 (16,4 e 29,1 $\mu\text{g/Kg}$) e T2 (14,1 e 31,7 $\mu\text{g/Kg}$) (Figuras 5 e 7, Tabela 3).

As correlações entre as dosagens de extrato utilizados nos testes e os resultados obtidos de MCs totais analisados nos extratos apresentaram elevada correlação ($R = 0,988$ e $R^2 = 0,976$), o que assegura a confiabilidade do procedimento experimental empregado. Esses valores aumentam ($R = 0,992$ e $R^2 = 0,984$) com a inclusão dos dados calculados.

Os valores das DL₅₀^{24h} encontrados nos ensaios foram de 13,7 mg/kg p.c. de extrato seco e de 24,2 $\mu\text{g/kg}$ p.c. de MCs totais estimada e revelaram



camundongos do controle (ativos)

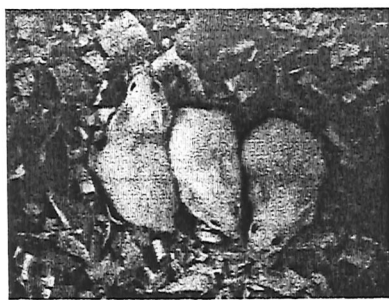
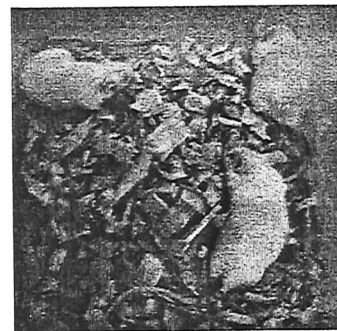
camundongos submetidos à
dosagem de 8 mg/kg p.c.
(imobilidade)camundongos submetidos à
dosagem de 18 mg/kg p.c.
(imobilidade e fotofobia)**Figura 6 - Vista dos camundongos durante o teste T2 (17:00 h)**

Tabela 2 - Resultado do Teste T2 com camundongos

Tipo extrato	Dose extrato (*) (mg/kg p.c.)	Peso do animal (g)	Peso médio (g)	Desvio padrão	Tempo de morte (h:min)
Controle NaCl 0,09%	0	28,2	21,2	6,167	-
		19,1			-
		16,44			-
Cepa tóxica NPLJ4	8	19,61	20,3	0,787	-
		20,1			-
		21,15			-
	10	22,21	21,9	0,405	-
		22,1			02:47
		21,46			-
	12	22,5	22,7	0,208	02:18
		22,8			-
		22,9			-
	14	22,51	23,0	0,440	02:09
		23,24			-
		23,3			-
	16	23,62	24,2	0,516	-
		24,2			-
		24,65			02:04
	18	25	25,4	0,361	01:07
		25,5			02:18
		25,7			01:20

(*) : mg de material seco / kg de peso médio corpóreo dos camundongos

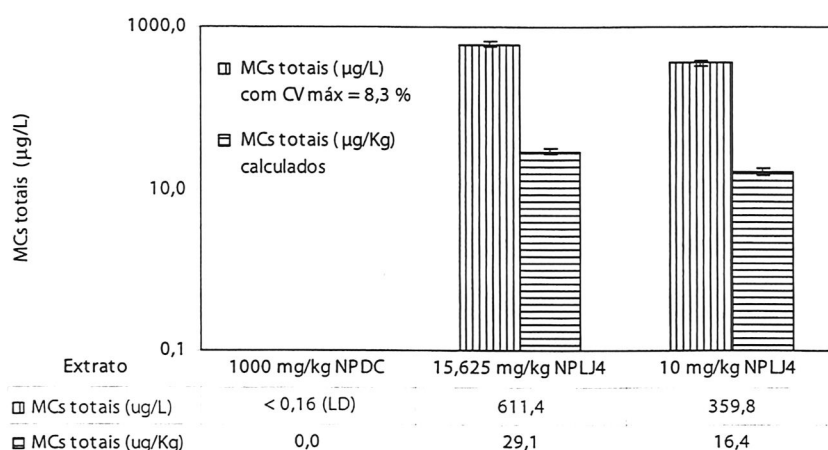


Figura 7 - Resultados de MCs totais dos extratos utilizados no teste T2

Tabela 3 - Resumo dos principais resultados obtidos nos testes T1 e T2 com camundongos

