

Angelica Nunes Garcia

**Estudo químico e de toxicidade subcrônica da
cianobactéria *Pseudanabaena galeata***

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2014

Angelica Nunes Garcia

**Estudo químico e de toxicidade subcrônica da
cianobactéria *Pseudanabaena galeata***

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

Orientadora: Dra. Luciana Retz de Carvalho

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Garcia, Angelica Nunes

G215e Estudo químico e de toxicidade subcrônica da cianobactéria *Pseudanabaena galeata* / Angelica Nunes Garcia -- São Paulo, 2014.

93 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Algas. 2. Cyanobacteria. 3. Mudanças em cultivo. I. Título

CDU: 582.26

*“Pedras no caminho?
Guardo todas,
um dia vou construir
um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

*Dedico e Agradeço, em especial, aos meus pais, **Roberto e Sonía**, que sempre estão ao meu lado, me amando e me amparando em tudo nessa vida. Estou aqui, firme e forte, graça a eles!!! (Amo vocês com todas as minhas forças).*

*Dedico e Agradeço também, com muito carinho, ao meu marido **Rodrigo**, que sempre está ao meu lado, me apoiando e incentivando, afirmando que tudo vai dar certo! Obrigada por toda sua paciência, afeto, e companheirismo, Te amo!!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha orientadora e amiga Dra. Luciana Retz de Carvalho, por todo afeto, ensinamento e atenção, nunca me deixando sem uma palavra de conforto.

À Dra. Célia Leite Sant'Anna, pela amizade e por disponibilizar as cepas em estudo e espaço do Banco de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia.

Ao Fernando Pípole e Luciana Cunha, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por toda amizade e colaboração nos experimentos realizados.

À Dra. Silvana Lima Górnjak, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração.

À Fabiana Elias, pela colaboração prestada.

À Geanne Conserva e Vanessa Simei Martins, por todo apoio, contribuição e principalmente pela amizade e conversas descontraídas.

À Julyana Farias, Jonathan Bento, Natali Bento, Neide Souza, por todo apreço, auxílio e convivência no laboratório.

À Fernanda Rios, Edna Rosini e Camila Rosal, por todo auxílio parceria nas disciplinas cursadas e principalmente pelas palavras encorajadoras.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, Dra. Andréa Tucci, Dra. Nair Sumie Yokoya, Dra. Mutue Toyota Fujii, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães e Dra. Diclá Pupo Santos, pela ajuda e convivência.

Aos demais colegas do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, Cecília Hissami, Camila Malone, Neuzete Oliveira, Levi Pompmayer, Valdirene Marida dos Santos e Watson Arantes, pela colaboração e convivência.

Aos meus familiares e colegas, que sempre estiveram ao meu lado, pela paciência, força e palavras de carinho.

Agradeço pela vida de todos os camundongos utilizados neste trabalho, e digo, com todo respeito, que elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa através do Programa de Pós-graduação do Instituto de Botânica.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, por fornecer a infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

E por ultimo e não menos importante, agradeço a Deus e aos meus orixás que estão sempre ao meu lado me iluminando e me dando suporte para seguir minha jornada neste mundo.

Peço sinceras desculpas às pessoas que por esquecimento, não mencionei, mas estiveram ao meu lado e contribuíram direta ou indiretamente com este projeto sempre me apoiando, com uma palavra encorajadora e torcendo para que tudo desse certo!

Muito Obrigada!!!

RESUMO

As cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes, com grande importância ecológica, integrantes do fitoplâncton dos corpos de águas doces e salgadas, em todo o mundo. Uma de suas características mais importantes é a produção de metabolitos tóxicos, as cianotoxinas, cuja presença em reservatórios de abastecimento, em água utilizada em processos de diálise e ainda acumuladas em glândulas e tecidos de mariscos e peixes foi responsável por inúmeros casos de intoxicação e de morte de seres humanos e de animais. O Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica dedica-se ao estudo de vários aspectos destes organismos, sendo um deles a avaliação das atividades biológicas dos extratos das cianobactérias que compõem a Coleção de Cultura de Cianobactérias do Instituto de Botânica. Nessas pesquisas, foram encontradas cepas causadoras de efeitos tóxicos importantes: *Pseudanabaena galeata* (CCIBt 3082), que está entre essas linhagens tóxicas, foi escolhida para investigação toxicológica e química, devido aos efeitos nocivos que pode acarretar a animais, por administração oral e intraperitoneal. Tendo-se em conta o risco que a(s) substância(s) ativa(s) presente(s) em *P. galeata* pode(m) representar e à inexistência de conhecimentos sobre seus efeitos tóxicos, produzidos pela exposição prolongada sobre mamíferos, nossa proposta consistiu na caracterização química e toxicológica (exposição prolongada, administração por via oral) da fração ativa do extrato da cepa *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082 (Cyanobacteria, Pseudanabaenales). Para tanto, a cepa *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082, coletada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, em São Paulo, no dia 01/11/1996 e mantida na Coleção de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisas em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, foi cultivada, em dois “batches” distintos, sob condições controladas de temperatura e irradiância. Cada uma a sua vez, as biomassas, obtidas na fase exponencial de crescimento da cepa, foram liofilizadas, pesadas, submetidas à extração com ácido acético 0,1 M, por exposição a ultrassom, seguida por centrifugação. Os sobrenadantes foram reunidos, liofilizados e pesados. A biomassa resultante do processamento do primeiro “batch” foi empregada no ensaio preliminar de toxicidade em camundongos, por via oral, dose única e no ensaio de toxicidade subcrônica, 28 dias. A biomassa resultante do segundo “batch” foi dividida em duas porções. Com a primeira delas foram realizados os seguintes estudos químicos: teste cromatográfico, por Cromatografia Planar, para detecção de microcistinas, saxitoxinas, antoxina-a e β -metilaminoalanina; fracionamento e refracionamento do extrato em ácido acético 0,1 M; análise do extrato, da Fração **1** e da subfração **1.a**, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e análise do

mesmo extrato e da subfração **1.a**, por Cromatografia Planar, para pesquisa de aminoácidos, amins, alcaloides, peptídeos e terpenoides. Com a outra porção, foram realizados estudos biológicos “in vitro” e “in vivo”. Os estudos “in vitro” consistiram em ensaios bioautográficos para análise do potencial antifúngico, das atividades antioxidante e da inibidora da enzima acetilcolinesterase. Os estudos “in vivo” consistiram dos ensaios, em camundongo, 1) da toxicidade aguda (dose única), por via intraperitoneal e 2) da toxicidade oral aguda (DL_{50}) e 3) da toxicidade subcrônica, 28 dias. O extrato obtido do primeiro “batch”, no ensaio preliminar de toxicidade em camundongos, por via oral, dose única, causou sinais de intoxicação e lesões no fígado e rins dos animais; no ensaio de toxicidade subcrônica 28 dias, efetuado com doses muito baixas (1, 5 e 25 mg kg^{-1}), os animais apresentaram apenas tendência de perda de peso. No extrato obtido do segundo “batch” não foram detectadas, por Cromatografia Planar, microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a ou β -metilaminoalanina. O fracionamento e refracionamento do extrato em ácido acético (em cartucho de sílica octadecilsilanizada) resultaram no isolamento de substância com natureza peptídica. Os estudos biológicos “in vitro” apresentaram resultados negativos para a presença de substâncias com atividade antifúngica, anticolinesterásica e antioxidante. Já nos estudos biológicos “in vivo”, no ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via intraperitoneal, o extrato causou congestão hepática; a (DL_{50}), por via oral foi de 5.000 mg kg^{-1} , e no exame “post-mortem” foi observado fígado congesto. No ensaio de toxicidade subcrônica, os animais apresentaram tendência de perda de peso e nos estudos histopatológicos do intestino, dilatação cística no topo das vilosidades, devido à dilatação dos vasos linfáticos. A comparação entre as doses únicas, por via oral, que levaram os animais a óbito, relativas aos experimentos realizados com biomassa do primeiro e do segundo “batch” (1.000 mg kg^{-1} – 5.000 mg kg^{-1}) mostra disparidade entre os efeitos tóxicos de ambos. Levando-se em conta que logo após o cultivo do segundo “batch”, a amostra da cepa *P. galeata* CCIBt 3082 entrou em senescência e em lise, essas observações indicam mudanças bioquímicas na linhagem, quadro já descrito para outros organismos, na literatura.

Palavras-chave: Cyanobacteria, toxicidade aguda, mudanças em cultivo.

ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryotic photosynthetic organisms with high ecological importance and are also phytoplankton components of fresh and salt water bodies around the world. Such organisms show very important features like the production of toxic metabolites - the so called cyanotoxins, whose presence in the water supplies and in the water employed in the dialysis process, also accumulated in fish and shellfish glands and tissues was responsible for numerous poisoning and death cases of humans and animals. The Institute of Botany Center for Research in Phycology is dedicated to study some aspects of Cyanobacteria Biology and Chemistry, one of them being the evaluation of the biological activities of the cyanobacteria extracts which compose its Culture Collection. In these studies, it was found strains which cause significant toxic effects: *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082, which ranks among these toxic strains, was chosen for toxicological and chemical research due to the harmful effects that it may cause in mammals by oral and intraperitoneal administration. Taking into account that the active compound could represent a risk factor to people as well as animals along with the lack of knowledge on its toxic effects, induced in mammals by prolonged exposure, our work was aimed at the chemical and toxicological characterization (long-term exposure, oral administration) of the *P. galeata* extract active fraction. To this end, samples of the strain *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082 (Cyanobacteria, Pseudanabaenales), collected from a Parque Estadual das Fontes do Ipiranga pond, in São Paulo, on November 1st, 1996, and kept in our Culture Collection were cultured under controlled conditions. The biomass obtained from two different batches, during the strain exponential growth phase was lyophilized, weighed and ultrasound-assisted extracted with acetic acid 0.1 M, followed by centrifugation. The supernatants were pooled, lyophilized and weighed. The biomass resulting from the first batch was used in preliminary toxicity tests, by oral administration in mice, given in a single dosage and in a 28-day repeated study. The biomass resulting from the second batch was divided into two portions; with the first one, planar chromatographic assays were carried out to detect microcystins, saxitoxins, anatoxin-a and β -methylaminoalanine; acetic acid 0.1 M extract fractionation and re-fractionation; High Performace Liquid Chromatography analyses from extract, fraction **1** and subfraction **1.a.** and planar chromatographic analyses of extract and sub fraction **1.a.**, for amino acids, amines, alkaloids, peptides and terpenoids detection. With the remaining portion, biological studies "in vitro" and "in vivo" were performed. The "in vitro" studies were composed by bioautographic assays for detection of antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase

activities of cyanobacterial extract. The "in vivo" studies performed in mice were composed by 1) acute toxicity assay, single dose, by peritoneal administration and 2) acute oral toxicity essay (DL_{50}) and 3) subchronic toxicity, 28 days. The first batch extract, in the preliminary study carried out by oral administration to mice, single dose, provoked physiological responses and lesions in the liver and kidneys. By subchronic exposure-28 days, the extract did not cause any harmful effect, inasmuch as the used doses were low (1, 5 e 25 $mg.kg^{-1}$). The treated animals only presented weight loss tendency. In the second batch, in the planar chromatographic study, microcystins, saxitoxins, anatoxin-a and β -methylaminoalanine were not detected. The extract fractionation and re-fractionation (C_{18} cartridge) resulted in the isolation of a peptidic-type compound. The "in vitro" tests gave negative results for antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activity. In the biological studies "in vivo", only the dose of 5.000 $mg kg^{-1}$ (LD_{50} , single dose, intraperitoneal via,) caused animal death, accompanied by hepatic congestion. In the subchronic toxicity test, the animals showed weight loss tendency and, in the intestinal histopathology, cystic dilation at the villosity apex due to lymphatic vessels dilation were observed. Comparison between acute lethal doses (oral administration), observed in the tests carried out with the first and second biomass batch (1.000 $mg kg^{-1}$ - 5.000 $mg kg^{-1}$) showed significant disparity between toxic effects of both cultured materials. Taking into consideration that after the *P. galeata* CCIBt 3082 second batch cultivation, the samples kept in the culture collection entered into senescence, followed by lysis, this datum suggests lineage biochemical changes, phenomenon already described for other microorganisms.

Key words: Cyanobacteria, acute toxicity, changes in culture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia da espécie *Pseudanabaena galeata*6
- Figura 2.** Imagem do fígado de camundongo controle (A) e tratado (B) com o extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082, por via intraperitoneal, dose única de 1.000 mg kg⁻¹. As setas mostradas em B indicam as lesões com aspecto de cistos.20
- Figura 3.** Fotomicrografias do fígado de camundongo tratado (A e B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, e fígado de camundongo controle (C). Em A e B as áreas em destaque mostram possível área de necrose, com aumento do espaçamento dos sinusóides. As setas indicam presença de hepatócitos com citoplasma claro, sugestivo de presença de vacúolos no seu interior. Aumentos: 400x (A) e 1.000x (B e C).....39
- Figura 4.** Fotomicrografias do fígado de camundongo tratado com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082. Em A, B e C os círculos indicam hiperemia das veias centro-lobulares que se encontram muito próximas e parênquima hepático desorganizado. Aumentos: 40x, 100x e 1.000x respectivamente.....40
- Figura 5.** Fotomicrografias do rim de camundongo controle (A) e tratado (B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082. Em B, as áreas em destaque mostram aumento das células dos túbulos contorcidos (células hipertróficas) e luz expandida do túbulo. Aumento: 400x (A e B).....41
- Figura 6.** Ganho de peso total, consumo de ração (em gramas) de camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, durante 28 dias, por via oral. Os dados são apresentados como média + desvio – padrão.....43
- Figura 7.** Peso relativo dos órgãos: fígado, rim e pulmão (g/100 g de peso vivo), de camundongo tratado ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082 por via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média + desvio – padrão.....44

- Figura 8.** Cromatograma (CLAE) do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.....46
- Figura 9.** Cromatograma (CLAE) da **Fração 1** do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.....46
- Figura 10.** Cromatograma (CLAE) da subfração **1.a** do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.....47
- Figura 11.** Espectro ultravioleta da substância eluída em $T_r = 1,72$, em corrida cromatográfica (**figura 10**), da subfração **1.a** do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.47
- Figura 12.** Cromatografia, em placas de gel de sílica, do extrato em ácido acético e subfração **1.a** de *P. galeata* 3082; fases móveis: butanol/ácido acético/água 5:4:1 (v/v/v), Revelador: ninidrina.....49
- Figura 13.** Imagem do fígado de camundongo controle (A) e tratado (B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082, por via intraperitoneal, dose única de 1.000 mg kg^{-1} . B- fígado com aspecto congesto.50
- Figura 14.** Imagem do fígado de camundongo tratado com extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082, por via oral, dose única de 5.000 mg kg^{-1} . Fígado com aspecto congesto.52
- Figura 15.** Ganho de peso total (g), consumo total de ração (g) e água (mL) de camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata*, via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média + desvio – padrão.....54
- Figura 16.** Peso relativo do baço, timo, fígado e rim (g/100g de peso vivo) de camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata*, por via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média + desvio – padrão.....56
- Figura 17.** Fotomicrografias do intestino de camundongo controle (A) e tratado (B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082. Em B se observa maior número de dilatações císticas no topo das vilosidades devido à dilatação de vasos linfáticos. Aumento: $1.000\times$ (A e B).57

Figura 18. Celularidade do baço e da medula óssea dos camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético de *P. galeata* CCIBt 3082, por via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média + desvio – padrão.58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas das principais cianotoxinas.....	15
Tabela 2. Composição e quantidade das soluções-estoques	23
Tabela 3. Composição dos traços de metais (*)	23
Tabela 4. Rendimentos das biomassas e extratos em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082.....	38
Tabela 5. Avaliação do ganho de peso total (em gramas) dos camundongos tratados ou não com as doses 1, 5 e 25 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082 via oral, durante 28 dias	42
Tabela 6. Consumo médio diário e total de ração (em gramas) dos camundongos tratados ou não com as doses 1, 5 e 25 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> via oral, durante 28 dias	42
Tabela 7. Peso relativo dos órgãos – fígado, rim e pulmão (g/100g de peso vivo) dos camundongos tratados ou não com as doses 1, 5 e 25 mg kg ⁻¹ de extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> via oral, durante 28 dias	43
Tabela 8. Resultados da pesquisa das classes químicas dos componentes do extrato e subfração 1.a em ácido acético 0,1 M de <i>P.galeata</i> CCIBt 3082.....	48
Tabela 9. Resultados das análises dos ensaios bioautográficos do extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082.....	49
Tabela 10. Compilação das observações sobre os sinais de intoxicação, nos animais que receberam por via oral, o extrato em ácido acético de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082.....	51
Tabela 11. Avaliação do ganho de peso total (em gramas) dos camundongos controle e tratado com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082 via oral, durante 28 dias	52
Tabela 12. Consumo médio diário e total de ração (em gramas) dos camundongos controle e tratado com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> via oral, durante 28 dias	53

- Tabela 13.** Consumo médio diário e total água (em mililitros) dos camundongos controle e tratado com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias53
- Tabela 14.** Peso relativo dos órgãos – baço, timo, fígado e rim (g/100g de peso vivo) dos camundongos tratados ou não com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias55
- Tabela 15.** Celularidade do baço de camundongos tratados ou não com as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias57
- Tabela 16.** Celularidade da medula óssea de camundongos tratados ou não com as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Cianobactérias	1
1.1.1 Classificação.....	2
1.1.2 Cianobactéria nos ecossistemas.....	3
1.2 Gênero <i>Pseudanabaena</i>	5
1.2.1 A espécie <i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher 1949	6
1.3 Metabolitos especiais	7
1.3.1 Cianotoxinas	8
1.3.1.1 Hepatotoxinas	8
1.3.1.1.1 Microcistinas	8
1.3.1.1.2 Nodularinas.....	10
1.3.1.2 Citotoxinas.....	10
1.3.1.2.1 Cilindrospermopsinas.....	10
1.3.1.3 Neurotoxinas.....	11
1.3.1.3.1 Saxitoxinas	11
1.3.1.3.2 Anatoxina-a	12
1.3.1.3.3 Anatoxina-a(s)	13
1.3.1.3.4 BMAA	13
1.3.1.4 Dermatotoxinas	14
1.3.1.4.1 Lipopolissacarídeo	14
1.4 Mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas em Cyanobacteria.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DELINEAMENTO DO PROJETO.....	20

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 O organismo	22
4.1.1 O meio de cultura.....	22
4.2 Cultivo e multiplicação da cepa	24
4.3 Obtenção dos extratos cianobacterianos	24
4.4 Estudos químicos	25
4.4.1 Prospecção de cianotoxinas conhecidas (microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a e β -metilaminoalanina) no extrato em ácido acético 0,1 M, de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082.....	25
4.4.1.1 Pesquisa cromatográfica de microcistinas (Harada <i>et al.</i> 1988, 1999).....	25
4.4.1.2 Pesquisa de saxitoxinas (Buckley <i>et al.</i> 1976)	25
4.4.1.3 Pesquisa de anatoxina-a (Ojanpera <i>et al.</i> 1991)	26
4.4.1.4 Pesquisa do aminoácido β -metilaminoalanina, reagente n° 207 (Merck 1971e)	26
4.4.2 Fracionamento bioguiado do extrato em ácido acético de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082.....	26
4.4.3 Análise do extrato, da fração 1 e da subfração 1.a de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	27
4.4.4 Análise do extrato e da subfração 1.a resultante do fracionamento do extrato de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082, por Cromatografia Planar, para pesquisa de metabolitos pertencentes às classes químicas dos aminoácidos, amins, peptídeos, alcaloides e terpenoides.....	28
4.4.4.1 Ninidrina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos e amins (grupo N-H), n° 207 (Merck 1971e)	28
4.4.4.2 Vanilina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos especiais e amins (Grupo N-H), reagente n° 328 (Merck 1971g).....	29
4.4.4.3 Anisaldeído, para pesquisa cromatográfica de terpenoides, n° 22 (Merck 1971a).....	29
4.4.4.4 Detecção de substâncias orgânicas com Iodo, n° 160 (Merck 1971d).....	29
4.4.4.5 Detecção de peptídeos (hidrólise, seguida de pesquisa de aminoácidos, por CP, com ninidrina (Bernardi <i>et al.</i> 2003)	29
4.4.4.6 Reagente de Dragendorff , segundo Munier & Macheboeuf, para alcaloides, n° 131 (Merck 1971b)	30

4.4.4.7 Iodo - iodeto de potássio acídico para alcaloides, n° 162 (Merck 1971c).....	30
4.4.4.8 Iodeto de potássio platinado para alcaloides, reagente n° 246 (Merck 1971f).....	31
4.5 Estudos biológicos.....	31
4.5.1 Ensaio <i>in vitro</i>	31
4.5.1.1 Ensaio bioautográfico para análise de potencial antifúngico do extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P.galeata</i> CCIBt 3082 (Agrisino <i>et al.</i> 2004).....	31
4.5.1.2 Ensaio bioautográfico para avaliação da atividade antioxidante do extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P.galeata</i> CCIBt 3082 (Hostetmann <i>et al.</i> 2003).....	31
4.5.1.3 Ensaio bioautográfico para avaliação de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, no extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P.galeata</i> CCIBt 3082 (Rhee <i>et al.</i> 2001, Marston <i>et al.</i> 2002).....	32
4.5.2 Ensaio “in vivo”.....	32
4.5.2.1 Animais.....	32
4.5.2.2 Ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via intraperitoneal, em camundongos.....	33
4.5.2.3 Ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via oral, em camundongos.....	33
4.5.2.4 Determinação da Dose Letal Média (DL ₅₀), por via oral, dose única, do extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> – Protocolo n° 425 da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (Oecd 2008a).....	34
4.5.2.5 Ensaio de toxicidade subcrônica, via oral (período de 28 dias).....	34
4.5.2.6 Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração.....	34
4.5.2.7 Observação das respostas fisiológicas à administração do extrato (Brito 1994).....	35
4.5.2.8 Avaliação do peso relativo dos órgãos.....	35
4.5.2.9 Estudos histopatológicos.....	35
4.5.2.10 Avaliação da celularidade do baço.....	36
4.5.2.11 Avaliação global de células da medula óssea.....	36
4.6 Análise Estatística.....	37
4.7 Forma de análise dos resultados.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38

5.1 O organismo	38
5.2 Obtenção das biomassas e dos extratos cianobacterianos.....	38
5.3 Ensaio realizado com o extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P. galeata</i> , obtido do PRIMEIRO “BATCH”	38
5.3.1 Ensaio preliminar de toxicidade em camundongos, por via oral, dose única (1º “batch”)	38
5.3.2 Ensaio de toxicidade subcrônica 28 dias, por via oral (1º “batch”).....	41
5.4 Ensaio realizado com o extrato obtido da biomassa resultante do SEGUNDO “BATCH”	45
5.4.1 Estudos Químicos (2º “batch”).....	45
5.4.1.1 Teste cromatográfico, por CP, para detecção das cianotoxinas conhecidas (microcistinas, saxitoxinas, antoxina-a e β -metilaminoalanina) (2º “batch”).....	45
5.4.1.2 Fracionamento do extrato em ácido acético de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082 (2º “batch”)	45
5.4.1.3 Análise do extrato, da Fração 1 e da subfração 1.a por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (2º batch).....	46
5.4.1.4 Análise do extrato e da subfração 1.a de <i>P. galeata</i> CCIBt 3082, por CP, para pesquisa de metabolitos pertencentes às classes dos aminoácidos, amins, alcaloides, peptídeos e terpenoides (2º “batch”)	47
5.4.2 Estudos Biológicos (2º “batch”)	49
5.4.2.1 Ensaio <i>in vitro</i> (2º “batch”).....	49
5.4.2.1.1 Ensaio bioautográfico para análise de potencial antifúngico, da atividade antioxidante e da atividade inibidora da acetilcolinesterase, realizados no extrato em ácido acético 0,1 M de <i>P.galeata</i> CCIBt 3082 (2º “batch”)	49
5.4.2.2 Ensaio <i>in vivo</i> (2º “batch”).....	50
5.4.2.2.1 Ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via intraperitoneal, em camundongos (2º “batch”).....	50
5.4.2.2.2 Ensaio de toxicidade oral aguda (DL ₅₀) do extrato de <i>P. galeata</i> – Protocolo 425 (2º “batch”)	51
5.4.2.2.3 Ensaio de toxicidade subcrônica 28 dias (2º “batch”)	52

6 CONCLUSÕES	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cianobactérias

As cianobactérias, anteriormente denominadas cianoprocariontes, cianófitas, cianofíceas, algas azuis ou azuis-esverdeadas, são micro-organismos de inquestionável importância evolutiva e ecológica que pertencem ao reino *Eubacteria*, Domínio *Bacteria* (Woese *et al.* 1990).

