

# CAPÍTULO 21

## CIANOTOXINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, HISTÓRICO, LEGISLAÇÃO E MÉTODOS DE ANÁLISES

Stella Bortoli & Ernani Pinto

Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.  
E-mail: sbortoli@usp.br

### RESUMO

Cianobactérias são microrganismos procariontes e fotossintéticos presentes nos mais diversos ambientes terrestres. Os representantes planctônicos são de especial interesse, pois como resultado do sucesso ecológico e estratégias competitivas estão entre os organismos pioneiros da vida terrestre e presentes até os dias atuais, produzindo uma gama de metabólitos secundários que cada vez mais despertam o interesse científico. As cianotoxinas são alguns dos metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias. Compõem várias classes, com diferentes mecanismos de ação e características próprias, podem ser hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas e dermatotóxicas. A principal preocupação referente às cianotoxinas é em consideração aos reservatórios destinados ao abastecimento público. O crescimento acelerado das cianobactérias e a formação de florações ou *blooms* acarretam um potencial aumento da concentração de toxinas na água, o que representa um sério risco de saúde pública. Nem todas as cianobactérias produzem toxinas, por isso o desenvolvimento de métodos que sejam rápidos, confiáveis e úteis na identificação e quantificação desses compostos é extremamente importante. Portanto, existe hoje uma portaria do Ministério da Saúde (nº 2914 de 2011) que estabelece os procedimentos relativos ao monitoramento dos reservatórios e valores de referência para diferentes classes de toxinas. Este capítulo compila as cianotoxinas mais comumente encontradas e estudadas no mundo, bem como seus principais aspectos químicos, bioquímicos e toxicológicos. Ainda dedica uma parte à toxicidade e a avaliação de risco as microcistinas e os principais métodos de detecção.

## 1 INTRODUÇÃO

Florações de cianobactérias se tornaram comuns nos dias atuais e são reportadas no mundo todo. Muitas vezes estão relacionadas como uma das conseqüências do aumento da concentração de nutrientes, como compostos de nitrogênio e fósforo nos corpos d'água. O excesso desses compostos é em grande parte, resultado da ação antropogênica, principalmente na forma de efluentes domésticos, industriais, cargas difusas urbanas e agrícolas, além de outros contaminantes que se acumulam dentro de rios, lagos e oceanos (ANTONIOU et al., 2005). As florações conferem cor, odor e sabor diferenciado à água, acarretando uma série de problemas para o abastecimento público. Entretanto, um aspecto bastante relevante das florações é que elas representam potencial risco para os animais, inclusive os seres humanos, pelo fato das cianobactérias produzirem compostos tóxicos que comprometem a qualidade dos recursos hídricos (CHORUS; BARTRAM, 1998). As cianotoxinas produzidas pelas cianobactérias em uma floração podem ser acumuladas pelos organismos que compõe a comunidade aquática e ser transferida para outros níveis (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010).

Cianobactérias são produtores primários e desempenham um papel importante nos ecossistemas aquáticos. Os aspectos que designam risco acerca desses organismos devem ser considerados levando-se em consideração o benefício que eles representam ao ambiente, a outros organismos e animais (DITTMANN; WIEGAND, 2006).

Desta forma, em função dos riscos potenciais que a presença de cianobactérias nos corpos d'água representam, a principal medida preventiva é o controle de seu crescimento desordenado. Este é o motivo da importância de diminuir o enriquecimento dos ecossistemas aquáticos, especialmente no que diz respeito ao nitrogênio e ao fósforo. Esses elementos são os principais responsáveis pelo intenso crescimento do fitoplâncton, particularmente as cianobactérias.