Teste	Dose extrato NPLJ4 (mg/kg p.c.)	Concentração MCs totais nos extratos (µg/L)	Concentração MCs totais no material seco (µg/mg p.s.)	Peso médio (g)	Desvio padrão	Dose MCs totais (µg/kg p.c.)	Tempo de morte (h:min)
T1	10	359,8	1,64	22,0	0,775	16,4	-
							-
							-
	15,625	611,4	1,86	21,0	0,197	29,1	04:28
							01:30
							01:58
T2	8	286,0	1,76 (*)	20,3	0,787	14,1	-
							-
							-
	18	805,7	1,76	25,4	0,361	31,7	01:07
							02:18
							01:20

(*) : valor calculado.

a elevada toxicidade da cepa NPLJ4, o que pode ser explicada pela elevada concentração de MCs totais presentes nos extratos (Figuras 5 e 7, Tabela 3).

A DL50_{24h} de MC – LR em camundongos via intraperitoneal (i.p) é estimada entre 25 e 150 µg/Kg. Para as demais microcistinas, os limites de toxicidade variam entre 50 a 1.200 µg/Kg, influenciados pelas modificações químicas dos aminoácidos individuais ou de variação na composição de aminoácidos (Rinehart et al, 1994).

As concentrações calculadas de MCs no material seco utilizado para preparação de extratos com diferentes concentrações resultaram entre 1,64 e 1,86 µg/mg p.s. (µg de MCs totais / mg do material seco) (Tabela 3), o que

condiz com a classificação proposta por Lawton et al (1994b), apresentada na Tabela 4. Segundo os autores, o material contendo cianobactérias é considerado altamente tóxico, se a DL50_{24h} para camundongos for menor que 100 mg/kg p.c. ou se a concentração de MCs totais no material seco for superior a 1,0 µg/mg p.s. Assim, pôde-se verificar que a cepa NPLJ4 testada enquadra-se no grau 3 de elevada toxicidade e que a cepa não tóxica utilizada como controle tipo A, com concentração de MCs totais inferior ao limite de detecção do método não é tóxica para as cobaias utilizadas.

Os resultados encontrados neste ensaio demonstraram que a cepa utilizada apresentou toxicidade superior quando comparada com outras culturas

mantidas em laboratório, por exemplo, ao reportado por Azevedo et al (1994), com a cepa de *M. aeruginosa* (NPJB-1) isolada do Lago das Garças, São Paulo – SP, cujo valor da DL100 24h foi de 31 mg/kg p.c. de extrato seco. Uma toxicidade menor foi descrita por Honda et al (2001), com cepas não axênicas de *M. panniformis* (SPC 686 e 702), também isoladas no Lago das Garças, São Paulo – SP, com valores da DL100 24h entre 100 e 316 mg/kg p.c. de extrato seco.

Estudos com amostras naturais realizados por Matthiensen et al (1999) em região integrante do Estuário da Lagoa dos Patos reportaram valores de DL50_{24h} menores que 100 mg/kg p.c., variando entre 35 e 140 mg/kg p.c. e

Tabela 4 - Limites de toxicidade de material seco e de toxinas propostos por Lawton et al

Grau de toxicidade	DL50 em camundongos (mg/kg p.c.)	Concentração toxinas (µg/mg p.s.)
não	>1000	< 0,01
1 - baixa	500 a 1000	0,01 a 0,1
2 - média	100 a 500	0,1 a 1,0
3 - alta	<100	>1,0

concentrações de MCs no material seco, maiores que 1,0 µg/mg p.s. em amostras dominadas por *Microcystis aeruginosa* neste ambiente. A cultura de *Microcystis aeruginosa* PCC7813 apresentou DL50_{24h} de 70,7 mg/kg p.c. e teve maior concentração de MCs no material seco em relação às florações (1,145 µg/mg p.s.).

Níveis próximos a estes também foram reportados por Oliveira et al (2003), com valores de DL100_{24h} entre 28,44 e 62,90 mg/kg p.c., em amostras de água no reservatório do Funil, Rio de Janeiro, dominadas por florações de *Microcystis* spp, *Cylindrospermopsis* sp e *Anabaena spiroides*.