Elas são descendentes diretas dos primeiros organismos capazes de realizarem fotossíntese oxigênica e portanto, responsáveis pelo surgimento e manutenção do Oxigênio livre (O₂) existente na atmosfera terrestre. A consequência deste acúmulo de oxigênio foi a formação da camada de ozônio (O₃) e a conversão da atmosfera, de redutora para oxidante; isto mudou drasticamente a composição das formas de vida na Terra, ou seja, causou a quase extinção dos organismos intolerantes ao oxigênio e a explosão da biodiversidade (Gottlieb 1998, Thomas 2005).

São, portanto, consideradas uma das formas de vida mais antiga da Terra e seus registros fósseis (estromatólitos) datam de cerca de 3,5 milhões de anos atrás, ou seja, da Era Pré-Cambriana (Fischer 1965, Schopf & Barghoorn 1967, Giovannoni *et al.* 1988, Komárek 2006).

As cianobactérias são organismos procariontes, ou seja, não possuem membrana envolvendo o seu material genético, entretanto possuem, como as algas eucariontes, os aparatos fotossintéticos denominados fotossistemas I e II e a clorofila a, utilizando a água como doadora de elétrons, no processo de fotossíntese (Whitton & Potts 2000, Altermann 2006). Possuem, como pigmentos acessórios, as clorofilas b, d e f (Komárek 2006, Chen *et al.* 2010), carotenoides (pigmento laranja), xantofilas (pigmento amarelo), ficobilinas (pigmento vermelho) e ficocianinas (pigmento azul) e têm o glicogênio como substância de reserva (Falconer 1996, Ministério Da Saúde 2003, Sant'Anna *et al.* 2006, Spinosa *et al.* 2008).

Possuem parede celular semelhante a das bactérias gram-negativas, com uma camada proteica (peptidoglicana) recobrindo a membrana plasmática e têm reprodução exclusivamente assexuada (Zakhia *et al.* 2008).

Assumem formas variadas, podendo ser unicelulares isoladas (apresentando formas esféricas, ovoides ou cilíndricas), filamentosas ou formadoras de colônias multicelulares, pois podem produzir bainha mucilaginosa, o que as mantém unidas (Falconer 1996, Sant'Anna *et al.* 2006, Spinosa *et al.* 2008).

1.1.1 Classificação

De acordo com Schirrmeyer *et al.* (2011), as cianobactérias são um dos poucos filos que apresentaram evolução multicelular, o que ocasiona grande variedade morfológica entre as espécies. Essa multicelularidade pode ter conferido vantagens adaptativas ecofisiológicas em diferentes condições ambientais de temperatura, salinidade, umidade e pH e facilitou a diversificação de novas linhagens (Whitton & Potts 2000).

Em razão de possuírem vários padrões de organização celular - de unicelulares a multicelulares - segundo o Manual de Bergey de sistemática bacteriológica, as cianobactérias estão divididas em cinco seções: I (Chroococcales) e II (Pleurocapsales) compreendem as formas unicelulares, que apresentam fissão binária e fissão múltipla, respectivamente, enquanto as seções III a V compreendem as formas multicelulares. A seção III (Oscillatoriales) agrupa as formas filamentosas não heterocitadas (ausência de células especializadas responsáveis pela fixação de nitrogênio), a seção IV (Nostocales), as filamentosas heterocitadas (presença de células especializadas responsáveis pela fixação de nitrogênio), ambas apresentando divisões em apenas um plano, e finalmente a seção V (Stigonematales), as filamentosas que se dividem em mais de um plano (ramificadas) (Rippka *et al.* 1979, Boone & Castenholz 2001).

Atualmente, a sistemática do grupo das cianobactérias é regida pelo “Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas” (Código de Melbourne 2011). Os autores Komárek e Anagnostidis (Anagnostidis & Komárek 1985, Komárek & Anagnostidis 1986a, 1988, 1990) e (Komárek & Anagnostidis 1986b, 1989, 2005) foram os revisores da classificação botânica das cianobactérias, baseando-se principalmente no modo da divisão celular, na produção de células diferenciadas e em características morfológicas do filamento. Esses autores dividiram o grupo em quatro ordens: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales, que perfazem um total de cerca de 2.800 espécies.

O surgimento das técnicas moleculares propiciou, nas últimas três décadas, discussões sobre a classificação das cianobactérias, devido à realização dos testes de hipótese filogenéticas. Essas informações são utilizadas em conjunto com os caracteres diacríticos mais importantes - como os elementos morfológicos, ultraestruturais e citológicos - e com observações ecofisiológicas e bioquímicas, nas classificações mais criteriosas. Este estudo combinado constitui a Taxonomia Polifásica (Hoffmann *et al.* 2005, Komárek 2006, 2010).

O sistema de classificação revisto pelos autores Hoffmann *et al.* 2005, baseado na abordagem polifásica, é composto por 4 subclasses, 6 ordens e 33 famílias, como segue:

Subclasse Gloeobacterophycideae, Ordem: Gloeobacterales (1 família);

Subclasse Synechococcophycideae, Ordem: Synechococcales (4 famílias) e Ordem Pseudanabaenales (2 famílias);

Subclasse Oscillatorioophycideae, Ordem: Chroococcales (11 famílias) e Ordem Oscillatoriales (5 famílias);

Subclasse Nostocophycideae, Ordem Nostocales (10 famílias).

1.1.2 Cianobactéria nos ecossistemas

As cianobactérias, assim como as algas eucariontes, são importantes produtores primários, o que lhes confere particular relevância nos ciclos globais de carbono e nitrogênio. Além disso, entre os numerosos e interessantes metabolitos especiais que produzem estão as toxinas conhecidas como cianotoxinas, responsáveis por inúmeros casos de intoxicação em seres humanos e em animais (Falconer 1996, Ministério Da Saúde 2003, Sant'anna *et al.* 2006, Spinosa *et al.* 2008).

Elas são encontradas nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos (água doce, salobra ou marinha) e também em ambientes extremos, como fontes termais, neve e areias do deserto. São componentes naturais do fitoplâncton, estando presentes em rios, lagos, represas e reservatórios utilizados para o abastecimento público e lazer (Codd 1995, Chorus & Bartram 1999, Panosso *et al.* 2007, Schirrmeister *et al.* 2011).

Nos ambientes de água doce, em condições normais, as cianobactérias apresentam períodos de dominância, que iniciam no final do verão e se estendem até o outono, porém devido à eutrofização dos corpos d'água, esses períodos podem se estender por todas as estações do ano. A eutrofização é definida como o aumento da quantidade de nutrientes e/ou de matéria orgânica no ambiente aquático o que raramente é decorrente de condições naturais. De um modo geral, ela é resultado do rejeito inadequado de fertilizantes e defensivos químicos agrícolas, porém principalmente do descarte de esgotos domésticos e industriais, influências mais óbvias das atividades dos seres humanos, no processo que altera a qualidade da água (Watanabe 1996, Codd 2000).

A eutrofização favorece o crescimento exagerado das cianobactérias, as florações, que são observadas quando há formação de uma densa camada de células, na superfície da água. Essa camada superficial é composta por células que possuem aerótopos (vesículas gasosas); entretanto, existem células cianobacterianas que não possuem esses vacúolos e permanecem dispersas nos corpos d'água, praticamente invisíveis, apesar de serem numerosas (Watanabe 1996, Spinosa *et al.* 2008).

Segundo Chorus & Bartram (1999), mais de 40% dos lagos e reservatórios da Europa, Ásia e América estão eutrofizados, o que os tornam ambientes favoráveis ao desenvolvimento massivo de cianobactérias.

São vários os problemas decorrentes da formação e decomposição das florações: um dos principais é a redução do oxigênio dissolvido na água, o que causa morte de peixes e mudanças nas qualidades organolépticas da água (cor, sabor e odor) (Sant'Anna *et al.* 2006). Entretanto, o mais nocivo deles é a liberação das cianotoxinas para o ambiente, por ocasião do rompimento da parede celular, na fase de senescência das células (Ministério Da Saúde 2003). Todos estes fatores têm amplo impacto social, econômico e ambiental (Watanabe 1996, Sant'Anna *et al.* 2006).

Aos agentes que propiciam o desenvolvimento exacerbado das cianobactérias, é necessário acrescentar os relativos às mudanças climáticas globais [temperatura elevada, aumento das concentrações atmosféricas de dióxido de carbono, elevado fluxo de raios ultravioletas (UV)] (Bláha *et al.* 2009).

As estimativas mostram que 25% a 75% das cianobactérias componentes de florações são tóxicas, o que confere ao estudo das cianotoxinas notável importância, especialmente em

se considerando suas implicações na ecotoxicologia, na toxicologia e na química ambiental (Chorus 2001).

1.2 Gênero *Pseudanabaena*

O gênero *Pseudanabaena* foi descrito primeiramente, em 1915, por Robert Lauterborn e revisado, em 1988, por Anagnostidis & Komárek e em 2005, por Hoffmann *et al.* (2005). É um gênero morfológicamente variável (Romo & Miracle 1994). Pertence à família Pseudanabaenaceae, ordem Pseudanabaenales dentro da subclasse Synechococcophycideae. A família Pseudanabaenaceae é caracterizada por tricomas simples, com largura inferior a 4 µm. As células são mais longas do que largas, possuem tilacoides parietais, contêm vesículas gasosas polares e paredes transversais visivelmente restritas. Algumas espécies exibem adaptações cromáticas complementares, o que permite a ideal regulação entre os pigmentos acessórios fotossintéticos ficocianina e ficoeritrina; este ajuste adequado ao espectro de luz dominante é um mecanismo que favorece a competição com outros organismos (Acinas *et al.* 2009).

Existem 56 espécies listadas no banco de dados “AlgaeBase”, das quais 41 são taxonomicamente aceitas (Guiry e Guiry, 2014).

O gênero *Pseudanabaena* é amplamente distribuído e ocorre em diversos ambientes aquáticos eutrofizados (Acinas *et al.* 2009). Algumas de suas espécies são cosmopolitas e encontradas comumente em comunidades planctônicas, perifíticas ou bentônicas, em ambientes aquáticos oligotróficos, mesotróficos ou eutróficos. Outras espécies crescem em solo ou em associação com rotíferos planctônicos coloniais ou ainda em mucilagem de outras algas. Poucas espécies foram identificadas em ambientes extremos (nascentes de água mineral e quente, habitats salinos ou hipersalinos) (Franceschini *et al.* 2010).

São poucos os estudos realizados sobre a toxicidade do gênero *Pseudanabaena*: Oudra *et al.* (2001) citaram a espécie *P. mucicola* como produtora de microcistinas e de outros metabolitos intracelulares tóxicos, e relataram a produção de microcistinas por cepas de *Pseudanabaena* sp. isoladas de corpos d'água, do Marrocos. Igualmente, segundo Teneva (2009), eram microcistinas as toxinas produzidas por *P. limnética*, coletada em águas profundas, na Tunísia.

Já os estudos realizados por Olvera-Ramírez *et al.* (2010) discorrem sobre metabolitos desconhecidos de *P. tenuis*, que exercem efeitos negativos sobre alguns organismos importantes do zooplâncton.

No Brasil, existem duas notícias sobre a toxicidade do extrato de *P. galeata*, administrados por via oral e intraperitoneal a camundongos Balb/c. Ambas relatam que os efeitos observados, nos dois casos, são bastante distintos: não foram observadas lesões ou perda de peso nos animais que receberam o extrato por via intraperitoneal, porém os que o receberam por via oral apresentaram perda peso e lesões nos rins, baço, intestinos e fígado. Os autores não fizeram referência à natureza química da toxina, porém observaram que os sinais de intoxicação e lesões observados eram diferentes dos causados pelas cianotoxinas já conhecidas (Cunha *et al.* 2010, Pípole *et al.* 2010).

1.2.1 A espécie *Pseudanabaena galeata* Böcher 1949

A espécie *Pseudanabaena galeata* foi estabelecida por Böcher em 1949 (**Figura 1**). Suas características diacríticas principais são: tricomas curtos, constrictos, geralmente com 4-6 (8) células retas ou levemente curvas, mais longas que largas, 1,6-2,2 μm de diâmetro, 2,5-3,6 μm de comprimento; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo, septos não granulados, com aerótopos terminais; célula apical cilíndrico-arredondada, sem espessamento (Tucci *et al.* 2006).

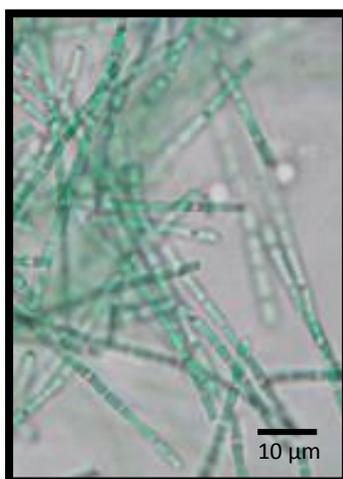


Figura 1. Fotomicrografia da espécie *Pseudanabaena galeata*

Esta espécie é encontrada nos países Alemanha, Romênia, Espanha, Estados Unidos, Brasil, Venezuela, Austrália e Nova Zelândia (Aboal *et al.* 1996, Caraus 2012, Guiry & Guiry 2014, Kirkwood & Henley 2006, Tucci *et al.* 2006, Guiry, & Guiry 2014). É especialmente bentônica e tem alto potencial para a produção de pigmentos; o meio de cultura mais favorável pra seu cultivo em laboratório é o BG-11 (Leal *et al.* 2001).

1.3 Metabolitos especiais

Cianobactérias produzem grande variedade de metabolitos especiais, os quais exibem interessantes atividades biológicas, das quais são exemplos a antiviral, a antifúngica, a antienzimática, a anti-neoplásica e a alelopática (Corbel *et al.* 2013). Porém, merecem especial destaque as potentes toxinas, as cianotoxinas, substâncias nocivas que podem afetar a saúde, ou mesmo levar à morte, seres humanos e animais. São muitos os registros de incidentes fatais ou não, associados à cianotoxinas, ocorridos em praticamente todas as regiões do globo terrestre (Carmichael 1992, Falconer 2005).

As cianotoxinas, segundo a classe química a que pertencem, estão agrupadas em peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos e de acordo com suas propriedades farmacológicas, em hepatotoxinas, citotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (Carmichael 1992, Ministério Da Saúde 2003, Sant'Anna *et al.* 2006, Bláha *et al.* 2009).

Segundo Codd (2000), o risco maior que as cianotoxinas apresentam deve-se ao fato de que podem ser absorvidas por diferentes vias, que são, além da ingestão, o contato e a inalação. Os efeitos observados em mamíferos são diversos e compreendem desde danos no fígado, pulmões e rins, problemas neurológicos e morte (caso da ingestão) até irritações e erupções cutâneas e de mucosas, vermelhidão e coceira, irritação nos olhos, dores nos músculos e articulações, gastroenterite, náusea, vômito, febre, sintomas de gripe, dor de garganta e dor abdominal (Falconer 1996, Chorus & Bartram 1999).

Essas substâncias também podem ter efeitos agudos ou crônicos, determinados pela dose ingerida e pelo tempo de exposição: na China, o aumento da incidência de câncer primário do fígado está sendo associado a ingestão, por longos períodos, de água contendo cianotoxinas, apesar de ter sido disponibilizada para consumo humano (Codd 2000, Duy *et al.* 2000, Codd *et al.* 2005).

Os autores Bláha *et al.* (2009) sugerem a necessidade de pesquisas que abordem também os possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas, entre diferentes classes de metabolitos de cianobactérias, assim como interações com outros estressores tóxicos, como metais e poluentes orgânicos persistentes.

1.3.1 Cianotoxinas

1.3.1.1 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas - que abrangem os peptídeos cíclicos microcistinas e nodularinas - são as cianotoxinas que apresentam o maior risco de intoxicação, para os consumidores de água potável (Falconer & Humpage 2005, Sant'Anna *et al.* 2006, Spinoso *et al.* 2008).

As microcistinas foram as primeiras cianotoxinas a serem reconhecidas como tal e suas estruturas foram determinadas a partir de 1978 (Francis 1878, Elleman *et al.* 1978, Botes *et al.* 1984). Nesta época, o desenvolvimento dos processos de cromatografia e o uso de equipamentos como os de Ressonância Magnética Nuclear, permitiram um rápido avanço nas pesquisas relacionadas ao isolamento e determinação de estrutura, de tal modo que, atualmente, são contabilizadas mais de 90 isoformas isoladas e identificadas deste peptídeo (Carmichael 1992, Falconer 1996, Chorus & Bartram 1999, Pearson *et al.* 2010, Puddick 2013).

As nodularinas foram descobertas em 1988, em florações de *Nodularia spumigena* ocorridas em águas salobras e ambientes estuarinos. É estruturalmente semelhante às microcistinas e delas existem nove isoformas (Rinehart *et al.* 1988; Pearson *et al.* 2010).

1.3.1.1.1 Microcistinas

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos, isolados inicialmente da espécie *Microcystis aeruginosa*, cuja estrutura geral é a seguinte: ciclo (-D-alanina¹-X²-D-MeAsp(eritro-β-metilaspártico)³-Z4-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷) (**Tabela 1**). Nela, os

grupamentos X e Z são dois aminoácidos variáveis (L-aminoácidos). Também ocorrem variações isoméricas no aminoácido Adda [ácido (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico)]. Este aminoácido é sintetizado apenas por cianobactérias e a ele é atribuída a atividade tóxica da molécula (Rinehart *et al.* 1988, Puddick *et al.* 2013).

As microcistina-LR (leucina-arginina), microcistina-RR (arginina-arginina) e microcistina-YA (tirosina-alanina) são exemplos de variações qualitativas observadas nos L-aminoácidos (Carmichael 1994, Chorus & Bartram 1999, Falconer & Humpage 2005, Bláha *et al.* 2009).

As microcistinas são produzidas por diversas espécies de cianobactéria como *Microcystis*, *Dolicospermum* (*Anabaena*), *Nodularia*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Haphalosiphon* e *Oscillatoria* (Carmichael 1994, Chorus & Bartram 1999). As microcistinas são as cianotoxinas mais frequentes e mais abundantes, no meio ambiente, e foram as primeiras a serem associadas diretamente a intoxicação e morte de mamíferos (Francis 1878, Bláha *et al.* 2009).

A ação das microcistinas é dose-dependente, levando a intoxicações agudas ou crônicas, e à morte, em poucos dias ou mesmo em horas. São resistentes à digestão, no trato gastrointestinal de organismos eucariontes. Concentram-se no fígado, pois suas moléculas, através de um sistema de transporte ativo, penetram nos hepatócitos, passam pelos dutos biliares e interagem irreversivelmente com as enzimas celulares denominadas fosfatases 1 e 2A. A inibição das proteínas fosfatases leva à fosforilação excessiva dos filamentos estruturais, o que causa a retração dos hepatócitos e o seu descolamento das células vizinhas e dos capilares sinusoidais. A consequência destes eventos é hemorragia intra-hepática, falência do órgão e choque hipovolêmico, sendo observado o aumento da relação fígado/peso corpóreo de 5% para 8% a 10% (Eriksson *et al.* 1990, Sahin *et al.* 1995).

Em observações clínicas de animais de experimentação, são observados prostração, piloereção, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia. Os sinais de intoxicação apresentados por seres humanos são: pele e olhos irritados, febre, tontura, fadiga e gastroenterite aguda. Existem evidências de que dose subletais destas hepatotoxinas estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer primário de fígado (Duy *et al.* 2000, Nicholson & Burch 2001, Hoehn & Long 2004, Falconer & Humpage 2005, Bláha *et al.* 2009).