Algumas espécies de cianobactérias principalmente as planctônicas que predominam em florações, podem produzir toxinas também chamadas de cianotoxinas. As cianotoxinas são alguns dos produtos do metabolismo secundário das cianobactérias, ou seja, não são necessárias para o metabolismo básico destes organismos como crescimento e reprodução, mas são essenciais para seu desenvolvimento. As cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em: (i) hepatotóxicas, que são as microcistina e nodularinas; (ii) neurotóxicas, representadas pela anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s) e um grande grupo chamado saxitoxinas; (iii) citotóxica, a cilindrospermopsina; e (iv) as dermatotoxinas que são as toxinas lipopolissacarídicas, comuns a várias espécies de cianobactérias. (CHORUS; BARTRAM, 1998; VAN APELDOORN et al., 2007). Existem ainda outras toxinas: aplysiatoxina, debromoaplysiatoxina e a lyngbiatoxina-a, com ações distintas, tal como dermatotóxicos, promotores de tumor e irritantes gástricos, porém ainda não totalmente elucidados (MSAGATI et al., 2006; VAN APELDOORN et al., 2007). As estruturas químicas das principais cianotoxinas estão representadas na Figura 1. A Tabela 1 demonstra a relação entre as toxinas, principais organismos produtores, mecanismo de ação, toxicidade e sintomatologia da exposição aguda. Essas toxinas foram responsáveis em várias ocasiões pela exposição aguda e crônica de animais selvagens e domésticos e também de humanos (CHORUS; BARTRAM, 1998).

A função das cianotoxinas ainda é bastante discutida. Alguns autores acreditam que esses compostos atuam como mecanismo de defesa, outros sugerem que eles auxiliam na melhor captação da luz solar e ainda mais recentemente existem os que tentam provar que as toxinas são moléculas de sinalização que colaboram na comunicação entre as cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1998; LYCK, 2004).

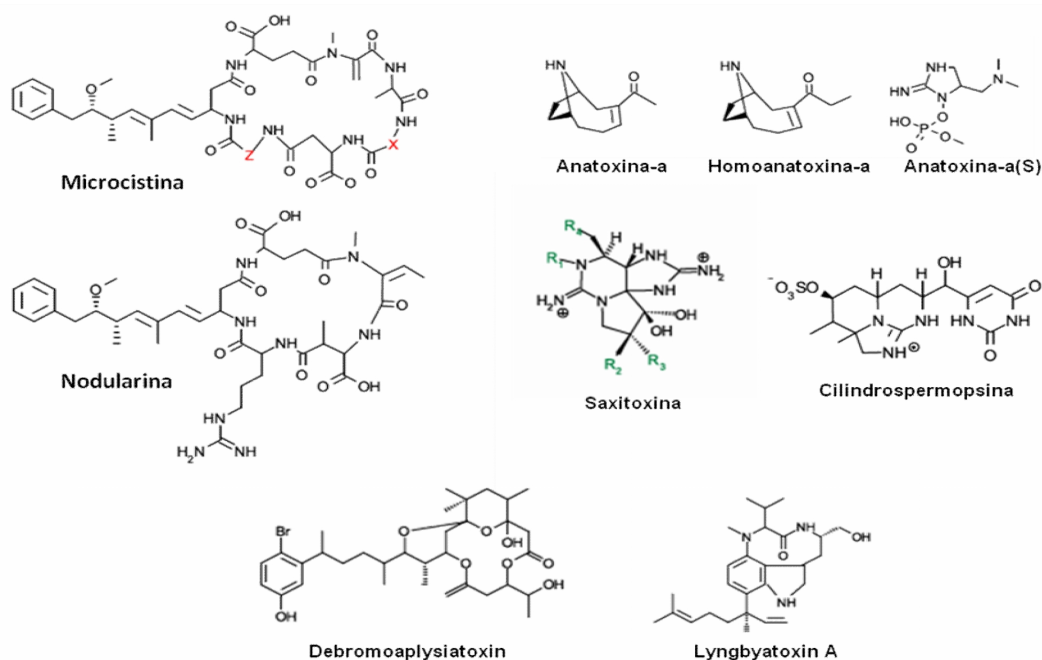


Figura 1: Estruturas químicas das principais cianotoxinas (desenhado com auxílio do software BKchem<sup>®</sup> 0.13.0).

Tabela 1: Relação das cianotoxinas, sua classe química, organismos produtores, mecanismo de ação, toxicidade e sintomatologia da exposição aguda (CHORUS; BARTRAM, 1998; FALCONER, 2005; VAN APELDOORN et al., 2007; JAMES et al., 2008; PEGRAM et al., 2008)