Estudos realizados por Vasconcelos (1999), com florações de cianobactérias coletadas em lagos e reservatórios na região Norte e Central de Portugal, demonstraram a alta toxicidade de duas amostras com valores de DL₅₀ entre 30 e 175 µg/Kg, enquanto cepas isoladas e cultivadas destes florescimentos causaram uma maior ação tóxica, com valores de DL₅₀ de 15 a 75 µg/Kg.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os testes de toxicidade aguda com camundongos demonstraram, segundo classificação proposta por Lawton et al (1994b), que a cepa tóxica testada enquadrava-se no grau de elevada toxicidade, com valor de DL50 24h de extrato seco menor que 100mg/kg.p.c.(13,7mg/kg.p.c.), de DL5024h de microcistinas totais estimada de 24,2 µg/kg p.c. e concentração de MCs no material seco maior que 1,0 µg/mg p.s. (entre 1,64 e 1,86 µg/mg p.s.);

Os resultados obtidos no estudo revelaram a importância e necessidade da realização de testes de toxicidade com organismos como complemento às sofisticadas técnicas qualitativas e quantitativas, por possibilitar a aquisição de importantes informações sobre a toxicidade de uma amostra, especialmente nos casos em que os padrões de toxinas não são comercialmente disponíveis.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho refere-se a resultados parciais de pesquisa realizada no âmbito do PROSAB (Programa de Pesquisa em Saneamento Básico) Edital 4 – Tema 1, com apoio financeiro da FINEP, CEF e CNPq. Os autores desejam expressar seus agradecimentos à FAPESP (proc. nº 01/13561 – 3) pela concessão da bolsa de Doutorado ao primeiro autor e (proc. 02/08341-7) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, S.M.F.O. et al. First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of Applied Phycology, Dordrecht, v.6, n.3, p.261-265, June. 1994.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, v.72, p.445-459. 1992.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. Scientific American, vol. 270, nº 1, pág.64 – 72. 1994.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 416p. 1999.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. Ecological Engineering, Amsterdam, v.16, n.1, p.51-60, Oct. 2000.

DI BERNARDO, L. Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento. ABES, Rio de Janeiro, 1995.

ENVIRONMENT AGENCY. The determination of microcystin algal toxins in raw and treated waters by high performance liquid chromatography / Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, UK. 1988.

FALCONER, I.R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Environmental Toxicology and Water Quality, New York, v.6, n.2, p.177-184, May. 1991.

FALCONER, I.R. et al. Toxicity of the blue-green algae (*Cyanobacterium*) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. Environ. Toxicol. Water Qual. Inter., 9: 131-139. 1994.

KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL. Toxic peptides from freshwater *Cyanobacteria* (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides

from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. Toxicon, vol 24 nº.9 865 – 873. 1986.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science & Technology, Easton, v.11, n.7, p.714-719. 1977.

HONDA, R.Y. et al. Toxicidade e aspecto ecológicos de *Microcystis panniformis* no Lago das Garças, São Paulo, SP. In: 8º CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, João Pessoa. Resumos... João Pessoa: Sociedade Brasileira de Limnologia. p.212. 2001.

LAWTON, L.A. et al. (1994b). Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: CODD, G.A. et al. (Ed.). Detection methods for cyanobacterial toxins. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. p.111-116. 1994b.

LAWTON, L.A.; EDWARDS, C., CODD G. A. Extraction and high-performance liquid, chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analysis, July 1994, vol.119. 1994a.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J.S.; CODD, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro, v.59, n.2, p.1-15. 1999.

MATTHIENSEN A. et al. [D-Leu1] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. Phytochemistry, 55, 383-387. 2000.

OLIVEIRA, A.C.P.; SAMPAIO, G.E.; GÔMARA, G.A. Detecção de hepatotoxinas e neurotoxinas (toxinas de cianobactérias) no reservatório do Funil. In: 9º CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, Juiz de Fora. Seções de painéis. 2003.

RINEHART, K.L.O.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B.W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). Journal of Applied Phycology, Dordrecht, v.6, n.2, p.159-176. 1994.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. "Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil." Nova Hedwigia. 71(3-4), pp. 359-385. 2000.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. (ed.). Toxic cyanobacteria in water. London: E & FN Spon. p.41-111. 1999.

UTHERMÖHL, H. On the perfecting of quantitative phytoplankton method. Int. Ass. Theor. Appl. Limnol. Commun. v.9. 1958.

VASCONCELOS, V. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 32: 249-254. 1999.

Endereço para correspondência:

Emília Kiyomi Kuroda
Dep. de Hidráulica e Saneamento
Escola de Engenharia de São Carlos – USP
Av. Trabalhador São-Carlense, 400
13566-590 São Carlos – SP – Brasil
Tel.: (16) 3373-9528
E-mail: ekkuroda@yahoo.com.br