1.3.1.1.2 Nodularinas

As nodularinas são pentapeptídeos cíclicos que possuem a estrutura geral ciclo (-D-MeAsp (eritro- β -metilaspártico)¹-Z²-Adda³-D-glutamato⁴-Mdha⁵) (**Tabela 1**), em que o grupamento Z é o único aminoácido variável. São produzidas exclusivamente pela espécie *Nodularia spumigena* e delas são conhecidas nove isoformas, sendo uma delas não tóxica (Pearson *et al.* 2010). São encontradas predominantemente no Mar Báltico e em estuários de água salobra e lagos costeiros da Nova Zelândia e Austrália (Chorus & Bartram 1999, Hoehn & Long 2004). Diferem das microcistinas pelo tamanho da cadeia, ou seja, possuem dois aminoácidos a menos. Entretanto, possuem a mesma unidade tóxica, o ADDA: conseqüentemente, apresentam o mesmo mecanismo de ação, sendo porém mais tóxicas do que as microcistinas, devido à maior facilidade de penetração nos hepatócitos (Chorus & Bartram 1999, Nicholson & Burch 2001, Hoehn & Long 2004, Kormas & Lympelopoulou 2013).

1.3.1.2 Citotoxinas

1.3.1.2.1 Cilindrospermopsinas

São substâncias de função mista alcaloide-policetídeo, formadas por um núcleo guanídínico tricíclico central, ao qual está ligado uma unidade hidroximetiluracila (Pearson *et al.* 2010) (**Tabela 1**). Existem apenas três isoformas desta toxina que é produzida por espécies dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Umezakia*, *Raphidiopsis* e *Lyngbya* (Pearson 2010, Jiang 2012).

São encontradas, na maioria das vezes, em florações em regiões tropicais, subtropicais e áridas e possuem ação citotóxica lenta, cujo efeito máximo é alcançado apenas cinco a sete dias, após ingestão ou administração.

Os sinais de intoxicação por estas substâncias são: mal estar, anorexia, vômitos, dor de cabeça, aumento do fígado, prisão de ventre inicial, seguido de diarreia com sangue e níveis variados de gravidade de desidratação.

Possuem ação inibitória da síntese proteica, principalmente nas células do fígado, onde determinam o acúmulo de triglicérides, como consequência da suspensão da síntese e da secreção de lipoproteínas. No caso de doses elevadas, a morte do mamífero é ocasionada por parada cardíaca e falência hepática; doses menores provocam lesões específicas também em outros órgãos, tais como rins e glândulas suprarrenais, pulmões, coração, timo, baço, mucosa gástrica e sistema imunológico, pois a morte sobrevém apenas após um período de cinco a sete dias (Chorus & Bartram 1999, Hoehn & Long 2004, Falconer & Humpage 2005, Kormas & Lymperopoulou 2013).

1.3.1.3 Neurotoxinas

As neurotoxinas são alcaloides que, em geral, atuam bloqueando a transmissão do sinal nervoso entre os neurônios. São divididos em três grupos, que diferem entre si pela ação farmacológica e esqueleto estrutural: Saxitoxinas, Anatoxina-a e Anatoxina-a(s). Recentemente, devido aos seus efeitos neurodegenerativos, o aminoácido β -metilaminoalanina (BMAA) também foi incluído entre as neurotoxinas (Carmichael 1992, Falconer 1996, Sant'Anna *et al.* 2006, Spinosa *et al.* 2008, Affe & Barboni 2012).

1.3.1.3.1 Saxitoxinas

As saxitoxinas, também conhecidas como PSP (Paralithic Shellfish Poison), são alcaloides guanidínicos que possuem um grupo carbamato (**Tabela 1**) e podem ser não sulfatados (saxitoxinas - STX), monossulfatados (goniautoxinas - GTX) ou dissulfatados (C - toxinas). Recentemente, foram também isoladas variantes decarbamoiladas de saxitoxinas (Chorus & Bartram 1999, Corbel *et al.* 2013).

Inicialmente, essas toxinas foram isoladas de dinoflagelados marinhos, organismos responsáveis pela incidência das “marés vermelhas”, porém posteriormente, foram descobertas em cianobactérias, mais especificamente, nos gêneros *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*. Existem 58 variantes de saxitoxinas, das quais somente seis são sintetizadas por cianobactérias (Wiese *et al.* 2010).

Têm de efeito muito rápido, pois bloqueiam os canais de sódio das células nervosas inibindo a transmissão dos sinais, não interferindo, porém, na permeabilidade ao potássio. Em doses maiores, o resultado imediato é paralisia, hipotensão, dispneia e falência respiratória. Os sinais clínicos de intoxicação aguda observados em seres humanos compreendem tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede, taquicardia, paralisia, hipotensão e dispneia e, finalmente, falência respiratória. Esses sintomas podem ter início cinco minutos após a ingestão da toxina e a morte, ocorrer dentro de período que pode variar de 2 a 12 horas (Carmichael 1994, Chorus & Bartram 1999, Falconer & Humpage 2005, Sant'Anna *et al.* 2006, Lewellyn 2006, D'Agostino *et al.* 2014).

Estimativas atuais consideram as saxitoxinas responsáveis por cerca de 2.000 casos de intoxicação de seres humanos por ano, com um índice de mortalidade variando entre 1 e 50 % (Zaccaroni & Scaravelli 2008, D'Agostino *et al.* 2014).

Efeitos crônicos produzidos por saxitoxinas não são conhecidos: a única avaliação dos efeitos resultantes da exposição subcrônica de animais a saxitoxinas relata a ausência de alterações e lesões em ratos tratados, por via oral, durante 28 dias, com esta cianotoxina (Pípole *et al.* 2011).

De acordo com os autores Araz *et al.* (2010) a saxitoxina é considerada arma química, comparável ao gás mostarda, ao gás sarin e à ricina.

1.3.1.3.2 Anatoxina-a

A anatoxina-a é um alcaloide tropânico e foi a primeira toxina de cianobactérias a ser química e funcionalmente definida (**Tabela 1**). É produzida principalmente por espécies de *Dolichospermum* (*Anabaena*), mas também pode ser sintetizada por *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Planktothrix*. Possui apenas uma variante, a homoanatoxina, resultante da metilação da anatoxina-a (Van Apeldoorn *et al.* 2007, Merrell *et al.* 2013).

Em mamíferos, quando ingerida, esta toxina induz paralisia, pois liga-se irreversivelmente aos receptores nicotínicos da acetilcolina, e por não ser degradada pela acetilcolinesterase, impede a despolarização pós-sináptica, fazendo com que os canais de sódio permaneçam abertos e as células, permanentemente estimuladas (Zanchett & Oliveira-Filho 2013, Merrell *et al.* 2013).

Os sinais de intoxicação por anatoxina-a, observados em animais selvagens e domésticos são: desequilíbrio, fasciculação muscular, respiração ofegante e convulsões. A morte ocorre por parada respiratória, em período que varia de poucos minutos a algumas horas, dependendo da dosagem. Os sinais clínicos em camundongos e ratos de laboratório são paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsões e morte (Carmichael 1994, Sant'Anna *et al.* 2006, Spinosa *et al.* 2008).

1.3.1.3.3 Anatoxina-a(s)

A anatoxina-a(s) - o metilfosfato de N-Hidroxiguanidina - é um organo-fosforado natural raro (**Tabela 1**), acumulando também a função alcaloide. É um potente inibidor da atividade da enzima acetilcolinesterase, pois a ela se liga irreversivelmente, impedindo que hidrólise o neurotransmissor acetilcolina. Como consequência, a acetilcolina permanece ligada aos seus receptores, estimulando continuamente os músculos: os responsáveis pela morte do animal intoxicado são a paralisia dos músculos respiratórios e a hipóxia do cérebro (Patocka *et al.* 2011).

Esta cianotoxina tem ação análoga a dos inseticidas fosforados, causando também salivação intensa, donde o "s" que segue seu nome. Outros sinais observados durante as intoxicações por ela causados foram ataxia, diarreia, dispneia, tremores, lacrimejamento, fraqueza muscular e convulsões seguidas de morte (Carmichael 1994, Sant'Anna *et al.* 2006).

É produzida principalmente por espécies do gênero *Dolichospermum* (*Anabaena*) (Patocka *et al.* 2011).

1.3.1.3.4 BMAA

O BMAA (β -metilaminoalanina) (**Tabela 1**) é um aminoácido que existe em forma livre ou ligado a proteínas. Foi encontrado, inicialmente, em raízes e sementes de cicadáceas, porém sabe-se, hoje, que é também produzido por diversas espécies de cianobactérias, em todo o mundo. Por esta razão, acredita-se que possa estar difundido nos ecossistemas de água doce e marinha, na própria água e acumulado em níveis tróficos superiores, na chamada biomagnificação (acúmulo crescente de moléculas bioativas, muitas vezes deletérias, através

dos níveis tróficos de uma cadeia alimentar) (Cox *et al.* 2003, Olvera-Ramírez *et al.* 2010, Mondo *et al.* 2012).

Existem indícios de que a exposição ao BMAA pode levar a danos no cérebro e no sistema nervoso central de humanos e de animais, determinando o surgimento de severas doenças neurodegenerativas, em indivíduos vulneráveis. Como foi detectado em peixes, camarões e mariscos pode ser considerado um fator ambiental de risco, para a população (Cox *et al.* 2003, Olvera-Ramírez *et al.* 2010, Mondo *et al.* 2012).

Estudos recentes mostraram que, em humanos, a neurotoxicidade deste aminoácido está associada a distúrbios no sistema motor, presentes em doenças neurodegenerativas fatais como Parkinsonismo, Mal de Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica. O BMAA incorporar-se-ia a proteínas neuronais, levando a alterações conformacionais e ao acúmulo dessas moléculas (Newcombe *et al.* 2010, Kormas & Lympelopoulou 2013). Dentro dos tecidos do cérebro, a liberação lenta de BMAA livre pode causar danos recorrentes nos neurônios motores e em outras células, no decorrer de anos ou até mesmo de décadas (Pablo *et al.* 2009).

Em mamíferos, o BMAA aderido ao tecido cerebral atua como um agonista de receptores de glutamato, aumentando a concentração intracelular de cálcio nos neurônios e induzindo a atividade neuronal por hiperexcitação (Banack *et al.* 2007, Purdie *et al.* 2009).

1.3.1.4 Dermatotoxinas

1.3.1.4.1 Lipopolissacarídeo

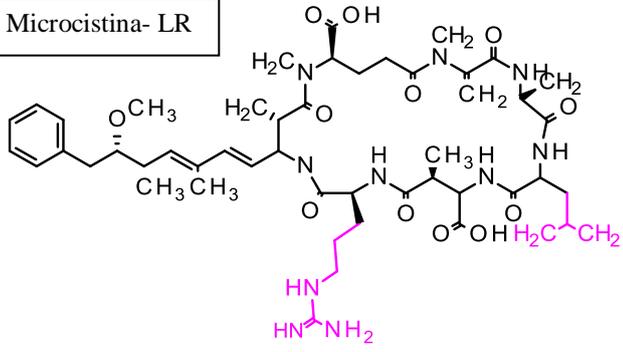
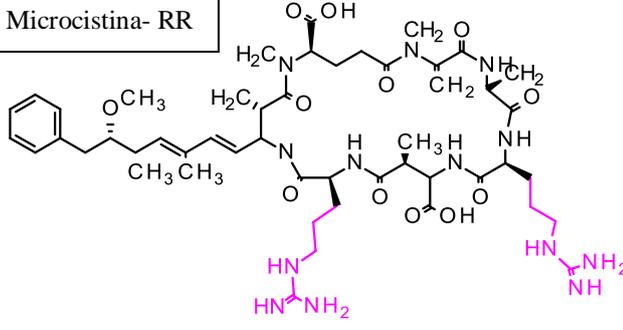
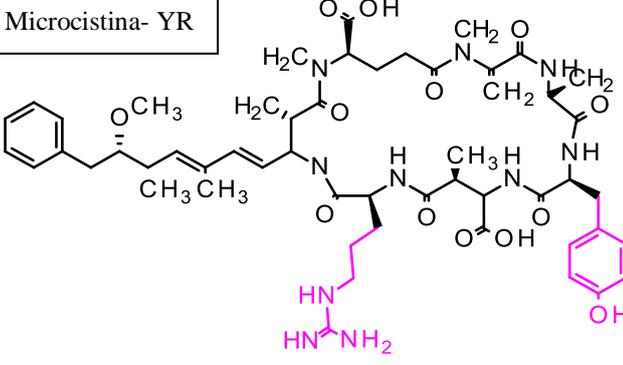
Os lipopolissacarídeos (LPS) são componentes da parede celular de bactérias gram-negativas e de todas as cianobactérias e formam complexos com proteínas e fosfolipídios (**Tabela 1**). Estruturalmente variáveis, são polímeros complexos compostos por quatro regiões formadas por cadeias de carboidratos (normalmente hexoses) de comprimento variável e de lipídeos (ácidos graxos de cadeias C₁₄ a C₁₈) (Chorus & Bartram 1999, Stewart *et al.* 2006).

Por contato, podem causar irritação nos olhos, conjuntivite e alergias na pele de humanos e animais e, por ingestão, podem ser responsáveis por gastroenterites, doenças

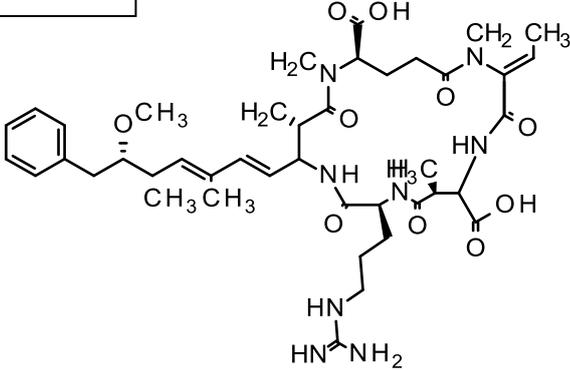
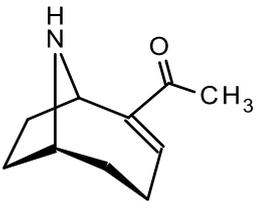
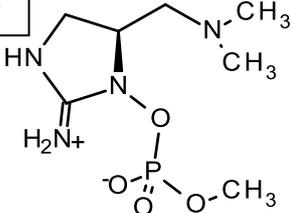
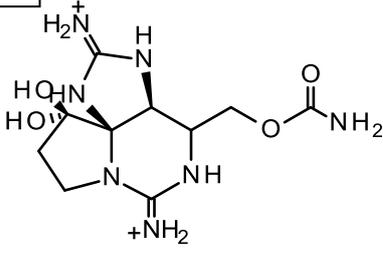
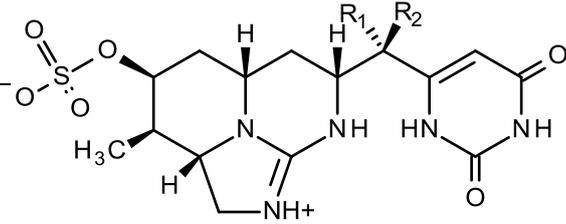
respiratórias, dores de cabeça e febre (Chorus & Bartram 1999, Codd 2000, Hoehn & Long 2004). Os LPS são pirogênicos e tóxicos provocando trombocitopenia, neutropenia, níveis anormais de glicose e mudanças metabólicas como acidose e alcalose (Stewart *et al.* 2006, Bláha *et al.* 2009).

Entretanto, os LPS cianobacterianos apresentam baixa toxicidade, quando comparados ao LPS bacterianos: os LPS da *M. aeruginosa* (strain NRC-1) mostraram-se dez vezes menos tóxicos do que os LPS da *Salmonella abortus equi*, em estudo conduzido em mamíferos (Wiegand & Pflugmacher 2005).

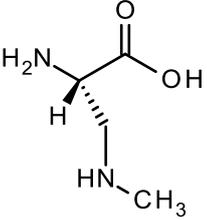
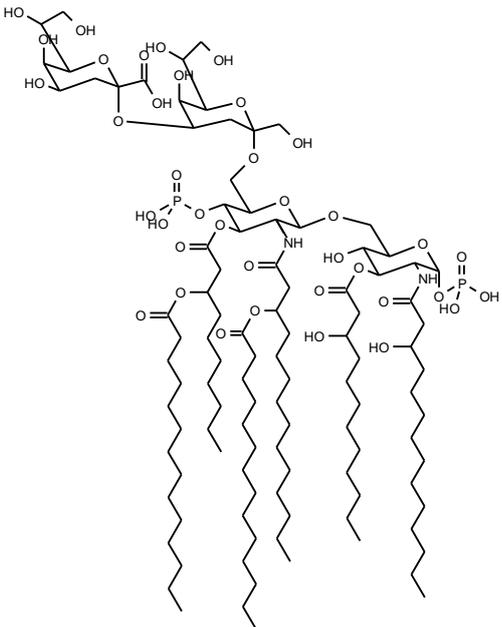
Tabela 1. Estruturas das principais cianotoxinas

Espécies produtoras	Estrutura química	Referências
<p><i>Microcystis aeruginosa</i>, <i>Dolichospermum</i> (<i>Anabaena</i>) sp.</p>	<p>Microcistina- LR</p> 	<p>Chorus & Bartram 1999</p>
<p><i>Microcystis protocystis</i>, <i>Oscillatoria agardhii</i></p>	<p>Microcistina- RR</p> 	<p>Luukkainen <i>et al.</i> 1993, Ferreira <i>et al.</i> 2009</p>
<p><i>Microcystis aeruginosa</i>, <i>Microcystis viridis</i></p>	<p>Microcistina- YR</p> 	<p>Kameyama <i>et al.</i> 2004</p>

Continuação

<i>Nodularia spumigena</i>	<div data-bbox="485 271 663 331" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Nodularina</div> 	Chen <i>et al.</i> 2013
<i>Dolichospermum flosaquae</i> (<i>Anabaena flosaquae</i>)	<div data-bbox="485 719 663 779" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Anatoxina-a</div> 	Carmichael <i>et al.</i> 1979
<i>Dolichospermum flosaquae</i> (<i>Anabaena flosaquae</i>)	<div data-bbox="485 992 699 1052" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Anatoxina-a(S)</div> 	Mahmood & Carmichael 1986
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	<div data-bbox="485 1279 663 1339" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Saxitoxina</div> 	Carneiro <i>et al.</i> 2013
<i>Umezakia natans</i>	<div data-bbox="485 1626 762 1686" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Cilindrospermopsina</div> 	Harada <i>et al.</i> 1994

Continuação

<p>95% das espécies de cianobactérias</p>	<p>BMAA</p> 	<p>Holtcamp 2012</p>
<p>Todas as espécies de cianobactérias</p>	<p>Lipopolissacarídeos</p> 	<p>Stewart <i>et al.</i> 2006</p>

1.4 Mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas em Cyanobacteria

Em um ambiente natural, para sobreviver, as cianobactérias (como muito outros micro-organismos), têm que se adaptar às mudanças ambientais, interagir com competidores e resistir ao impacto da ação de outros organismos aquáticos como vírus, bactérias, fungos, zooplâncton e peixes. Como decorrência disso, os organismos que lograram êxito foram os que tiveram os fenótipos e genótipos determinados pela indução ambiental e pelas mutações, pressões que também moldaram suas plasticidades adaptativas (Legrand *et al.* 2003, West-Eberhard 2005, Kussel & Leibler 2005, Leão *et al.* 2009).

A plasticidade adaptativa, segundo West-Eberhard (2005), Kussel & Leibler (2005) e Agrawal (2001), reflete respostas morfológicas, bioquímicas e genéticas a eventos ocorridos durante a evolução de um organismo, sejam eles mutações ou o surgimento de novos fatores

ambientais. E, ainda segundo esses autores, o envolvimento dos fatores ambientais no processo evolutivo dos organismos teria sido maior do que o das mutações.

De um modo mais amplo, esta plasticidade é comum aos organismos procariontes: em *Bacteria*, a deleção e a aquisição de genes - observados na emergência e evolução de patógenos e simbioses - são, claramente, respostas a mudanças ambientais. Nesses eventos, as respostas adaptativas morfológicas antecedem as acomodações genéticas, que podem, ou não, tornarem-se permanentes (Ochman & Moran 2001, Kettler *et al.*, 2007, Andersson & Andersson 1999, Hadly *et al.* 2004).

O conjunto de características que permite a uma população expressar diferentes fenótipos para ajustar-se a mudanças ambientais bióticas e abióticas é denominado plasticidade fenotípica e, como visto, tem base genética e reflete a sua história evolutiva (Agrawal 2001, West-Eberhard 2005, Kettler *et al.* 2007).

Em Cyanobacteria, *Microcystis* forma um "grupo complexo" genética e morfologicamente incoerente, em que coexistem múltiplos ecotipos, adaptáveis a condições ambientais diversas (Yoshida *et al.* 2008).

Entretanto, quando uma população destes micro-organismos é transferida para um ambiente estático, determinadas características não são mais usadas e podem ser perdidas, devido à degradação mutacional (Masel *et al.* 2007). Esta perda depende, além de outros fatores, do tempo de permanência nesse ambiente estático e pode ser acelerada, se o custo energético para manter esta habilidade for alto. (Masel *et al.* 2007, Vilaprinyo *et al.* 2010).

Este fenômeno tem sido observado em Cyanobacteria, em cepas mantidas em condições de cultivo. As mudanças mais usuais são a desagregação das colônias, perda de mucilagem e de aerótopos e também da capacidade de produzir determinados metabolitos (Otsuka *et al.* 2000, Day *et al.* 2005, Day & Brand 2005, Zhang *et al.* 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo do presente trabalho foi a caracterização química e toxicológica (exposição prolongada) da fração ativa presente no extrato em ácido acético 0,1 M da cepa *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082 (Pseudanabaenaceae, Pseudanabaenales).

2.2 Objetivos Específicos

1. Cultivo e extração, com ácido acético 0,1 M, de biomassa obtida da cepa *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082, seguidos pelo fracionamento, desse extrato.