Toxina	Organismos Produtores (Gêneros)	Mecanismo de ação	DL50 *	Sintomatologia a exposição aguda
Microcistinas	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Oscillatoria</i>	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	50 - >1200 µg/Kg i.p. ratos	Prostração ao, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Nodularinas	<i>Nodularia</i>	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	30 – 50 µg/Kg i.p. ratos	Prostração, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Saxitoxinas (PSPs)	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> e também algumas espécies de dinoflagelados	Bloqueio dos canais de sódio	10 µg/Kg i.p. ratos	Paralisia progressiva dos músculos, diminuição dos movimentos, exagerada respiração abdominal, cianose, convulsão, parada respiratória e morte.
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i>	Agonista nicotínico irreversível	200 – 250 µg/Kg i.p. ratos	Paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão, morte por asfixia.
Anatoxina-a (S)	<i>Anabaena</i>	Inibição da acetilcolinesterase	20 µg/Kg i.p. ratos	Paralisia progressiva, fraqueza muscular, diminuição da frequência respiratória e convulsões. Salivação intensa. Morte ocorre por falência respiratória.
Cilindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Anabaena</i> .	Inibição da síntese proteica	2100 µg/Kg i.p. ratos em 24h; e 200 µg/Kg i.p. ratos em 72h	Desestruturação e necrose do fígado, danos em células renais, cardíacas, pulmonares e também da mucosa gástrica.
Dermatotoxinas	Cianobactérias em geral	Induz inflamação e também resposta imune do tipo IgE	-	Dermatites em geral e prurido. Irritação nos olhos, pele, febre tontura, fadiga e gastroenterite.
Lyngbyatoxina	<i>Lyngbya majuscula</i>	Efeitos gastrointestinais	250 µg/Kg i.p. ratos	Aumento da secreção gástrica, promove a inflamação, edema pulmonar, irritação gastrointestinal e promoção de tumor dérmico.
Aplysiatoxina	<i>Stylocheilus longicauda</i> , <i>Lyngbya majuscula</i>	Potentes promotores de tumor e ativa a proteína quinase C	-	Irritação gastrointestinal.
Debromoaplysiatoxina	<i>Schizotrix calcicola</i> e <i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Potentes promotores de tumor e ativa a proteína quinase C	-	Irritação gastrointestinal.

\* A DL<sub>50</sub> representa o valor da dose de toxina letal a 50% dos animais expostos. Representada por µg de toxina/Kg de peso corpóreo. (i.p. – via de administração intra peritoneal).

## 2 CLASSES DE CIANOTOXINAS

## 2.1 HEPATOTOXINAS

As cianotoxinas classificadas como hepatotoxinas são os peptídeos cíclicos: microcistina e nodularina. Ambas são famílias de toxinas de cianobactérias mais comumente encontradas em florações em todo o mundo (CHORUS; BARTRAM, 1998).

### 2.1.1 Microcistinas

As microcistinas (MCs) constituem uma família de cianotoxinas, que são hepatotóxicas e produzidas por diversos gêneros de cianobactérias, como *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* (cianobactéria terrestre), *Synechocystis* e *Lyngbya* (DAWSON, 1998; MSAGATI et al., 2006; SIVONEN, 2006).

A primeira microcistina (MC) foi descrita por Bishop e colaboradores em 1959, a partir de uma cultura da cepa *Microcystis aeruginosa* NRC-1 e era chamada de *Microcystis fast death factor* ou fator de morte rápida de *Microcystis* (BISHOP et al., 1959). Outros nomes já foram usados para designar as microcistinas, tais como: *cyanoginosin*, *aeroginosin* e *microcystis toxin* (KONST et al., 1965; ELLEMAN et al., 1978; BOTES et al., 1982). Somente em 1988, Carmichael e colaboradores, a fim de padronizar a nomenclatura, propuseram o termo *microcystin* ou em português microcistina, além de enfatizarem o útil aspecto do uso do sufixo alfabético (XY) indicando os aminoácidos que mais variam na estrutura da molécula (CARMICHAEL et al., 1988).

A microcistina é um heptapeptídeo cíclico com massa molecular variando entre 895 a 1150 Da. Foram reportadas até o momento 95 variantes desta molécula (BORTOLI; VOLMER, 2014), mas especula-se que este número pode ser maior.

A estrutura básica da microcistina é a sua forma mais encontrada na natureza e pode ser denominada como ciclo (D-Ala<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>). Essa estrutura envolve cinco aminoácidos praticamente invariáveis, D-alanina (1), *D-MeAsp* (ácido D-metilaspártico) (3), *Adda* (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6dienóico) (5), ácido D-glutâmico (6) e *Mdha* (N-metildeidroalanina) (7). E dois L-aminoácidos variáveis *X* e *Z* (2 e 4). Além de diferentes radicais nos aminoácidos das posições (3) e (7), *R*<sup>1</sup> e *R*<sup>2</sup> que podem ser H (hidrogênio) ou CH<sub>3</sub> (grupamento metil) (CHORUS; BARTRAM, 1998; SIVONEN, 2006).