2. Avaliação do ganho de peso, do consumo de ração e de água, do peso relativo dos órgãos: fígado, rim, pulmão, baço, timo, dos achados anatomopatológicos de camundongos expostos à ingestão prolongada do extrato de *P.galeata*.

3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DELINEAMENTO DO PROJETO

Para o delineamento das etapas a serem seguidas, neste estudo, foram realizados ensaios prévios, químicos e toxicológicos. O solvente adequado para a extração da toxina já havia sido determinado (Cunha *et al.* 2010, Pípole *et al.* 2010).

Esses ensaios preliminares constaram de: 1) pesquisa das cianotoxinas conhecidas em Cromatografia Planar e de cianotoxinas desconhecidas, por ensaio em camundongo, realizado segundo o protocolo da Organização Mundial da Saúde (OMS), por via intraperitoneal (Harada *et al.* 1999) e 2) pré-fracionamento bioguiado do extrato, em cartucho de sílica octadecilsilanizada.

Para tanto, a biomassa uniespecífica da cepa *P. galeata* CCIBt 3082 obtida em cultura foi submetida à extração assistida por ultrassom, com ácido acético 0,1 M, liofilizada e empregada nos testes cromatográficos (CP); no pré-fracionamento bioguiado, a fração tóxica eluiu com a fase móvel mais polar, o ácido acético 0,1 M.

Nos testes toxicológicos em camundongo, houve reprodução dos resultados obtidos durante a efetuação da triagem da Coleção de Culturas de Cianobactérias do Instituto de Botânica (Arjonilla-de-Mattos & Carvalho, 2009), ou seja, também foram observadas lesões com aspecto de cistos, no fígado de alguns dos animais que receberam o extrato (**Figura 2**)

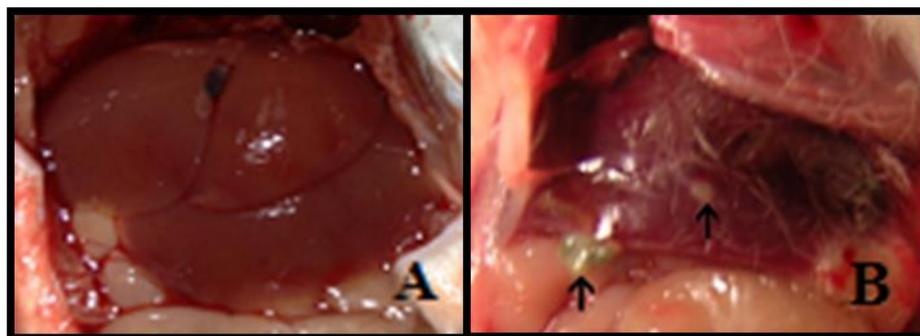


Figura 2. Imagem do fígado de camundongo controle (A) e tratado (B) com o extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082, por via intraperitoneal, dose única de 1.000 mg kg⁻¹. As setas mostradas em B indicam as lesões com aspecto de cistos.

Em geral, o rendimento em biomassa, nos cultivos de cepas de cianobactérias não é alto, motivo pelo qual, é necessário obtê-la em “batches”. Assim, a biomassa necessária para

o desenvolvimento do estudo de *P. galeata* CCIBt 3082 foi obtida em dois “batches” distintos.

O primeiro deles foi retirado do cultivo no dia 21 de janeiro de 2012 e o segundo, no dia 15 de maio de 2012, sendo, portanto, processados em separado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 O organismo

Para a realização deste estudo, foi submetida a ensaios a linhagem da espécie de *Pseudanabaena galeata* CCIBt 3082, coletada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, em São Paulo, no dia 01/11/1996. Esta cepa pertence à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt). No Banco de Culturas, as linhagens são mantidas em triplicata, sendo observados os seguintes protocolos de manutenção: os meios de cultura são esterilizados em autoclave vertical, a 121 °C, 1 atm, durante 30 minutos e a repicagem é feita em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizado sob luz UV, durante 30 minutos.

4.1.1 O meio de cultura

O meio de cultura empregado para o cultivo e manutenção da cianobactéria *P. galeata* foi o BG-11, pois é o que proporciona as condições nutricionais adequadas para o desenvolvimento esta espécie (Rippka *et al.* 1979, Jacinavicius *et al.* 2012).

O meio de cultura foi preparado em duas etapas:

1. As soluções-estoque (**Tabelas 2 e 3**) são preparadas, acondicionadas em frascos plásticos e armazenadas em freezer, a – 20 °C, até o uso.
2. Quando necessário, a solução é descongelada, diluída e empregada imediatamente.

Tabela 2. Composição e quantidade das soluções-estoques

NUTRIENTES – Soluções-estoque	Quantidade (g)
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,1000
Citrato férrico amoniacal (C ₆ H ₈ O ₇ x Fe ³⁺ + yNH ₃)	0,6000
Solução de metais traços *	(*)
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	150,0000
Fosfato ácido dipotássio trihidratado (K ₂ HPO ₄ + 3H ₂ O)	4,0000
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ + 7H ₂ O)	7,5000
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ + 2H ₂ O)	3,6000
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	2,0000
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ + H ₂ O)	0,6000

Tabela 3. Composição dos traços de metais (*)

Soluções-estoque	Quantidade (g)
H ₃ BO ₃	2,8600
MnCl ₂ + 4H ₂ O	1,8100
ZnSO ₄ + 7H ₂ O	0,2220
NaMoO ₄	0,3900
CuSO ₄ + 5H ₂ O	0,0790
Co(NO ₃) ₂ + 6H ₂ O	0,0494

As quantidades de sais determinadas nas tabelas 1 e 2 são as necessárias para preparar 1.000 mL de solução-estoque.

Para evitar que o sal de ferro precipite, os sais devem ser adicionados à água deionizada, sob agitação, na sequência em que estão listados. O pH da solução final deve ser ajustado para 7,4.

4.2 Cultivo e multiplicação da cepa

A cepa em estudo - *P. galeata* CCIBt 3082- foi cultivada em dois “batches” distintos, sob as mesmas condições constantes e controladas: meio BG-11, temperatura 22 ± 1 °C, irradiância $15 - 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e período 14: 10 h claro:escuro. Segundo o protocolo, 5 mL de inóculo foram transferidos diretamente da amostra do banco para erlenmeyer com 50 mL de meio esterilizado. Após um período de 1 a 2 semanas de crescimento, sob agitação constante de 70 rpm, os 50 mL foram transferidos para frasco de cultivo com 500 mL de meio, mantidos também sob agitação de 70 rpm. Novamente após duas semanas, tendo os organismos atingido seu desenvolvimento ótimo, a biomassa resultante foi transferida para frasco contendo 5.000 mL de meio de cultura e submetida à aeração constante, por um período de 1 a 2 semanas, ou seja, até que as culturas atingissem o final da fase exponencial de crescimento (Azevedo & Sant'Anna 2003).

4.3 Obtenção dos extratos cianobacterianos

As biomassas obtidas nos cultivos (1º e 2º “batches”) de *P. galeata* CCIBt 3082 foram liofilizadas, pesadas e submetidas à extração com ácido acético 0,1 M (4x), por exposição a ultrassom (4x 30 seg., 100 W), seguida por centrifugação (1045x g, por 50 minutos, 4x). Os sobrenadantes foram reunidos, liofilizados e pesados (Pyo & Shin 2002; Harada *et al.* 1999).

O extrato do primeiro “batch” de *P. galeata* CCIBt 3082, após a liofilização, foi direcionado para os estudos biológicos e o extrato do segundo “batch” foi dividido, sendo parte direcionada para os estudos biológicos e parte, para os estudos químicos.

4.4 Estudos químicos

4.4.1 Prospecção de cianotoxinas conhecidas (microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a e β -metilaminoalanina) no extrato em ácido acético 0,1 M, de *P. galeata* CCIBt 3082

A pesquisa química de cianotoxinas foi realizada por Cromatografia Planar (CP).

4.4.1.1 Pesquisa cromatográfica de microcistinas (Harada *et al.* 1988, 1999)

Para esta pesquisa, 1 μ g do extrato liofilizado foi dissolvido em água deionizada e aplicado a placas de gel de Sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF₂₅₄, E.Merck), juntamente com o padrão de microcistina-LR (Sigma-Aldrich®, 95% de pureza). O cromatograma foi desenvolvido com o solvente clorofórmio/metanol/água, 64:36:8, v/v/v (Poon *et al.*, 1987; Harada *et al.*, 1991), em atmosfera equilibrada pela colocação do solvente 20 minutos antes das placas. Após a corrida cromatográfica, a placa foi seca em correntes de ar, avaliada sob luz ultravioleta (λ 254nm e 365 nm) e em seguida, derivatizada com tetrametilbenzidina (TMB) (Pelander *et al.* 2000).

Para essa derivatização, a placa seca ficou exposta, por 20 minutos, ao gás cloro, gerado pela mistura de volumes iguais de HCl 10% e solução de permanganato de potássio 5%, aeradas por 15 segundos e nebulizadas com TMB.

- Reagente TMB para microcistinas: 0,8 mg de TMB foi dissolvido em 1,5 mL de ácido acético glacial, ao qual foram acrescentados 25 mL de água deionizada e 50 mg de iodeto de potássio.

4.4.1.2 Pesquisa de saxitoxinas (Buckley *et al.* 1976)

Para essa análise, 1 μ g de extrato liofilizado foi dissolvido em água deionizada e aplicado a placa de gel de Sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF₂₅₄, E.Merck). O cromatograma foi desenvolvido no mesmo sistema de eluentes utilizado para a pesquisa de microcistinas. A placa foi seca em corrente de ar, por uma hora, nebulizada com peróxido de

hidrogênio 1%, aquecida à 100 °C por 10 min e observada sob luz ultra violeta, em comprimento de onda de 365 nm. As saxitoxinas são visíveis como manchas fluorescentes.

4.4.1.3 Pesquisa de anatoxina-a (Ojanpera *et al.*1991)

Para esta pesquisa, 10 µg de extrato liofilizado foram dissolvidos em água deionizada e tiveram seu pH ajustado para 11-11,5, com hidróxido de sódio 1 N, após o que foram extraídos em funil de separação, com 10 mL de diclorometano/isopropanol 95:5, (v/v). As fases foram separadas por centrifugação. A fase aquosa foi descartada, a fase orgânica foi evaporada e o resíduo, reconstituído com 15 µL de clorofórmio, que foram aplicados integralmente à placa cromatográfica de gel de sílica 60 F₂₅₄. Sobre este material aplicado, foram aplicados 2 µL de solução 0,5 M de bicarbonato de sódio. Após secagem sob corrente de ar, sobre a mesma mancha foram aplicados 3 µL de solução aquosa de “Fast Black K Salt” (FBK) 1%. O cromatograma foi desenvolvido em tolueno/metanol (90:10) e após secagem em corrente de ar, foi avaliado para a presença de mancha alaranjada, em R_f 0,42, relativa ao derivado de anatoxina-a.

4.4.1.4 Pesquisa do aminoácido β-metilaminoalanina, reagente nº 207 (Merck 1971e)

Para essa análise, 1 µg de extrato liofilizado foi dissolvido em água deionizada e aplicado a placa de papel Watman N° 3, juntamente com o padrão de β-metilaminoalanina (Sigma-Aldrich®) . O cromatograma foi desenvolvido em butanol/ácido acético/água 5:4:1 (v/v/v) e a seguir, foi seco em corrente de ar. Após a secagem, o cromatograma foi derivatizado com ninidrina e aquecido a 110 °C, por 15 minutos.

4.4.2 Fracionamento bioguiado do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082

Para o fracionamento, 3 g do extrato liofilizado de *P. galeata* CCIBt 3082 foram divididos em porções de 100 mg, que foram, uma a uma, submetidas a fracionamento, em

cartucho de sílica octadecilsilanizada (Waters Sep-Pak[®] Vac 12 cc C₁₈ - 10 g). Cada uma das amostras de 100 mg foi diluída em 1 mL de ácido acético 0,1 M e aplicada ao cartucho, previamente ativado com 125 mL de metanol 100%, seguido de 125 mL de ácido acético 0,1 M. O fracionamento foi conduzido a vácuo e as frações eluídas com a seguinte sequência de solventes: 75 mL de ácido acético 0,1 M 100%; 75 mL de metanol/ ácido acético 0,1 M 80:20, (v/v); 75 mL de ácido acético 0,1 M/metanol 50:50, (v/v); 75 mL de ácido acético 0,1 M/metanol 10:90 (v/v) e 75 mL de metanol 100%.

A fração eluída em ácido acético 0,1 M 100% foi coletada em 03 subfrações de 25 mL cada, denominadas **1.a**, **1.b** e **1.c**, respectivamente. Cada uma das subfrações foi submetida a bioensaio de toxicidade.

Após o fracionamento de cada porção, o cartucho era recuperado pela eluição da sequência de solventes: 125 mL de metanol, 125 mL de clorofórmio e 125 mL de hexano e reutilizado. As frações e alíquotas semelhantes, eluídas nos diversos fracionamentos, foram coletadas no mesmo frasco. As frações em ácido acético 0,1 M foram liofilizadas e pesadas, e as demais foram concentradas a vácuo, para eliminação do solvente orgânico e liofilizadas a seguir.

4.4.3 Análise do extrato, da fração 1 e da subfração 1.a de *P. galeata* CCIBt 3082 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato, a fração 1 e a subfração **1.a**, em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, eluídas no fracionamento, em cartucho de sílica octadecilsilanizada, com o solvente ácido acético 0,1 M, foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nas seguintes condições:

- Cromatógrafo Líquido Dionex, operando com software Chromeleon versão 6.60 e equipado com bomba automática P680, detector UVD340U e coluna analítica C₁₈ ZORBAX ODS, (5 x 250 mm), 5 µm;
- Solvente A – Água/Ácido acético 0,1%;
- Solvente B – Acetonitria/ ácido acético 0,1%;

- Gradiente: de 0 a 11 min., 95% do solvente A; até 60 min., 100% do solvente B; de 60 a 70 minutos, 5% do solvente B, condição que se mantém até o final da corrida cromatográfica (75 minutos); fluxo: 1 mL min⁻¹; detector UV-PDA; comprimentos de onda: $\lambda = 220, 250, 400$ e 500nm.

4.4.4 Análise do extrato e da subfração 1.a resultante do fracionamento do extrato de *P. galeata* CCIBt 3082, por Cromatografia Planar, para pesquisa de metabolitos pertencentes às classes químicas dos aminoácidos, amins, peptídeos, alcaloides e terpenoides

Nessas análises, foram utilizadas placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF₂₅₄, E.Merck), (uma para cada teste cromatográfico) às quais foram aplicadas, manualmente, e com auxílio de capilar, amostras de 100 µg da fração e da subfração **1.a** individualmente.

Foram empregadas, entre outras, as seguintes fases móveis: a) clorofórmio/metanol/água, 64:36:8 (v/v/v); b) butanol/ácido acético/água, 12:03:05 (v/v/v) e c) piridina/acetato de etila/ácido acético /água, 75:25:15:30 (v/v/v/v) (Poon *et al.* 1987, Harada *et al.* 1999).

Os cromatogramas foram desenvolvidos em atmosfera equilibrada e ao término de cada corrida cromatográfica, as placas foram secas em capela, em corrente de ar e analisadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda λ 254 e 365 nm. A seguir, cada placa foi derivatizada com um dos seguintes reagentes.

4.4.4.1 Ninidrina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos e amins (grupo N-H), n° 207 (Merck 1971e)

Preparo das soluções A e B de ninidrina. Solução A: 0,3 mg de ninidrina dissolvido em 100 mL de n-butanol, acrescidos de 3 mL de ácido acético glacial. Solução B: 0,2 g de ninidrina dissolvido em 100 mL de etanol 98%. Imediatamente antes da derivatização, A e B foram misturados, na proporção 1:1 e nebulizados sobre o cromatograma desenvolvido e seco. A placa nebulizada foi aquecida a 110 °C, por 15 minutos.

4.4.4.2 Vanilina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos especiais e aminas (Grupo N-H), reagente nº 328 (Merck 1971g)

- Solução A: preparar uma solução de vanilina 2% em 2-propanol;
- Solução B: preparar uma solução de hidróxido de potássio 1 %, em etanol.

O cromatograma foi nebulizado com a solução A e aquecido por 10 min., a 110 °C. Se presentes, alguns aminoácidos (ornitina e lisina) tornam-se fluorescentes, sob luz ultravioleta de comprimento longo.

A seguir, o mesmo cromatograma foi nebulizado com a solução B e aquecido, em condição semelhante. Se presentes, outros aminoácidos, como a glicina, tornam-se coloridos.

4.4.4.3 Anisaldeído, para pesquisa cromatográfica de terpenoides, nº 22 (Merck 1971a)

Preparo da solução de anisaldeído: 0,5 mL de anisaldeído dissolvido em 50 mL de ácido acético glacial e 1 mL de ácido sulfúrico. A placa cromatográfica desenvolvida e seca foi nebulizada com a solução de anisaldeído e aquecida a 120 °C, por 100-105 °C.

4.4.4.4 Detecção de substâncias orgânicas com Iodo, nº 160 (Merck 1971d)

O cromatograma previamente desenvolvido e seco foi colocado em câmara contendo cristais de iodo e retirado após 20 minutos, para observação.

4.4.4.5 Detecção de peptídeos (hidrólise, seguida de pesquisa de aminoácidos, por CP, com ninidrina (Bernardi *et al.* 2003)

Alíquotas de 4 mg da subfração **1.a**, resultante do fracionamento do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, foram colocadas em frascos de 10 mL e dissolvidos com ácido clorídrico 6 N. Os frascos foram hermeticamente fechados e colocados em estufa, a 110 ± 5 °C, onde permaneceram por 22 horas. Em seguida, os frascos foram resfriados a

temperatura ambiente, abertos e o ácido foi evaporado das amostras, em dessecador, na presença de 20 g de pastilhas de hidróxido de sódio, até eliminação completa do reagente de hidrólise. O tempo necessário para a total evaporação do ácido foi de 48 horas. Esta análise foi feita em triplicata.

Após a secagem, o hidrolisado foi dissolvido em 50 µl de água deionizada e aplicado à placa de papel Watman N° 3. O cromatograma foi desenvolvido em butanol/ácido acético/água 5:4:1 (v/v/v) e a seguir, foi seco em corrente de ar. Após a secagem, o cromatograma foi derivatizado com ninidrina e aquecido a 110 °C, por 15 minutos.

4.4.4.6 Reagente de Dragendorff , segundo Munier & Macheboeuf, para alcaloides, n° 131 (Merck 1971b)

O cromatograma desenvolvido e seco foi nebulizado com a solução-estoque do reagente.

- Solução A: dissolver 0,85 g de nitrato de bismuto III dissolvidos em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água deionizada.
- Solução B: dissolver 8 g de iodeto de potássio em 20 mL de água deionizada.
- Solução-estoque: misturar partes iguais de A e B. colocar em frasco escuro e manter em geladeira.
- Solução nebulizadora: Misturar 1 mL de solução-estoque com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água deionizada, imediatamente antes do uso.

4.4.4.7 Iodo - iodeto de potássio ácido para alcaloides, n° 162 (Merck 1971c)

Preparo da solução de iodo - iodeto de potássio ácido: dissolver 1 g de iodo ressublimado em 50 mL de água deionizada e adicionar 2 mL de ácido acético. Completar o volume para 100 mL, com água deionizada.

4.4.4.8 Iodeto de potássio platinado para alcaloides, reagente nº 246 (Merck 1971f)

Preparo da solução nebulizadora: adicionar 5 mL de solução de ácido hexacloroplátinico 5 % a 45 mL de solução aquosa de iodeto de potássio. Acrescentar 100 mL de água deionizada. Preparar imediatamente antes do uso.

4.5 Estudos biológicos

4.5.1 Ensaio *in vitro*

4.5.1.1 Ensaio bioautográfico para análise de potencial antifúngico do extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082 (Agripino *et al.* 2004)

O fungo *Cladosporium* sp. foi obtido a partir de uma matriz inicial, inoculado em placa de Petri em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), incubado por 12 dias em estufa, à temperatura de 28°C, após este período foi realizada extração de esporos, com solução de sais e glicose (6:1).

200 µg do extrato de *P.galeata* CCIBt 3082 foram submetidos à CP, como descrito anteriormente, e desenvolvido com a fase móvel clorofórmio/metanol/água, 64:36:8 (v/v/v). Após o desenvolvimento, o cromatograma foi seco e nebulizado com a solução de esporos e incubado em câmara úmida mantida em estufa a 28 °C, por 2 dias e analisado em seguida. Compostos inibidores formam zonas de inibição claras, contra o fundo escuro da placa cromatográfica.

4.5.1.2 Ensaio bioautográfico para avaliação da atividade antioxidante do extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082 (Hostetmann *et al.* 2003)

Para esta avaliação, 200 µg do extrato de *P.galeata* CCIBt 3082 foram submetidos à CP, desenvolvida com a fase móvel clorofórmio/metanol/água, 64:36:8 (v/v/v). Após o desenvolvimento, o cromatograma foi seco e nebulizado com solução metanólica (2 mg.mL⁻¹)

do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), que permite detectar substâncias com atividade antioxidante, em extratos vegetais. Essas substâncias aparecem como manchas amareladas sobre fundo violeta, após a derivatização.

4.5.1.3 Ensaio bioautográfico para avaliação de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, no extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082 (Rhee *et al.* 2001, Marston *et al.* 2002)

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, foram aplicados, em placa cromatográfica, 200 µg do extrato de *P.galeata* CCIBt 3082, como descrito anteriormente. Eserina foi empregada como controle positivo e clorofórmio/metanol/água, 64:36:8 (v/v/v), como fase móvel. Após o desenvolvimento, o cromatograma foi seco e nebulizado com a enzima acetilcolinesterase (6.66 mL), dissolvida previamente em tampão TRIS HCl (tris-hidroximetilaminometano) 0,05M (pH 7,8) e estabilizada pela adição de 150 µg de albumina de soro bovino. O cromatograma foi incubado a 37 °C, durante 20 minutos, após o que, foi nebulizado com solução 1:1 de acetato de 1-naftila, em etanol e de *Fast Blue salt*, em água. Os inibidores da acetilcolinesterase aparecem como halos claros, sobre fundo púrpura.

4.5.2 Ensaios “in vivo”

4.5.2.1 Animais

Para a realização dos ensaios toxicológicos, foram utilizados camundongos Swiss-Webster, machos, entre 30 a 50 dias de idade ou com peso entre 19 e 22 g. Esses animais eram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ/USP. No presente estudo, foram observados todos os procedimentos e normas éticas relativos ao uso de animais de laboratório, desta faculdade.

Para alojá-los, foram usadas caixas de plástico fosco, medindo 30x20x19 cm, dotadas de tampas metálicas. Em cada uma delas, eram colocados, no máximo, três animais. A temperatura e umidade ambientes foram mantidos constantes (21-24°C e 65-70%,

respectivamente) (controle por aparelho de ar condicionado central) assim como o ciclo noite:dia de 12:12 horas, cuja fase clara iniciava às 6:00 h.

Durante o experimento, os animais tiveram livre acesso à água e à ração balanceada para roedores. Também nos dias anteriores aos ensaios, os animais eram mantidos nessas condições.

Os experimentos com animais (camundongos) foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - FMVZ/USP, protocolo nº 3012/2013.

4.5.2.2 Ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via intraperitoneal, em camundongos

Os testes de toxicidade em camundongos, por via intraperitoneal, foram realizados em triplicata, seguindo método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (Harada *et al.* 1999). Este ensaio consiste na administração da amostra, por via intraperitoneal, em camundongos machos, com idade entre 30-50 dias, ou com peso corpóreo entre 19 e 22 g. A cada animal-teste, foram administrados 1.000 mg kg^{-1} do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, reconstituído com até 1 mL de água destilada. Os animais-controle receberam unicamente 1 mL de água destilada, pela mesma via. Os sinais de intoxicação e o tempo de sobrevivência (quando pertinente) foram anotados. Os animais foram observados por sete dias, após os quais foram eutanasiados e submetidos a exame “post-mortem”.

4.5.2.3 Ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via oral, em camundongos

Estes testes foram realizados em triplicata, em camundongos macho Swiss-Webster, com idade entre 30-50 dias, ou o peso entre 19 e 22 g. Cada um recebeu, por administração oral, 1.000 mg kg^{-1} do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, reconstituído com 1 mL de água filtrada. Os animais foram observados por sete dias, durante os quais todos os sinais de intoxicação foram anotados; após este período, foram eutanasiados e submetidos a exames “post mortem”. O grupo-controle foi submetido a procedimentos idênticos, porém receberam, por via oral, unicamente 1 mL de água filtrada.

4.5.2.4 Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀), por via oral, dose única, do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* – Protocolo nº 425 da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (Oecd 2008a)

Para o cálculo da Dose Letal Média (DL₅₀), foram utilizados camundongos machos de 30 - 50 dias de idade, ou com peso entre 19 e 22 g. Foram formados grupos de 03 animais, os quais receberam doses previamente determinadas do extrato de *P.galeata* CCIBt 3082, reconstituídas com água filtrada, por via oral, de acordo com o protocolo da OECD nº 425. O período de observação foi de 24 horas; a ocorrência, ou não, de morte dos animais determinou o tratamento de mais 03 animais, com dose maior ou menor.

As doses administradas do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, do segundo “batch”, foram de 175, 550, 1.750, 2.250, 3.250, 4.250 e 5.000 mg kg⁻¹.

4.5.2.5 Ensaio de toxicidade subcrônica, via oral (período de 28 dias)

Para esse ensaio, foram utilizado 4 grupos de 5 camundongos, com idade entre 30-50 dias ou peso entre 19 e 22 g, receberam, por via oral, doses pré-estabelecidas do extrato de *P.galeata* CCIBt 3082, reconstituídas com água filtrada, diariamente, sete dias por semana, durante 28 dias. Durante todo o período, todas as ocorrências ou alterações apresentadas pelos animais foram observadas e anotadas. Os grupos-controle receberam água filtrada pela mesma via, durante igual período (Oecd 2008b).

As doses administradas com extrato do primeiro “batch” foram de 1, 5 e 25 mg kg⁻¹. As doses administradas com extrato do segundo “batch” foram de 500, 1.000 e 1.500 mg kg⁻¹.

4.5.2.6 Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração

Os camundongos foram pesados antes do início dos tratamentos, para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. O consumo de água e ração, juntamente com o peso dos animais, foram mensurados dia sim, dia não, durante todo o período de tratamento, para a avaliação do ganho de peso e acerto da dose administrada (Oecd 2008b).

4.5.2.7 Observação das respostas fisiológicas à administração do extrato (Brito 1994)

Os animais foram observados, diariamente, logo após o tratamento por um período de 2-3 horas, para verificação da ocorrência de manifestações de sinais de intoxicação como: dificuldade de locomoção, alterações na pele, pelos e mucosas, piloereção, sialorréia, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, movimentos estereotipados, tremores, diarreia, letargia e coma.

4.5.2.8 Avaliação do peso relativo dos órgãos

Em cada um dos diversos tratamentos aplicados, ao final do período estipulado, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5,0 e 50 mg kg⁻¹, respectivamente) administradas por via intraperitoneal e submetidos à eutanásia, por decapitação em guilhotina. Imediatamente após esses procedimentos, os seguintes órgãos foram coletados e pesados: baço, fígado, rins, porções do intestino, timo e sistema nervoso central (SNC).

O baço foi dividido em duas partes, sendo uma delas e os demais órgãos, preservados em fenol 10% tamponado, para as avaliações histológicas.

4.5.2.9 Estudos histopatológicos

Os órgãos coletados e mantidos em formol 10% tamponado foram fixados em Bouin (ácido pícrico saturado/formol/ácido acético glacial, 75:25:5, v/v/v), por 24 h, após o que foram lavados em água corrente por uma hora e, na sequência, com álcool 70%, para a conservação do tecido.

Os tecidos fixados foram desidratados na seguinte bateria: álcool 95% (1 banho), álcool absoluto (3 banhos), xilol (2 banhos) e parafina a 60°C (3 banhos). Cada banho teve a duração de 1 hora. Os blocos resultantes foram cortados em micrótomos e corados com hematoxilina e eosina (H.E.), preparadas segundo o seguinte protocolo:

- Hematoxilina de Harris: dissolver 1 g de hematoxilina cristalizada, 20 g de sulfato de alumínio e amônio e 3 g de óxido de mercúrio, em 10 mL de álcool etílico 95%; adicionar 2-4 mL de ácido acético glacial e acrescentar água destilada, até completar o volume de 1.000 mL.
- Eosina de Putt: dissolver 1g de eosina e 0,5 g de dicromato de potássio, 10 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 10 mL de álcool etílico absoluto e 1 gota de ácido acético em 80 mL de água destilada.

As lâminas foram desparafinizadas empregando-se a técnica da sequência de banhos em xilol I, xilol II, xilol III, álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70%, tendo cada banho, a duração de 3 minutos. Após a desparafinização, os materiais foram lavados em água corrente, por cinco minutos, corados com hematoxilina, por 5 minutos e novamente lavados em água corrente, por 5 minutos. Seguiu-se a diferenciação com álcool etílico 70% (250 mL etanol + 1,25 mL ácido clorídrico) e a lavagem em água destilada, por 5 minutos.

Após esta lavagem, procedeu-se à contra-coloração com eosina, durante 1 a 2 minutos, seguida de desidratação, na bateria álcool 95%, álcool absoluto, xilol + álcool absoluto (1:1), xilol I, xilol II, xilol final e finalmente e da montagem das lâminas.

4.5.2.10 Avaliação da celularidade do baço

Para avaliação da celularidade do baço, o fragmento reservado após a divisão do órgão, foi prensado entre duas lâminas e lavado com 10 mL de solução gelada de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®, *Invitrogen cell culture*), em pH 7,4. As lâminas foram acondicionadas em gelo, até o momento da contagem, em câmara de Neubauer. Para a observação da viabilidade e para a contagem global das células nucleadas foi empregado o corante azul de tripan diluído 6x em PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

4.5.2.11 Avaliação global de células da medula óssea

As células da medula óssea foram retiradas da cavidade femoral (fêmur da para direita) de cada animal, após lavagem da mesma com 5,0 mL de solução gelada de RPMI-

1640 ajustada para o pH 7,4. As células foram acondicionadas em tubos de poliestireno e dispersas com auxílio de pipeta “Pasteur” até obtenção de uma suspensão celular homogênea. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de tripan, diluído 6x em PBS.

4.6 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* GraphPad InStat v 5.01 e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média com seu respectivo desvio-padrão.

Para a detecção das diferenças significantes entre os grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA, seguida do teste Dunnett.

4.7 Forma de análise dos resultados

Os resultados das cromatografias desenvolvidas por CLAE e detectadas por detector UVD340U foram apresentados na forma de cromatogramas e os dados obtidos, expressos em T_R (Tempo de retenção).

Os resultados dos testes (qualitativos) por cromatografia planar foram apresentados como imagem.

Os resultados dos estudos biológicos foram apresentados em gráficos, tabelas e fotomicrografias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O organismo

A amostra da Coleção de Culturas de Cianobactérias da cepa *P. galeata* CCIBt 3082 entrou em senescência, no início do ano de 2013. Foram feitas tentativas para recuperá-las, as quais, entretanto, resultaram infrutíferas.

5.2 Obtenção das biomassas e dos extratos cianobacterianos

Os respectivos rendimentos dos processos de obtenção das biomassas (primeiro e segundo “batches”) e dos extratos em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, liofilizados, estão na **tabela 4**.

Tabela 4. Rendimentos das biomassas e extratos em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082

<i>P. galeata</i> CCIBt 3082	Biomassas liofilizadas (g)	Extratos liofilizados (g)	Rendimentos (%)
1º “batch”	1,2478	0,6728	54,34%
2º “batch”	28,9781	24,7456	85,39%

5.3 Ensaios realizados com o extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata*, obtido do PRIMEIRO “BATCH”

5.3.1 Ensaio preliminar de toxicidade em camundongos, por via oral, dose única (1º “batch”)

Neste ensaio, o extrato foi administrado por via oral, em dose única de 1.000 mg.kg⁻¹, a camundongos. Os animais, em número de três, foram observados por 07 dias. O animal

controle recebeu água filtrada, pela mesma via. Os sinais de intoxicação apresentados pelos animais foram: cauda em Straube, coceira, ptose palpebral e hiperatividade intestinal. Esses parâmetros são relativos as respostas fisiológicas causadas por substâncias que afetam o Sistema Nervoso Central e Autônomo.

Na análise histopatológica, não foram detectadas lesões nos pulmões. No entanto foram observados: ocorrência de área necrótica e aumento dos espaçamentos dos sinusóides, no fígado, além da presença de hepatócitos com citoplasma claro, E os animais-controle não mostraram sinais de intoxicação ou qualquer lesão (**Figura 3**).

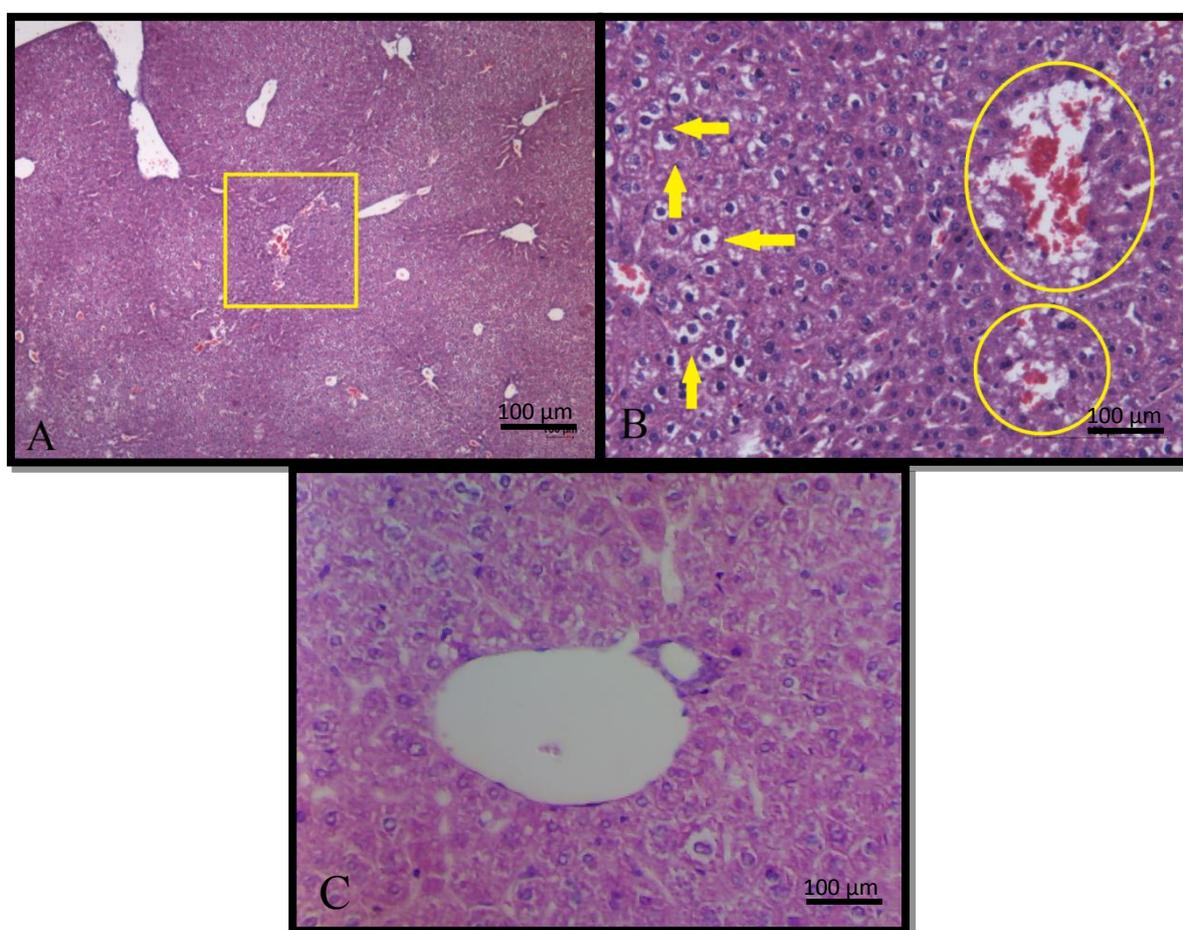


Figura 3. Fotomicrografias do fígado de camundongo tratado (A e B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, e fígado de camundongo controle (C). Em A e B as áreas em destaque mostram possível área de necrose, com aumento do espaçamento dos sinusóides. As setas indicam presença de hepatócitos com citoplasma claro, sugestivo de presença de vacúolos no seu interior. Aumentos: 400x (A) e 1.000x (B e C).

Além disso, foi observada hiperemia das veias centro-lobulares, que se encontravam muito próximas, em possível processo reparativo. O parênquima hepático apresentou certo grau de desorganização (**Figura 4**).

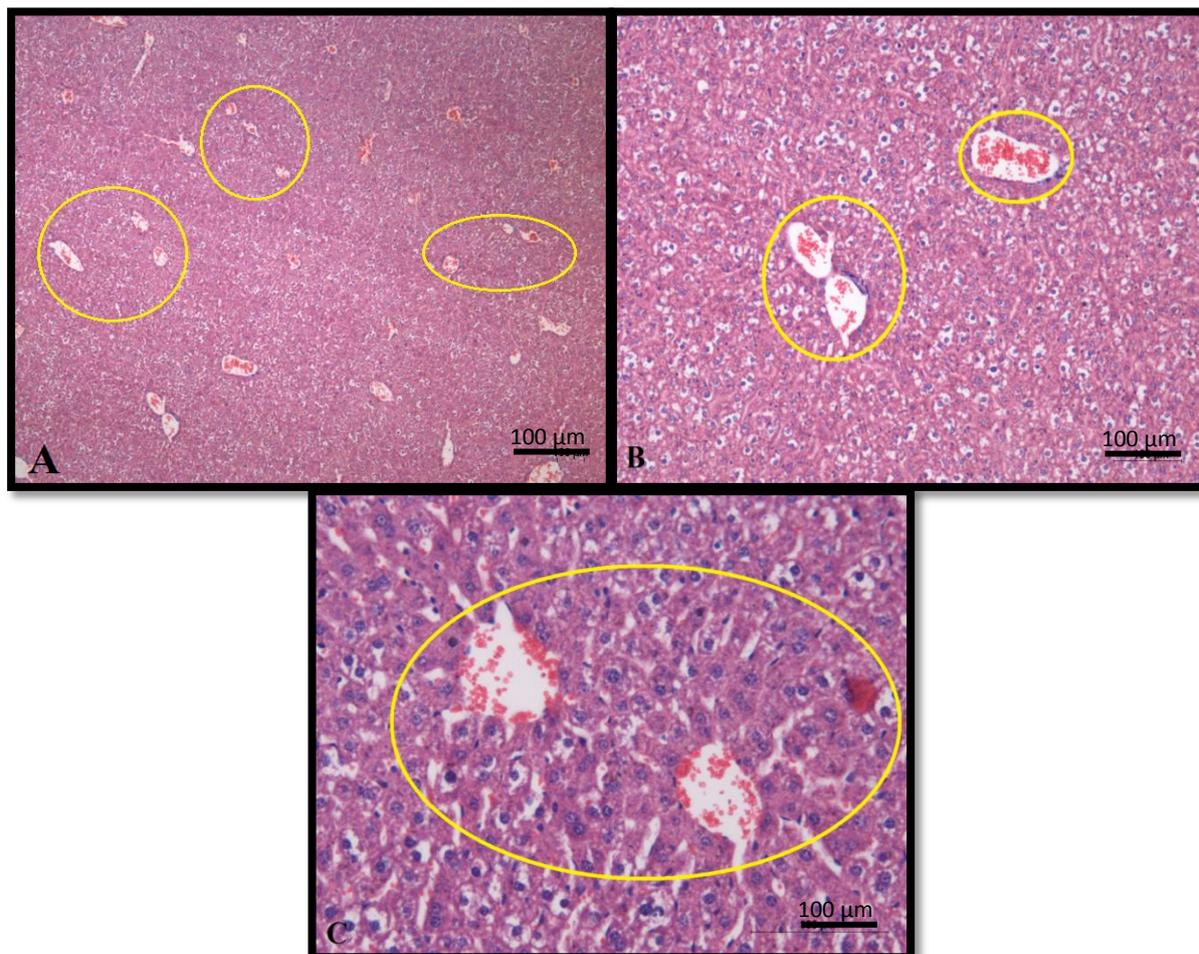


Figura 4. Fotomicrografias do fígado de camundongo tratado com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082. Em A, B e C os círculos indicam hiperemia das veias centrolobulares que se encontram muito próximas e parênquima hepático desorganizado. Aumentos: 40x, 100x e 1.000x respectivamente.

Nos rins, as células dos túbulos contorcidos apresentavam-se hipertróficas e a luz dos túbulos, expandida. E os rins dos animais-controle não mostraram sinais de intoxicação ou qualquer lesão (**Figura 5**).

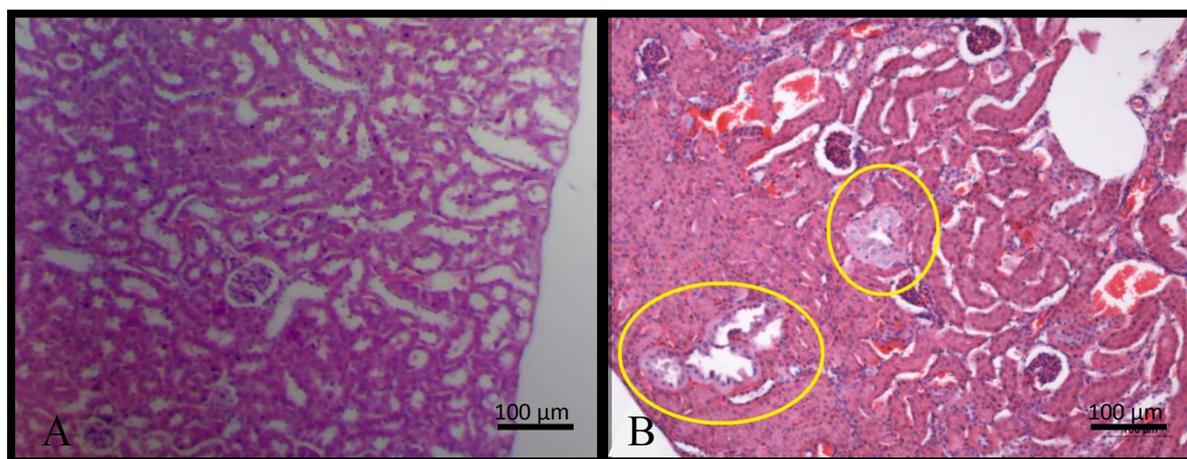


Figura 5. Fotomicrografias do rim de camundongo controle (A) e tratado (B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082. Em B, as áreas em destaque mostram aumento das células dos túbulos contorcidos (células hipertróficas) e luz expandida do túbulo. Aumento: 400x (A e B).

5.3.2 Ensaio de toxicidade subcrônica 28 dias, por via oral (1° “batch”)

Este teste foi realizado em camundongos, divididos em 4 grupos de 5 animais. As doses administradas por via oral foram de 1, 5 e 25 mg kg⁻¹ de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082; o grupo-controle recebeu, pela mesma via, água filtrada.

Os animais do grupo que recebeu a dose de 1 mg·kg⁻¹, no 1° dia do experimento, após a administração, apresentaram coceira intensa, que perdurou por cerca de 20 minutos. Todos os animais deste mesmo grupo apresentaram, logo após todas as administrações, fezes diarreicas.

Os animais que receberam 5 mg·kg⁻¹ e 25 mg·kg⁻¹, apresentaram micção intensa, no 5° dia de administração. Esse é um parâmetro de intoxicação por substâncias que afetam o Sistema Nervoso Autônomo (Brito 1994).