A presença do aminoácido *Adda* é bastante característica desses compostos. Este aminoácido é formado por vinte carbonos e essencial à toxicidade da molécula. Outra particularidade é a presença de *D*-aminoácidos. Estes estereoisômeros dos comumente encontrados *L*-aminoácidos, são não proteinogênicos, ou seja, não são sintetizados como os outros peptídeos e proteínas durante a tradução do RNA mensageiro pelos ribossomos (FUREY et al., 2008), mas através de grandes complexos enzimáticos de síntese de peptídeos e policetídeos, os NRPKS (*non-ribosomal peptide synthetase*) e PKS (*polyketide synthetase*) (TILLET et al., 2000).

A principal diferença entre as variantes da microcistina é a toxicidade. Diferentes variações na posição dos aminoácidos, desmetilações e isômeros de aminoácidos atribuem diferente toxicidade às moléculas, como pode ser visto na Tabela 2.

### 2.1.2 Nodularinas

A nodularina é também uma classe de hepatotoxinas, produzida principalmente pela *Nodularia spumigena* (MSAGATI et al., 2006). Geralmente encontrada em regiões estuarinas e de água salobra. A floração desses organismos é um problema em especial para o hemisfério norte, com recorrência anual no Mar Báltico (PEARSON et al., 2010). A nodularina é um pentapeptídeo cíclico cujos aminoácidos são semelhantes aos das microcistinas. Sua estrutura é denominada como ciclo -(D-MeAsp<sup>1</sup>-L-Arg<sup>2</sup>-Adda<sup>3</sup>-D-glutâmico<sup>4</sup>-*Mdhb*<sup>5</sup>), no qual o *Mdhb* é o ácido 2-metilamino-2-butírico. Existem variantes também dessa molécula dependendo dos aminoácidos que se ligam na

sua estrutura na posição 2, ou ainda outras modificações, porém somente 7 variantes foram até agora reportadas (VAN APELDOORN et al., 2007).

**Tabela 2:** Toxicidade de algumas variantes de microcistina (CHORUS; BARTRAM, 1998; FUREY et al., 2008)

Microcistina	Peso molecular	DL <sub>50</sub> *
MC-LR	994	50
[D-Asp <sup>3</sup> ] MC-LR	980	160 - 300
[Dha <sup>7</sup> ] MC-LR	980	250
MC-RR	1037	600
[D-Asp <sup>3</sup> ] MC-RR	1023	250
[Dha <sup>7</sup> ] MC-RR	1023	180
MC-YR	1044	70

\* Toxicidade determinada por via intraperitoneal em ratos ( $\mu\text{g}$  de toxina/kg de peso corpóreo). A DL<sub>50</sub> representa o valor da dose de toxina letal a 50% dos animais expostos.

Os mecanismos de ações dessas toxinas, microcistinas e nodularinas, são os mesmos. A presença do aminoácido Adda é essencial para a expressão da atividade biológica (CARMICHAEL, 1992). O principal mecanismo de ação é a inibição das proteínas fosfatases (PPs) 1 e 2A (PP1 e PP2A) (CHORUS; BARTRAM, 1998; VAN APELDOORN et al., 2007). Essas proteínas têm o papel importante na manutenção da homeostase celular. O radical Mdha das microcistinas se liga covalentemente à cisteína das fosfatases (cys-237 das PP1 cys-266 das PP2A), enquanto o aminoácido raro, ADDA, é responsável pela inibição específica das PPs (MACKINTOSH et al., 1995; DITTMANN; WIEGAND, 2006). A inibição dessas enzimas é resultado de uma interação inicialmente não-covalente mediada pelo Adda com a parte apolar do triptofano das PPs (VAN APELDOORN et al., 2007). A ligação do Mdha oferece estabilidade adicional ao complexo formado, entretanto não é necessária para a inibição enzimática (DITTMANN; WIEGAND, 2006).