Nas avaliações do ganho de peso e do consumo de ração, os grupos dos animais tratados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si e também com relação ao grupo-controle (**Tabela 5 e 6**) (**Figura 6**). Entretanto, pode ser observada tendência de perda de peso nos animais tratados, fator muito importante, quando se trata da ingestão contínua de água contaminada com *P. galeata*, por animais de produção.

Tabela 5. Avaliação do ganho de peso total (em gramas) dos camundongos tratados ou não com as doses 1, 5 e 25 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082 via oral, durante 28 dias

Ganho de peso				
(g)				
	Controle ^a	1 mg kg ^a	5 mg kg ^a	25 mg kg ^a
Total	14,57 ± 1,89	9,86 ± 4,18	12,04 ± 3,61	12,56 ± 2,59

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

Tabela 6. Consumo médio diário e total de ração (em gramas) dos camundongos tratados ou não com as doses 1, 5 e 25 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Consumo (28 dias)				
(g)				
	Controle ^a	1 mg kg ^a	5 mg kg ^a	25 mg kg ^a
Médio	5,40 ± 0,62	4,67 ± 0,40	4,46 ± 0,28	4,85 ± 0,51
Total	151,18 ± 3,92	125,15 ± 1,38	124,98 ± 2,01	135,75 ± 2,74

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

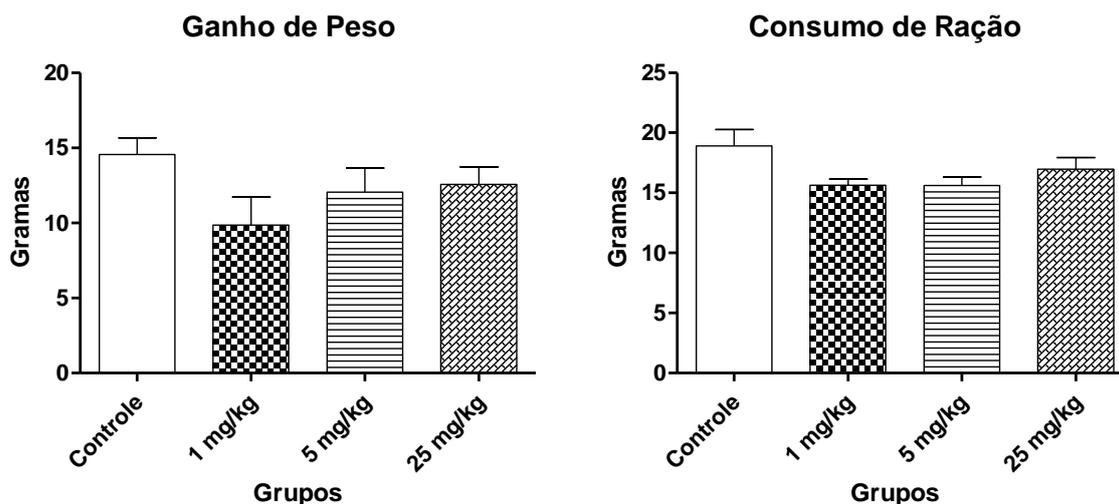


Figura 6. Ganho de peso total, consumo de ração (em gramas) de camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082, durante 28 dias, por via oral. Os dados são apresentados como média + desvio – padrão.

Também, na comparação entre os pesos dos órgãos (fígado, rim e pulmão) dos animais tratados e dos animais-controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 7 e Figura 7).

Tabela 7. Peso relativo dos órgãos – fígado, rim e pulmão (g/100g de peso vivo) dos camundongos tratados ou não com as doses 1, 5 e 25 mg kg⁻¹ de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Peso relativo dos órgãos				
(g/100g de Peso vivo)				
Órgão	Controle ^a	1 mg kg ^a	5 mg kg ^a	25 mg kg ^a
Fígado	5,47 ± 0,34	5,09 ± 0,96	4,78 ± 0,17	5,56 ± 0,68
Rim	0,78 ± 0,03	0,79 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,70 ± 0,05
Pulmão	0,39 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,42 ± 0,07

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

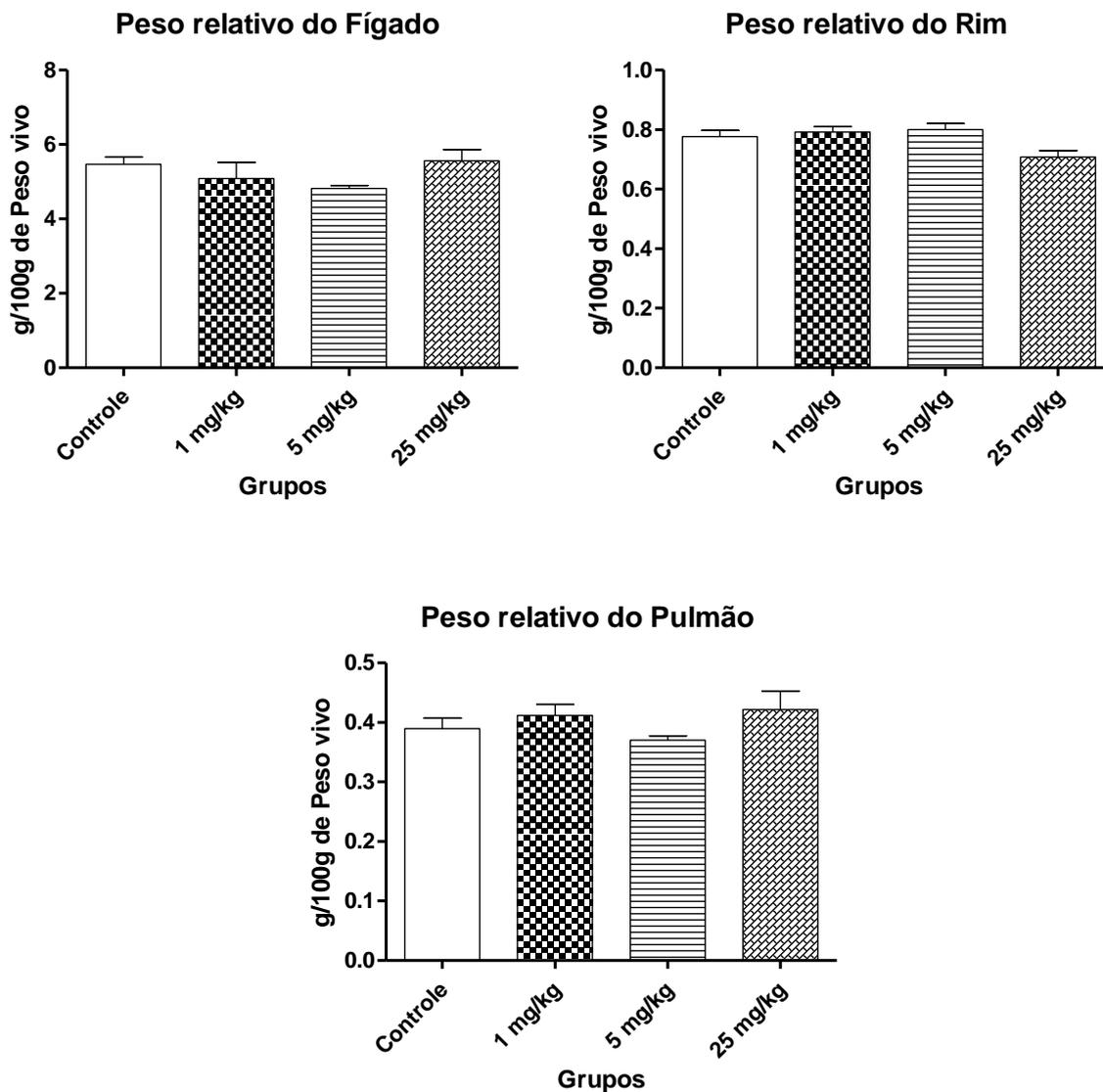


Figura 7. Peso relativo dos órgãos: fígado, rim e pulmão (g/100 g de peso vivo), de camundongo tratado ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082 por via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão.

No exame microscópico dos animais-controle e tratados, não foram encontradas alterações circulatórias, degenerativas nem inflamatórias nos seguintes órgãos: rim, fígado e pulmão.

As doses empregadas neste experimento (1, 5 e 25 mg·kg⁻¹) foram respectivamente 1.000, 200 e 40 vezes menores do que a dose utilizada no teste realizado por via oral, dose única de 1.000 mg·kg⁻¹. Esta divergência levanta a hipótese de que a ausência de lesões seja devido à baixa concentração do princípio ativo tóxico nas doses administradas.

5.4 Ensaios realizados com o extrato obtido da biomassa resultante do SEGUNDO “BATCH”

5.4.1 Estudos Químicos (2º “batch”)

5.4.1.1 Teste cromatográfico, por CP, para detecção das cianotoxinas conhecidas (microcistinas, saxitoxinas, antoxina-a e β -metilaminoalanina) (2º “batch”)

Foram negativos os resultados da pesquisa de cianotoxinas conhecidas (microcistinas, saxitoxinas, antoxina-a e β -metilaminoalanina) em *P. galeata* CCIBt 3082.

As espécies *P. mucicola*, *P. limnética* e *P. rutilus-viridis*. foram citadas como produtoras de microcistinas (Oudra *et al.* 2001; Teneva 2009, Kling *et al* 2012) assim como algumas espécies isoladas de corpos d’água, no Marrocos.

5.4.1.2 Fracionamento do extrato em ácido acético de *P. galeata* CCIBt 3082 (2º “batch”)

Após a separação, as frações eluídas do cartucho de sílica octadecilsilanizada (Waters Sep-Pak[®] Vac 12 cc C₁₈ - 10 g), com o gradiente de solventes: ácido acético 0.1 M (**Fração 1**); metanol/ ácido acético 0.1 M 80:20, (v/v) (**Fração 2**); ácido acético 0,1 M/metanol 50:50, (v/v) (**Fração 3**); ácido acético 0,1 M/metanol 10:90 (v/v) (**Fração 4**) e metanol 100% (**Fração 5**) foram liofilizadas e pesadas. A massa da **Fração 1**, que continha a substância tóxica, de acordo com experimentos realizados anteriormente (**Considerações sobre o delineamento do projeto**) foi liofilizada e pesada (1,8147 g). Esse material foi novamente submetido a fracionamento em cartucho de sílica octadecilsilanizada (Waters Sep-Pak[®] Vac 12 cc C₁₈ - 10 g), com o mesmo gradiente de solventes, porém a **Fração 1** foi coletada em 3 alíquotas distintas: as subfrações **1.a**, **1.b** e **1.c**. A subfração **1.a** foi liofilizada e pesada (0,9216 g). Isso porque, ainda de acordo com os estudos prévios da cepa, a subfração **1.a** é a que continha a(s) substância(s) tóxica(s).

5.4.1.3 Análise do extrato, da Fração 1 e da subfração 1.a por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (2º batch)

A sequência dos procedimentos de fracionamento do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082 foi acompanhada por CLAE. O cromatograma obtido do extrato está na **figura 8**, sendo que as condições cromatográficas foram enunciadas no item **4.4.3 do Material e Métodos**.

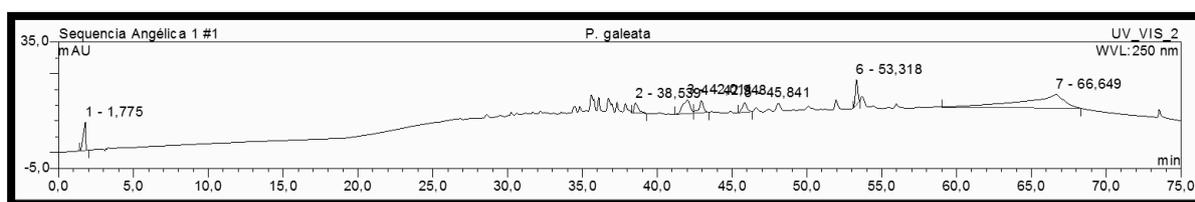


Figura 8. Cromatograma (CLAE) do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.

O cromatograma, desenvolvido nas mesmas condições, com a **Fração 1** do extrato de *P. galeata* está na **figura 9**.

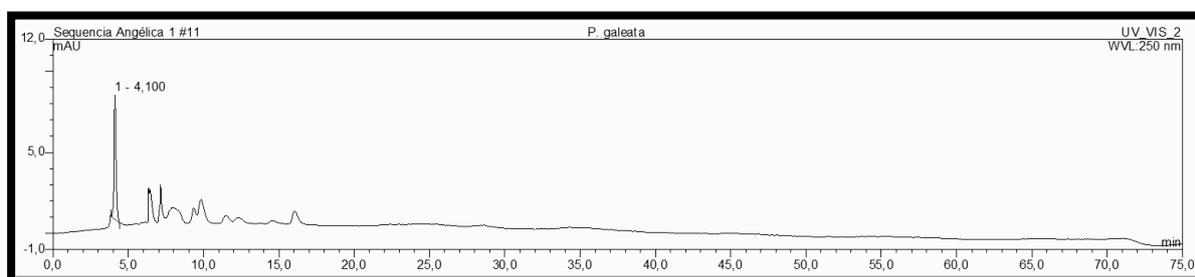


Figura 9. Cromatograma (CLAE) da **Fração 1** do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.

A **figura 10** mostra o cromatograma da subfração **1.a**, com pico único, relativo à substância eluída em T= 1,72 min, cujo espectro ultravioleta está na **figura 11**.

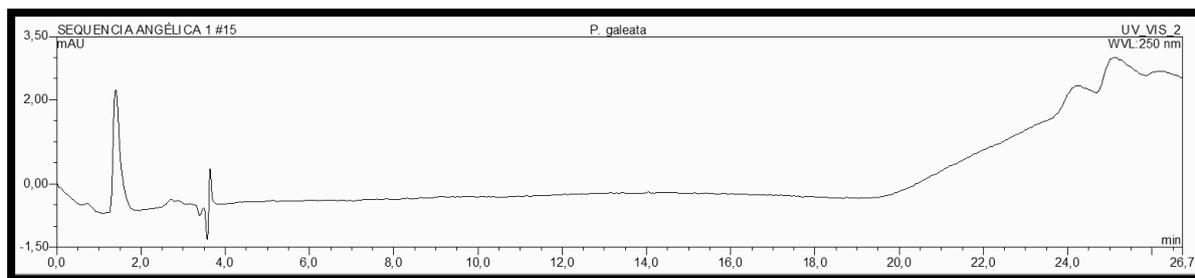


Figura 10. Cromatograma (CLAE) da subfração 1.a do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.

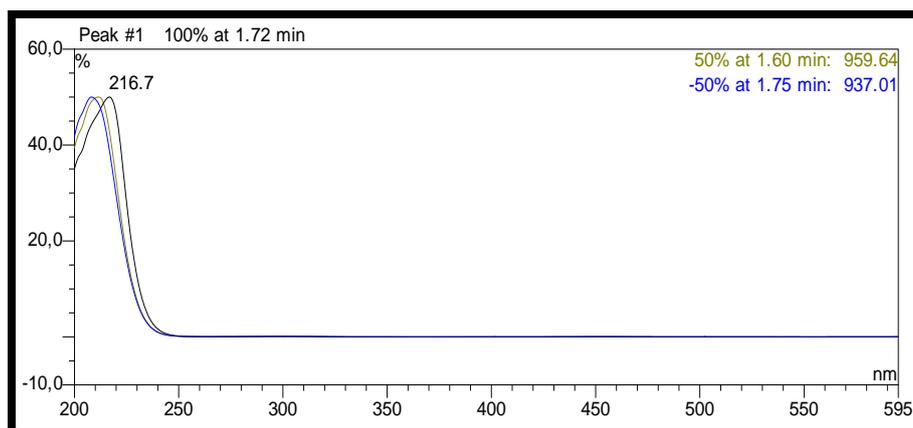


Figura 11. Espectro ultravioleta da substância eluída em $Tr = 1,72$, em corrida cromatográfica (figura 10), da subfração 1.a do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082.

A reunião destes dados cromatográficos com os dados toxicológicos do fracionamento bio guiado do extrato de *P. galeata* CCIBt 3082 sugerem fortemente que o pico (único) em $Tr = 1,72$ possa ser a toxina presente nesta cepa.

5.4.1.4 Análise do extrato e da subfração 1.a de *P. galeata* CCIBt 3082, por CP, para pesquisa de metabolitos pertencentes às classes dos aminoácidos, amins, alcaloides, peptídeos e terpenoides (2º “batch”)

A escolha destes testes foi baseada em informações sobre as classes dos metabolitos mais frequentes, em Cyanobacteria. A mais comumente encontrada em Cyanobacteria é a dos oligopeptídeos (Pearson *et al.* 2010), que são predominantemente cíclicos; além deles são encontrados depsipeptídeos (Nagarajan *et al.* 2012), policétídeos (Kehr *et al.* 2011), aminoácidos raros (Pearson *et al.* 2010), alcaloides (Pearson *et al.* 2010), macrolídeos (Heras *et al.* 2013), alguns terpenos (Prinsep *et al.* 1996) e numerosas substâncias com funções duplas (Nunnery *et al.* 2010). Substâncias apresentando classe estrutural híbrida policetídeo-

peptídeo, policetídeo-depsipeptídeo também são frequentes em cianobactéria. O conceituado periódico *Marine Drugs* dedicou um suplemento especial [*Mar. Drugs* 2013, 11(4)] às interessantes e complexas substâncias bioativas de Cyanobacteria.

Porém, para algumas dessas classes ainda não foram estabelecidos métodos cromatográficos (CP) de detecção, como para a dos macrolídeos (ElMarrouni *et. al.* 2013).

Em nosso estudo, os materiais testados não apresentaram resultados positivos para as classes dos aminoácidos, amins, alcaloides e terpenoides (**Tabela 8**).

Tabela 8. Resultados da pesquisa das classes químicas dos componentes do extrato e subfração **1.a** em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082

Testes	Para detecção de	Resultados
Ninidrina	Aminoácidos e amins	-
Vanilina	Aminoácidos especiais e amins	-
Anisaldeído	Terpenoides	-
Iodo	Substâncias orgânicas	-
Hidrólise	Peptídeos	+
Reagente de Dragendorff	Alcaloides	-
Iodeto de potássio Ácido	Alcaloides	-
Iodeto de potássio Platinado	Alcaloides	-

Nos cromatogramas, as amostras testadas foram respectivamente o extrato e a subfração **1.a**. Como visto, a subfração **1.a** contém uma única substância (Tr = 1,72 min) e o seu hidrolisado, aminoácidos (**Figura 12**) o que indica a sua natureza peptídica.

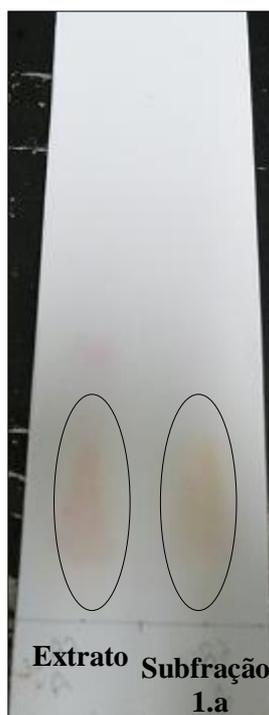


Figura 12. Cromatografia, em placas de gel de sílica, do extrato em ácido acético e subfração **1.a** de *P. galeata* 3082; fases móveis: butanol/ácido acético/água 5:4:1 (v/v/v), Revelador: ninidrina.

5.4.2 Estudos Biológicos (2º “batch”)

5.4.2.1 Ensaio *in vitro* (2º “batch”)

5.4.2.1.1 Ensaio bioautográfico para análise de potencial antifúngico, da atividade antioxidante e da atividade inibidora da acetilcolinesterase, realizados no extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082 (2º “batch”)

Os resultados dessas análises de substâncias ativas estão compilados na **tabela 9**.

Tabela 9. Resultados das análises dos ensaios bioautográficos do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082

Cepa	Anticolinesterase	Antifúngico	Antioxidante
CCIBt 3082 - <i>P. galeata</i>	Negativo	Negativo	Negativo

5.4.2.2 Ensaio *in vivo* (2º “batch”)

5.4.2.2.1 Ensaio de toxicidade aguda (dose única), por via intraperitoneal, em camundongos (2º “batch”)

Os sinais de intoxicação apresentados pelos camundongos, após a administração de doses de 1.000 mg.kg^{-1} , por via intraperitoneal, dose única, foram prostração e piloereção, respostas à substâncias com atividade sobre o Sistema Nervoso Central e Autônomo. Os animais também apresentaram fezes pastosas, envolvidas em muco e se recuperaram após cerca de 4 horas da administração do extrato.

Em necropsia, após 07 dias de observação, apresentaram fígado com aspecto congesto (Figura 13).

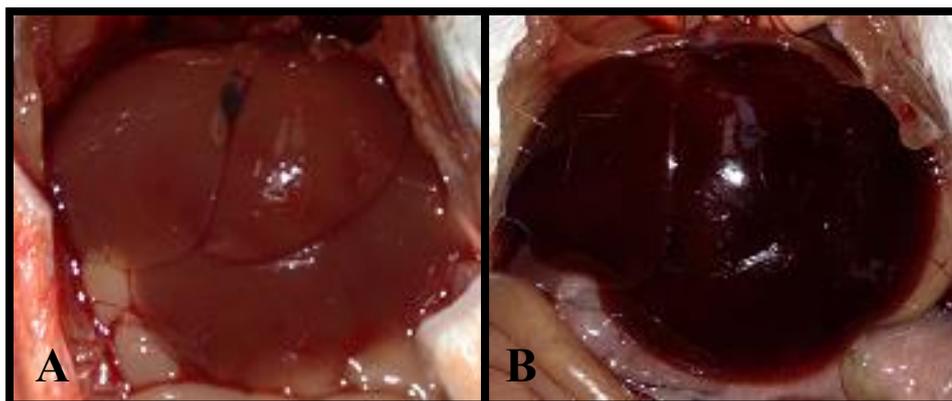


Figura 13. Imagem do fígado de camundongo controle (A) e tratado (B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082, por via intraperitoneal, dose única de 1.000 mg kg^{-1} . B- fígado com aspecto congesto.

Os sinais de intoxicação e as observações durante a necropsia, não foram iguais aos mostrados pelos animais submetidos a teste semelhante, com extrato da biomassa obtido no primeiro “batch”.

5.4.2.2.2 Ensaio de toxicidade oral aguda (DL₅₀) do extrato de *P. galeata* – Protocolo 425 (2º “batch”)

Neste ensaio que seguiu o protocolo 425 da OECD, foram administradas, por via oral, diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* em camundongos. A morte de animais foi observada na dose de 5.000 mg.kg⁻¹, indicando que este é o valor da DL₅₀. Os dados relativos a este teste estão na **tabela 10**.

Tabela 10. Compilação das observações sobre os sinais de intoxicação, nos animais que receberam por via oral, o extrato em ácido acético de *P. galeata* CCIBt 3082

Dose (mg kg ⁻¹)	Camundongos utilizados	Sinais de intoxicação
175	1	Agitação
550	1	Agitação
1.750	1	Sem alterações aparentes
2.250	1	Prostração
3.250	1	Agitação e tremores leves
4.250	2	Agitação, seguida de prostração
5.000	3	Prostração, andar cambaleante em círculos, girar no próprio eixo, tremores e espasmos musculares. Após 2 horas, ausência de resposta a estímulo; cauda arroxeadada; ocorrência de morte após 5 – 15 horas da administração do extrato.

Os sinais de intoxicação nos animais que sobreviveram às demais doses regrediram após cerca de 3 horas e são, também, devidos a respostas a substâncias com ação sobre o Sistema Nervoso Central.

Nos estudos “post-mortem”, foi observada congestão hepática (**Figura 14**).



Figura 14. Imagem do fígado de camundongo tratado com extrato em ácido acético 0,1 M de *P.galeata* CCIBt 3082, por via oral, dose única de 5.000 mg kg⁻¹. Fígado com aspecto congesto.

5.4.2.2.3 Ensaio de toxicidade subcrônica 28 dias (2° “batch”)

Devido ao fato de que as doses empregadas no teste de toxicidade subcrônica 28 dias, realizado com extrato da biomassa obtida no primeiro “batch” foram baixas e não causaram os efeitos esperados, o ensaio via oral foi repetido, com material do segundo “batch”.

As doses empregadas foram de 500, 1.000 e 1.500 mg·kg⁻¹ de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* e os animais divididos em 4 grupos de 5 animais. O grupo-controle recebeu, pela mesma via, água filtrada.

A pequena diferença de peso notada entre os animais tratados e o controle não foi estatisticamente significativa (**Tabela 11**). O mesmo ocorreu entre as diferenças no consumo de ração e água (**Tabela 12 e 13**) (**Figura 15**).

Tabela 11. Avaliação do ganho de peso total (em gramas) dos camundongos controle e tratado com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082 via oral, durante 28 dias

Ganho de peso				
(g)				
	Controle ^a	500 mg kg ^a	1.000 mg kg ^a	1.500 mg kg ^a
Total	10,22 ± 2,37	9,10 ± 1,48	7,26 ± 1,56	8,86 ± 1,49

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

Tabela 12. Consumo médio diário e total de ração (em gramas) dos camundongos controle e tratado com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Consumo (28 dias)				
(g)				
	Controle ^a	500 mg kg ^a	1.000 mg kg ^a	1.500 mg kg ^a
Médio	4,72 ± 0,52	4,61 ± 0,39	4,95 ± 0,56	4,45 ± 0,53
Total	132,08 ± 14,69	128,98 ± 10,87	138,58 ± 15,61	124,57 ± 14,79

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

Tabela 13. Consumo médio diário e total água (em mililitros) dos camundongos controle e tratado com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Consumo (28 dias)				
(mL)				
	Controle ^a	500 mg kg ^a	1.000 mg kg ^a	1.500 mg kg ^a
Médio	8,97 ± 1,02	10,01 ± 1,03	10,50 ± 1,20	10,35 ± 1,60
Total	251,14 ± 28,44	280,30 ± 28,89	293,96 ± 33,97	289,68 ± 44,76

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

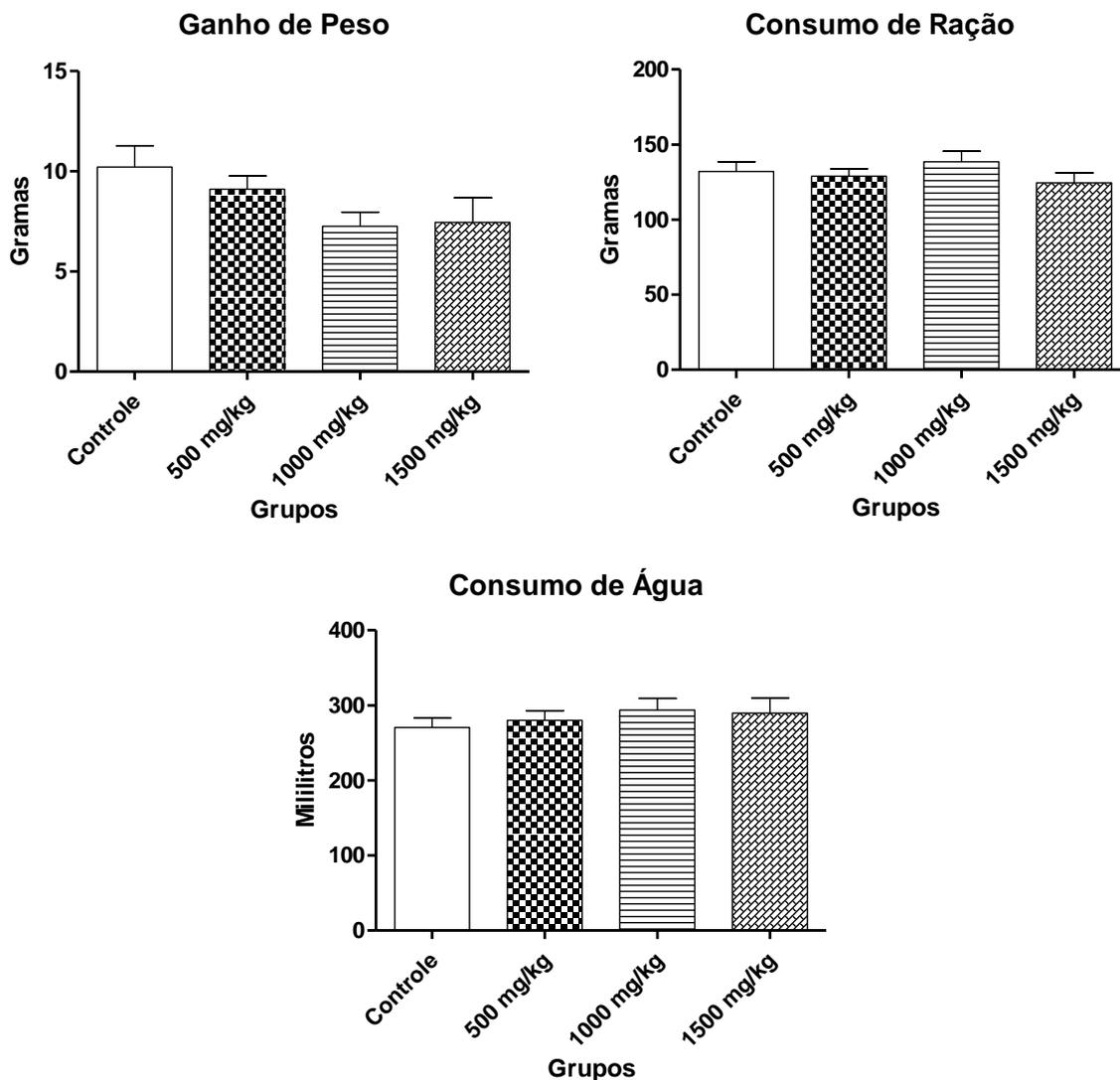


Figura 15. Ganho de peso total (g), consumo total de ração (g) e água (mL) de camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata*, via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão.

A **tabela 14** mostra os dados referentes ao peso relativo do baço, do timo, do fígado e do rim dos camundongos controle e tratado. Nenhum dos órgãos apresentou diferença significativa, quando comparados aos órgãos dos animais-controle (**Figura 16**).

Tabela 14. Peso relativo dos órgãos – baço, timo, fígado e rim (g/100g de peso vivo) dos camundongos tratados ou não com 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Peso relativo dos órgãos				
(g/100g de Peso vivo)				
Órgão	Controle ^a	500 mg kg ^a	1.000 mg kg ^a	1.500 mg kg ^a
Baço	0,23 ± 0,03	0,33 ± 0,09	0,30 ± 0,06	0,28 ± 0,04
Timo	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,04
Fígado	4,93 ± 0,12	4,76 ± 0,60	4,78 ± 0,62	4,95 ± 0,59
Rim	0,80 ± 0,11	0,81 ± 0,07	0,83 ± 0,06	0,86 ± 0,06

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

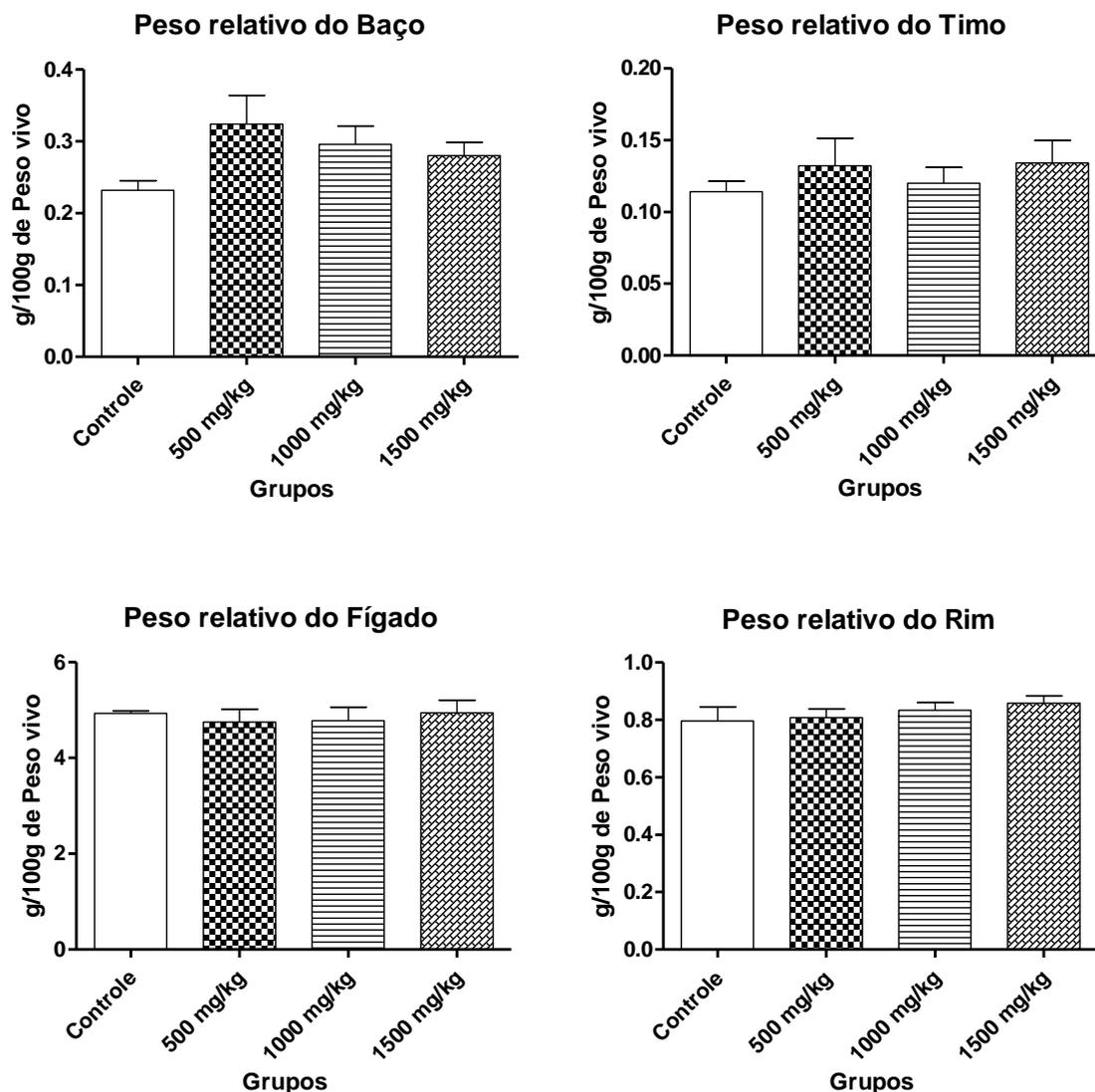


Figura 16. Peso relativo do baço, timo, fígado e rim (g/100g de peso vivo) de camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata*, por via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão.

No exame microscópico, não foram encontradas alterações circulatórias, degenerativas nem inflamatórias nos seguintes órgãos: cérebro, timo, baço, rim e fígado. Entretanto, no exame histológico do intestino, foram observadas, em todos os grupos tratados com o extrato de *P. galeata* CCIBt 3082, maior número de dilatações císticas no topo das vilosidades devido à dilatação de vasos linfáticos. Este quadro pode ser atribuído a um leve processo inflamatório, nesta região. (**Figura 17**).

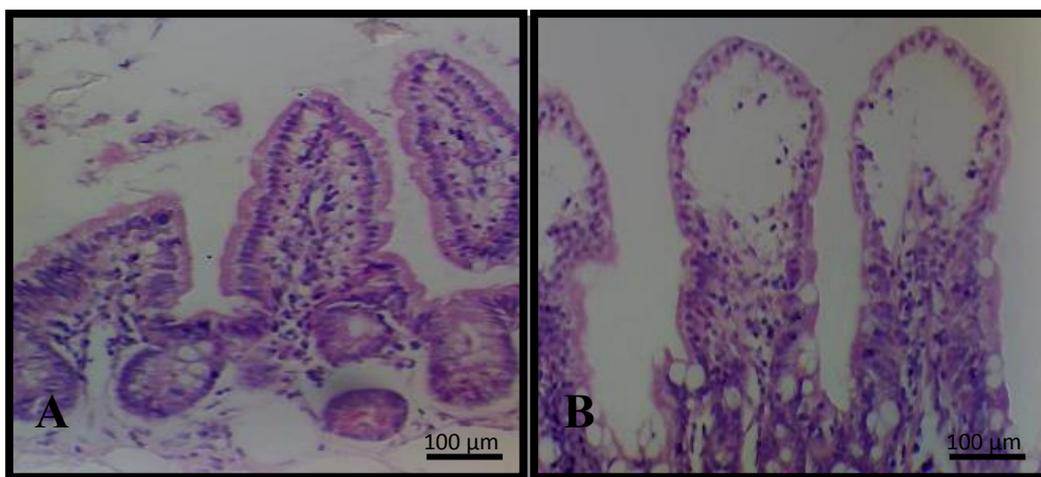


Figura 17. Fotomicrografias do intestino de camundongo controle (A) e tratado (B) com extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* CCIBt 3082. Em B se observa maior número de dilatações císticas no topo das vilosidades devido à dilatação de vasos linfáticos. Aumento: 1.000x (A e B).

Também nas contagens da celularidade do baço e da medula óssea, a diferença notada entre os grupos tratado e controle não foram estatisticamente significantes (**Tabelas 15 e 16**) (**Figura 18**).

Tabela 15. Celularidade do baço de camundongos tratados ou não com as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Celularidade do baço				
(Células x 10⁶)				
Controle ^a	500 mg kg ^a	1.000 mg kg ^a	1.500 mg kg ^a	
4,10 ± 1,57	5,16 ± 2,75	5,86 ± 1,19	3,43 ± 1,08	

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

Tabela 16. Celularidade da medula óssea de camundongos tratados ou não com as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg kg de extrato em ácido acético 0,1 M de *P. galeata* via oral, durante 28 dias

Celularidade da medula óssea				
(Células x 10 ⁶)				
Controle ^a	500 mg kg ^a	1.000 mg kg ^a	1.500 mg kg ^a	
2,95 ± 1,19	3,13 ± 1,11	4,26 ± 2,14	3,98 ± 0,79	

^an=5 camundongos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle (ANOVA, seguida de Dunnett).

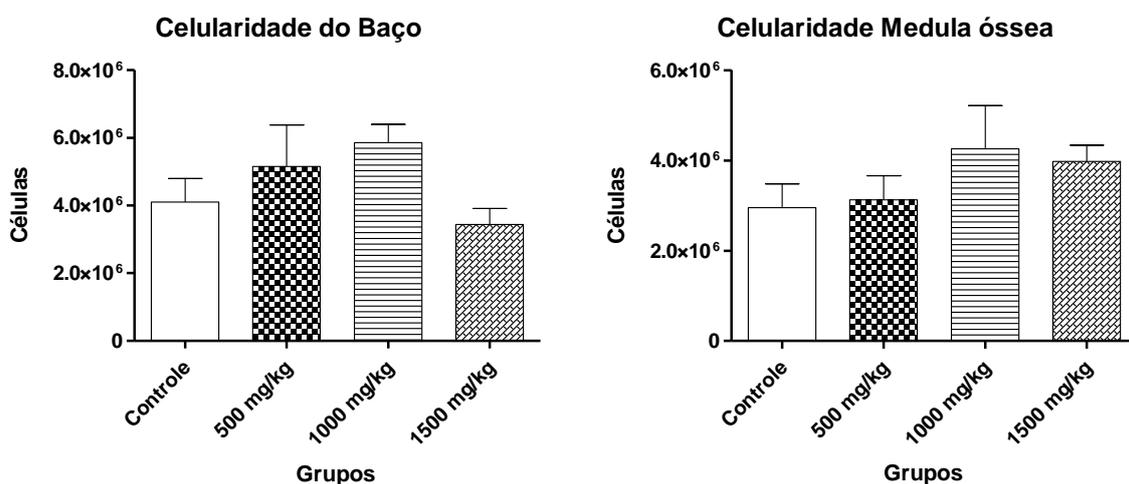


Figura 18. Celularidade do baço e da medula óssea dos camundongos tratados ou não com diferentes doses do extrato em ácido acético de *P. galeata* CCIBt 3082, por via oral, durante 28 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão.

Nenhuma significância estatística foi observada no peso relativo ou nas celularidades dos órgãos dos animais que receberam o extrato de *P. galeata*. Entretanto, não é possível descartar a possibilidade de que este extrato interfira nas respostas imunológicas dos animais que o receberam. A investigação da indução de imunotoxicidade causada por xenobióticos requer planejamentos e métodos distintos dos empregados nos estudos de toxicidade aguda e subcrônica.

A comparação entre os resultados obtidos pela administração de doses únicas, por via oral, que levaram os animais a óbito, relativas aos experimentos realizados com biomassa do

primeiro e do segundo “batches” (1.000 mg kg – 5.000 mg kg) mostra disparidade entre os efeitos tóxicos de ambos. Enquanto o extrato do primeiro “batch” pode ser considerado moderadamente tóxico, o extrato do segundo “batch” enquadra-se na categoria 5, que agrupa substâncias com toxicidade relativamente baixa, mas que podem causar danos à população a elas exposta (Winder *et al.* 2005).

Levando-se em conta que logo após o cultivo do segundo “batch”, a amostra da cepa *P. galeata* CCIBt 3082 entrou em senescência e em lise, essas observações indicam mudanças bioquímicas na linhagem, quadro já descrito para outros organismos, na literatura (Zhang *et al.* 2007; Day *et al.* 2005).

Essas mudanças ocorrem quando organismos retirados do meio ambiente, onde estavam sujeitos a pressões ambientais bióticas e abióticas são mantidos em ambientes estáticos por muito tempo (Masel *et al.* 2007). Nessas condições estáticas, podem ocorrer perdas bioquímicas, morfológicas e genéticas. As perdas mais frequentemente observadas são as morfológicas: cianobactérias mantidas em cultura desagregam, perdem a mucilagem e os aerótopos (Zhang *et al.* 2007; Day *et al.* 2005).

Também são registradas variações bioquímicas, ou seja, diferenças entre os metabolitos produzidos por cepa antes e depois de período de manutenção em cultivo (Zhang *et al.* 2007).

Com relação às perdas genéticas, existem interessantes estudos sobre a contração e expansão de genomas bacterianos, porém raríssimas pesquisas sobre aspectos semelhantes, em cianobactéria (Koskiniemi *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2007; Bentley *et al.* 2004; Kettler *et al.* 2007, Andersson & Andersson 1999).

De um modo geral, a deterioração genética é observada em mudanças duradouras de “estilo de vida”; nesse caso, subsets de genes que permanecem inativos podem ser eliminados, principalmente se o custo energético para mantê-los for alto (Andersson & Andersson 1999; Kettler *et al.* 2007; Ochman & Moran 2001).

6 CONCLUSÕES

- O extrato do primeiro “batch” apresentou toxicidade aguda maior do que a do segundo “batch” (dose única, via oral), causando lesões no fígado e rim dos animais; O extrato do segundo “batch” provocou congestão hepática;
- Em experimento subcrônico, ambos os extrato causaram tendência de perda de peso e o extrato do segundo “batch”, lesões no intestino dos animais.
- Em ensaio de toxicidade aguda, por via intraperitoneal, o extrato do segundo “batch” causou congestão hepática;
- O fracionamento e refracionamento do extrato em ácido acético resultaram no isolamento de substância com natureza peptídica.
- No extrato obtido do segundo “batch” não foram detectadas, por Cromatografia Planar, microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a ou β -metilaminoalanina;
- A comparação entre os testes toxicológicos realizados com a cepa, no decorrer dos últimos 5 anos, mostra a diminuição gradativa de sua atividade tóxica, o que pode ser atribuído a perdas (genéticas, morfológicas e bioquímicas) ocorridas devido à manutenção em cultivo, durante longo tempo (18 anos).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboal, M., Prefasi, M. & Asencio, A.D.** 1996. The aquatic microphytes and macrophytes of the Trasvase Tajo-Segura irrigation systems, southeastern Spain. *Hydrobiologia* 340: 101-107.
- Acinas, S.G., Haverkamp, T.H.A., Huisman, J. & Stal, L.J.** 2009. Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). *ISME J* 3 (1): 31-46.
- Affe, H.M.J. & Barboni, S.A.V.** 2012. Cianobactérias potencialmente tóxicas de importância em Saúde Pública. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* 5: 57-74.
- Agrawal, A.A.** 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294:321-326.
- Agripino, D.G., Lima, M.E.L., Silva, M.R., Meda, C.I., Bolzani, V.S., Cordeiro, I., Young, M.C.M. & Moreno, P.R.H.** 2004. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA damaging Activities: IN. Atlantic Rain Forest. Ecological Station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica* 4: 15.
- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A. & Wright D.T.** 2006. Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology* 4 (3): 147-166.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 - Introduction. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement Volumes* 38-39: 291-302.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement Volumes* 50-53: 327-472.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1990. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 5 - Stigonematales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement Volumes* 59: 1-73.
- Andersson, J.O. & Andersson, S.G.E.** 1999. Insights into evolutionary process of genoma degradation. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 664-671.
- Andersson, J.O. & Andersson, S.G.E.** 1999. Insights into the evolutionary process of genoma degradation. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 664-671
- Aráoz, R., Molgó, J. & Marsac, N.T.** 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56 (5): 813-28.

- Arjonilla-de-Mattos, L.F & Carvalho, L.R.** 2009. Prospecção de substâncias bioativas em cepas selecionadas do Banco de Culturas de Cianobactérias da Seção de Ficologia – Relatório PIBIC. Instituto de Botânica do Estado de São Paulo pp. 1-22.
- Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L.** 2003. *Sphaerocavum brasiliense*, a new plankitic genus and species of cyanobacteria from reservoirs of Sao Paulo state, Brazil. *Algological studies* 109: 79-92.
- Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R. & Cox, P.A.** 2007. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Marine Drugs* 5 (4): 180-96.
- Bentley, S.D. & Parkhill, J.** 2004. Comparative genomic structure of Prokaryotes. *Annual Review of Genetics* 38: 771-91.
- Bernardi, C.R., Luiz, M.T.B., Zanotto, D.L. & Guidoni, A.L.** 2003. Preparo de hidrolisados protéicos para a análise de aminoácidos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23(3): 317-322.
- Bláha, L., Babica, P. & Maršálek, B.** 2009. Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology* 2 (2): 36-41.
- Boone, D.R. & Castenholz, R.W.** 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.). Verlag, New York: Springer, pp. 1-721.
- Botes, D.P., Tuinman, A.A., Wessels, P.L., Viljoen, C.C., Kruger, H., Williams, D.H., Santikarn, S., Smith R.J. & Hammond, S.J.** 1984. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1: 2311-2318.
- Brito, A.S.** 1994. Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*. São Paulo, UNICAMP pp. 1-116.
- Buckley, L.J., Ikawa, M. & Sasner, J.J.** 1976. Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(1): 107-110.
- Caraus, I.** (2012). Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae. Version 2.3 third revision. . Bacau: Univ. Bacau pp. 1-809.
- Carmichael, W.W.** 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72 (6): 445-59.
- Carmichael, W.W.** 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 270 (1): 78-86.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R. & Eaglesham, G.K.** 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109 (7): 663-8.

- Carmichael, W.W., Biggs, D.F. & Peterson, M.A.** 1979. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* nrc-44-1. *Toxicon* 17 (3): 229-236.
- Carneiro, R.L., Pacheco, A.B. & Azevedo, S.M.O.** 2013. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. *Mar drugs* 11 (8): 2949-2963.
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R.D., Cai, Z., Neilan, B.A. & Scheer, H.** 2010. A Red-Shifted Chlorophyll. *Science* 329 (5997): pp. 1318-1319.
- Chen, Y., Shen, D. & Fang, D.** 2013. Nodularins in poisoning. *Clinica chimica acta* 425: 18-29.
- Chorus, I. & Bartram, J.** 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London, New York: E&FN Spon., pp. 1-432.
- Chorus, I.** 2001. Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. Springer, pp. 1-357.
- Codd, G.A.** 1995. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology* 32 (4): 149-156.
- Codd, G.A.** 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16 (1): 51-60.
- Codd, G.A., Morrison, L.F. & Metcalf, J.S.** 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3): 264-72.
- Corbel, S., Mougin, C. & Bouaïcha, N.** 2013. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96: 1-15.
- Cox, P.A. e Banack, S.A. & Murch, S.J.** 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of National Academy of Sciences. U.S.A.* 100 (23): 13380-13383.
- Cunha, L.C., Pípole, F., arjonilçla-de-Mattos, L.F., Rangel, M., Sant'Anna, C.L., Garcia, A.N. & Carvalho, L.R.** 2010. Anais da Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP, São Paulo Vol 4: 159-160.
- D'Agostino, P.M., Michelle C. Mofitt, M.C. & Neilan, B.A.** 2014. Current Knowledge of Paralytic Shellfish Toxin Biosynthesis, Molecular Detection and Evolution. In: G. P. Rossini (ed.). *Toxins and biologically active compounds from microalgae*. Vol. 1. CRC Press, Boca Ratón, USA. pp. 251-280.

- Day, J.G. & Brand, J.J.** 2005. Cryopreservation methods for maintaining cultures. *In*: R.A. Andersen [ed.], *Algal culturing techniques*, 165–187. Academic Press, New York, New York, USA.
- Day, J.G., Benson, E.E., Harding, K., Knowles, B., Idowu, M., Bremner, D., Santos, L., Santos, F., Lorenz, M., Lukesova, A.A., Elster, J., Lukavsky, J., Herdman, M., Rippka, R. & Hall, T.** 2005. Cryopreservation and conservation of microalgae: The development of a Pan-European Scientific and Biotechnological resource (The COBRA Project) *CryoLetters* 26 (4): 231-238.
- Duy, T.N., Lam, P.K.S., Shaw, G.R. & Connell, D.W.** 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology - Springer* 63: 113-185.
- Elleman, T.C., Falconer, I.R., Jackson A.R. & Runnegar, M.T.** 1978. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (*Anacystis cyanea*) bloom. *Australian Journal of Biological Sciences* 31: 209-18.
- ElMarrouni, A., Kolleth, A., Lebeuf, R., Gebauer, J., Prevost, S., Heras, M., Arseniyadis, S. & Cossy, J.** 2013. Lyngbouilloside and Related Macrolides from Marine Cyanobacteria. *Natural Product Communications* 8:1-8.
- Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriluoto, J.A., Karaki, H., Han, Y.G. & Hartshorne, D.** 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173: 1347–1353.
- Falconer, I.R. & Humpage, A.R.** 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2 (1): 43-50.
- Falconer, I.R.** 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia* 35 (6s): 6-11.
- Falconer, I.R., Beresford, A.M. & Runnegar, M.T.** 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Medical Journal of Australia* 1 (11): 511-514.
- Fernandes, V.O., Cavati, B., Oliveira, L.B. & Souza, B.D.** 2009. Ecologia de cianobactérias: Fatores promotores e consequências das florações. *Oecologia Brasiliensis* 13 (2): 247-258.
- Ferreira, T.C.R., Freitas, A.C.C., Paula, F.A.J. & Guarda V.L.M.** 2009. Uptake and metabolism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-rr by *Spirodela intermedia* from Brazil. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 85-89.

- Fischer, A.G.** 1965. Fossils, early life, and atmospheric history. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 53 (6): 1205-1215.
- Franceschini, I.M., Burliga, A.L., Reviere, B., Prado, J.F. & Rézig, S.H.** 2010. Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre, Brasil: Artmed Editora, pp. 1-394.
- Francis, G.** 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11-12.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J. & Pace, N.R.** 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* 170 (8): 3584-3592.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M.** 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland. Galway. <http://www.algaebase.org> (acesso em 01.03.2014).
- Hadly, E.A., Ramakrishnan, U., Cha, Y.L., van Tuinen, M., O'Keefe, K., Spaeth, P.A. & Conroy, C.J.** 2004. Genetic response to climate change: Insights from ancient DNA and Phylochronology. *PLOS Biology* 2 (10): 1600-1609.
- Harada, K.I., Kondo, F. & Lawton, L.** 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management.* Chorus, I. & Bartram, J. (eds.). E & FN SPON, New York, 369-405.
- Harada, K.I., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R. & Carmichael, W.W.** 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 448: 275-283.
- Harada, K.I., Ogawa, K., Matsuura, K., Nagai, H., Murata, H., Suzuki, M., Itezono, Y., Nakayama, N., Shirai, M. & Nakano, M.** 1991. Isolation of two toxic heptapeptide from *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* 29: 479-485.
- Harada, K.I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M. & Terao, K.** 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32 (1): 73-84.
- Heras, M., Arseniyadis, S. & Janine Cossy, J.** 2013. *Natural products Communications* 8(1-2) 1-8.
- Hoehn, R.C. & Long, B.W.** 2004. Toxin cyanobacteria (blue-green algae): An emerging concern *Water Treatment Technology*, pp. 1-20.
- Hoffmann, L., Komárek, J. & Kastovsky, J.** 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 117: 95-115.

- Holtcamp, W.** 2012. The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease? *Environ Health Perspect* 120 (3): 110-117.
- Hostettmann, K., Queiroz, E.F. & Vieira, P.C.** 2003. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos: EdUSPCar, pp. 1-152.
- Jacinavicius, F.R., Gama Junior, W.A., Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L.** 2012. *Manual de Cultivo de Cianobactérias*. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Manual Virtual, pp.1-32.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B., Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S.M.F.O. & Jarvis, W.R.** 1998. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338 (13): 873-878.
- Kameyama, K., Sugiura, N., Inamori, Y. & Maekawa, T.** 2004. Characteristics of microcystin production in the cell cycle of *Microcystis viridis*. *Environmental Toxicology* 19 (1): 20-25.
- Kehr, J.-C., Picchi, D. G. & Dittmann, E.** 2011. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 7: 1622–1635.
- Kettler, G.C., Martiny, A.C., Huang, K., Zucker, J., Coleman, M.L., Rodrigue, S., Chen, F., Lapidus, A., Ferriera, S., Johnson, J., Steglich, M.L., Church, G.M., Richardson, P. & Chisholm, S.W.** 2007. Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLOS Genetics* 3 (12): 2515-2528.
- Kettler, G.C., Martiny, A.C., Huang, K., Zucker, J., Coleman, M.L., Rodrigue, S., Chen, F., Lapidus, A., Ferriera, S., Johnson, J., Steglich, C., Church, G.M., Richardson, P., Chisholm, S.W.** 2007. Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genetics* 3(12): 2515- 2528.
- Kirkwood, A.E. & Henley, W.J.** 2006. Algal community dynamics and halotolerance in a terrestrial, hypersaline environment. *Journal of Phycology* 42: 537-547.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1986a. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds). *Süßwasserflora Von Mitteleuropa* 19. Verlag, München: Elsevier Spektrum Akademischer, pp.759.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1986b. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2. Chroococcales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 43: 157-226.

- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 56: 247-345.
- Komárek, J.** 2006. Cyanobacterial taxonomy: Current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21 (4): 349-375.
- Komárek, J.** 2010. Recent changes (2008) in cyanobacterial taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept) *Hydrobiologia* 639 (1): 245-259.
- Kormas, K.A. & Lympelopoulou, D.S.** 2013. Cyanobacterial toxin degrading bacteria: who are they? *Biomed Research International* 2013: ID 463894, pp. 1-12.
- Koskiniemi, S., Sun, S., Berg, O. & Andersson D.I.** 2012. Selection-driven gene loss in Bacteria. *PLoS Genetics* 8(6): 1-7.
- Kussel, E. & Leibler, S.** 2005. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309: 2075-2078.
- Leal, M., Ortiz, N., Mora, R., Ruiz, G., Perona, E. & Morales, E.** 2001. Caracterización de la cianobacteria *Pseudanabaena galeata* a diferentes condiciones de cultivo. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 35 (3): 19.
- Leão, P.N., Vasconcelos, M.T.S.D. & Vasconcelos, V.M.** 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 35 (4): 271-282.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O. & Graneli, E.** 2003. Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42 (4): 406-419.
- Lewellyn, L.E.** 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude de receptors. *Natural Products Reports* 23: 200-222.
- Luukkainen, R., Sivonen, K., Namikoshi, M., Färdig, M., Rinehart, K.L. & Niemelä S.I.** 1993. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied Environmental Microbiology* 59 (7): 2204-2209.
- Mahmood, N.A. & Carmichael, W.W.** 1986. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* nrc 525-17. *Toxicon* 24 (5): 425-434.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K.** 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem anal* 13 (1): 51-54.

- Masel, J., King, O.D. & Maughan, H.** 2007. The loss of adaptive plasticity during long periods of environmental stasis. *The American Naturalist* 169 (1): 38-46.
- Merck, E.** 1971a. Anisaldehyde - sulfuric acid for steroids and terpenes, n° 22. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971b. Dragendorff reagent acc. to Munier for alkaloids and other nitrogen containing compounds, n° 131. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971c. Iodine - potassium iodide acidic for alkaloids, n° 162. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971d. Iodine as general detection reagent, n° 160. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971e. Ninhydrin for amino acids, amines and amino-sugars, n° 207. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971f. Potassium iodine platinate for alkaloids, n° 246. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971g. Vanillin - potassium hydroxide for amino acids and amines, n° 328. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E. & Thomas, O.** 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotox. *Environment International* 59: 303-27.
- Ministério Da Saúde, (MS).** 2003. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília/DF - Brasil: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, pp. 01-56.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S.A. & Mash, D.C.** 2012. Cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Marine Drugs* 10 (2): 509-520.
- Nagarajan, M., Maruthanayagam, V. & Sundararaman, M.** 2012. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *Journal of Applied Toxicology* 32: 153-185.
- Newcombe, G., House, J., Ho, L., Baker, P. & Burch, M.** 2010. Management strategies for cyanobacteria (blue-green algae): A guide for water utilities Australia: Water Quality Research Australia Limited, pp. 1-112.

- Nicholson, B.C. & Burch, M.D.** 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. Australia: Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, National Health and Medical Research Council of Australia, pp. 1-64.
- Nunnery, J.N., Mevers, E. & Gerwick, W.H.** 2010. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 21(6): 787–793.
- Ochman, H. & Moran, N.A.** 2001. Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292: 1096-1098.
- Oecd (Organisation for Economic Co-operation and Development).** 2008a. Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down- Procedure (UDP), Item 425.
- Oecd (Organisation for Economic Co-operation and Development).** 2008b. Guidelines for the testing of chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study In Rodents, Item 407.
- Olvera-Ramírez, R., Centeno-Ramos, C. & Martínez-Jerónimo, F.** 2010. Toxic effects of *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) on the cladocerans *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Hidrobiológica* 20: 203-212.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S., & Watanabe, M.M.** 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of General and Applied Microbiology* 46: 39-50.
- Oudra, B., Loudiki, M., Sbiyyaa, B., Martins, R., Vasconcelos, V. & Namikoshi, N.** 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicon* 39 (9): 1375-1381.
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A. & Mash, D.C.** 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 120 (4): 216-225.
- Panosso, R., Costa, I.A.S., Souza, N.R., Attayde, J.L., Cunha, S.R.S. & Gomes, F.C.F.** 2007. Cianobactérias e Cianotoxinas em reservatórios do Estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecologia Brasiliensis* 11 (3): 433-449.
- Patocka, J., Gupta, R.C., Kuca, K.** 2011. Anatoxin-a(s): Natural organophosphorus anticholinesterase agent. *Military Medical Science Letters* 80: 129-139.

- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R. & Neilan, B.** 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8: 1650-1680.
- Pelander, A., Ojanperä, I., Lahti, K., Niinivaara, K. & Vuori, E.** 2000. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Research* 34: 2643-2652.
- Pípole, F., Arjonilla-de-Mattos, Garcia, A.N., Cunha, L.C., Rangel, m., Sant'Anna, C.L. & Carvalho, L.R.** 2010. Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato de *Pseudanabaena galeata* administrados via oral e intraperitoneal. XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, Paraty, 19 a 23 de julho de 2010, pp. 1-75.
- Pípole, F., Latorre, A.O., Carvalho, L.R. & Hueza, I.M.** 2011. Immunotoxic and toxic evaluation of subchronical exposure in rats. Capítulo 86. In: Poisoning by plants, mycotoxins, and related toxins. Riet-Correa, J. Pfister, A.L. Schild & T.L. Wierenga (eds.). CAB International, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 499-503.
- Poon, G.K., Priestley, I.M., Hunt, S.M., Fawell, J.K. & Codd, G.A.** 1987. Purification procedure for peptide toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* 387: 551-555.
- Prinsep, M.R., Patterson, G.M.L., Larsen, L.K. & Smith, C.D.** 1998. Tolyporphins J and K, two further porphinoide metabolites from the cyanobacterium *Tolypothrix nodosa*. *Journal of Natural Products* 61: 1133-1136.
- Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D.P. & Wilkins, A.L.** 2013. Isolation and structure determination of two new hydrophobic microcystins from *Microcystis* sp. (CAWBG11). *Phytochemistry Letters* 6: 575-581.
- Purdie, E.L., Metcalf, J.S., Kashmiri, S. & Codd, G.A.** 2009. Toxicity of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine to three aquatic animal species. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10 (2): 67-70.
- Pyo, D. & Shin, H.** (2002). Extraction and analysis of microcystins RR and LR in cyanobacteria using a cyano cartridge. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51: 103-109.
- Ressom, R., Soong, F.S., Fitzgerald, J., Turczynowicz, L., El Saadi, O., Roder, D., Maynard, T. & Falconer, I.** 2000. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). Australian: National Health and Medical Research Council, pp. 1-112.
- Rhee, I.K., Van de Meent, M., Ingkaninan, K. & Verpoorte, R.** 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer

- chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A* 915 (1-2): 217-223.
- Rinehart, K.L., Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Mulligan, P.E., Beasley, V.R., Dahlem, A.M. & Carmichael, W.W.** 1988. Nodularin, microcystin, and the configuration of ADDA. *Journal of the American Chemical Society* 110: 8557-8557.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y.** 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
- Romo, S. & Miracle, R.** 1994. Long-term phytoplankton changes in a shallow hypertrophic lake, Albufera of Valencia (Spain). *Hydrobiologia* 275/276: 153-164.
- Sahin, A., Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Mez, K. & Naegeli, H.** 1995. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research* 56: 1110–1115.
- Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Agujaro, L.F., Carvalho, M.C., Carvalho, L.R. & Souza, R.C.R.** 2006. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. *Interciência/Sociedade Brasileira de Ficologia*, pp. 1-58.
- Schirrmeister, B.E., Antonelli, A. & Bagheri, H.C.** 2011. The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology* 11: 45.
- Schopf, J.W. & Barghoorn, E.S.** 1967. Alga-like fossils from the early precambrian of South Africa. *Science* 156 (3774): 508-512.
- Spinosa, H.D.S., Górnjak, S.L. & Palermo-Neto, J.** 2008. *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. Barueri: Malone, pp. 1-960.
- Stewart, I., Schluter, P.J. & Shaw, G.R.** 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environmental Health* 5: 23.
- Teixeira, M.G., Costa, M.C., Carvalho, V.L., Pereira, M.S. & Hage, E.** 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of The Pan American Health Organization* 27 (3): 244-253.
- Teneva, I, Mladenov, R. & Dzhabazov, B.** 2009. Toxic effects of extracts from *Pseudoanabaena galeata* (cyanoprokaryita) in mice and cell cultures in vitro. *Natural Sciences and the Humanities* 12: 237-243.
- Tucci, A., Sant'Anna, C.L., Gentil, R.C. & Azevedo, M.T.P.** 2006. Fitoplâncton do Lago das garças, São Paulo, Brasil: um reservatório urbano eutrófico. *Hoehnea* 33 (2): 147-175.

- Vilaprinyo, E., Alves, R. & Sorribas, A.** 2010. Minimization of biosynthetic costs in adaptative gene expression responses of yeast to environmental changes. *PLOS Computational Biology* 6 (2): 1-15.
- Watanabe, M.** 1996. Studies on planktonic blue-green algae 6. Bloom-forming species in Lake Biwa (Japan) in the Summer of 1994. *Bulletin of the National Science Museum, Serie B22*, pp. 1-10.
- West-Eberhard, M.J.** 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *PNAS* 102 (1): 6543-6540.
- Whitton, B.A. & Potts, M.** 2000. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space (reviewed by T. Bailey Watts). *Journal of Paleolimnology* 28 (4): 383-384.
- Wiegand, C & Pflugmacher, S.** 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: A short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 2.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Troco K. Mihali, T.K., Moffitt, M.C. & Brett A. Neilan, B.A.** 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8: 2185-2211.
- Winder, C., Azzi, R. & Wagner, D.** 2005. The development of the globally harmonized system (GHS) classification and labelling of hazardous chemicals. *J Hazard Mater* 2000, 125: 29-44.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of The National Academy of Sciences. U.S.A.* 87 (12): 4576-4589.
- Yoshida, M., Yoshida, T., Satomi, M., Takashima, Y, Hosoda, N & Hiroishi, S.** 2008. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *Journal of Applied Microbiology* 105: 407-415.
- Zaccaroni, A. & Scaravelli, D.** 2008. Toxicity of fresh water algal toxins to humans and animals. V. Evangelista, L. Barsanti, A.N. Frassanito, V. Passarelli & P. Gualtiere (eds.). In: *Algal toxins: Nature, occurrence, effect and detection*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 45-90.
- Zakhia, F., Jungblut, A., Taton, A., Vicent, W.F. & Wilmotte, A.** 2008. Cyanobacteria in Cold Ecosystems. In: Margesin, R.; Schinner, F., *et al.* (Ed.). *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*: Springer Berlin Heidelberg, cap. 8: 121-135.
- Zanchett, G. & Oliveira-Filho, E.C.** 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins* 5: 1896-1917.

Zhang, M., Kong, F., Tan, X., Yang, Z., Cao, H. & Xing, P. 2007. Biochemical, morphological, and genetic variations in *Microcystis aeruginosa* due to colony disaggregation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 663-670.