Como resultado da inibição das fosfatases, há o aumento da fosforilação das proteínas celulares. Esta é a principal causa de mudanças na morfologia celular, principalmente dos hepatócitos. Os danos às células hepáticas incluem desorganização de citoesqueleto, peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana, fragmentação de DNA, apoptose, dilaceração celular, necrose e sangramento intra-hepático, os quais podem levar a morte por choque hemorrágico (CHORUS; BARTRAM, 1998; DITTMANN; WIEGAND, 2006; KUJBIDA et al., 2008).

A hiperfosforilação também pode ser o mecanismo responsável pela promoção de tumores devido a: (i) formação de nódulos nos hepatócitos associados às mudanças morfológicas e (ii) inativação dos produtos dos genes supressores de tumor (retinoblastoma e P53) (DITTMANN; WIEGAND, 2006; CAMPOS; VASCONCELOS, 2010).

Os problemas humanos causados por intoxicação às microcistinas estão mais relacionados com a exposição crônica de baixas concentrações da toxina. Isso ocorre através do consumo de água e alimentos contaminados, tais como: produtos agrícolas, peixes e moluscos. Em todo caso, os efeitos atribuídos a exposição crônica a microcistinas são gastroenterites, outras doenças relacionadas e reações alérgicas. Algumas lesões mais graves são tumores hepáticos e colo-retais (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010; PEARSON et al., 2010).

## 2.2 NEUROTOXINAS

Representadas pelos alcalóides tal como anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s). Outro grande grupo de toxinas também neurotóxicas, são as saxitoxinas, alcalóides carbamatos divididos em três classes distintas: as não sulfatadas, que são as saxitoxinas propriamente ditas; as mono sulfatadas – gonialtoxinas e as dissulfatadas - C toxinas (VAN APELDOORN et al., 2007).

O mecanismo de ação geral das neurotoxinas produzidas por cianobactérias é interromper a propagação normal do estímulo nervoso aos músculos, causando desse modo paralisia muscular e possível morte por falência respiratória (CHORUS; BARTRAM, 1998; VAN APELDOORN et al.,

2007). Os alvos das neurotoxinas produzidas por cianobactérias incluem: (i) sinapses colinérgicas: anatoxina-a e homoanatoxina-a, ambas são potentes agonistas nicotínicos de receptores da acetilcolina musculares e neuronais; a anatoxina-a(S) é um potente inibidor irreversível da acetilcolinesterase; (ii) canais de sódio: as saxitoxinas são um grande grupo de neurotoxinas que bloqueiam os canais de sódio voltagem dependentes. Outras neurotoxinas, mais recentemente estudadas como alguns lipopeptídeos purificados de cianobactérias marinhas, kalkitoxina e jamaicamidas também parecem ser bloqueadoras dos canais de sódio. Ainda neste sentido, supõe-se que o aminoácido BMAA (*L*-beta-*N*-metilamina) pode estar associado ao desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica e Parkinsonismo, ambas são doenças neurodegenerativas, porém tanto o fato deste aminoácido ser produzido por cianobactérias, quanto sua atividade neurotóxica ainda são bastante discutidos (ARAOZ et al., 2010).

### 2.2.1 Anatoxina-a e Homoanatoxina-a

Anteriormente à identificação da anatoxina-a, a mesma era reportada como VFDF (*very fast death factor* ou fator de morte muito rápida) nos casos de fatalidade de animais observados e relacionados como induzidos por cianobactérias (JAMES et al., 2008). Primeiramente isolada de uma cepa de *Anabaena flos-aquae* no Canadá, esta toxina é um alcalóide de baixo peso molecular, com a estrutura química de uma amina secundária bicíclica produzida exclusivamente pelas cianobactérias (PEARSON et al., 2010). Sua molécula denominada de 2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene, é um análogo estrutural da cocaína. Outros países, como Finlândia, Irlanda, Escócia, Itália, Alemanha e Japão também já detectaram sua presença. A anatoxina-a é produzida por diversas espécies de *Anabaena* sp (*A. planctônica*, *A. spiroides*, *A. circinalis*), *Oscillatoria* sp, *Cylindrospermum* sp e *Aphanizomenon* sp. Também foi detectada em pequenas concentrações em uma cepa de *Microcystis* sp (VAN APELDOORN et al., 2007).

O homólogo desta toxina, a homoanatoxina-a, cuja estrutura é 2-(propano-1-oxo-1-il) 9-azabicyclo [4.2.1] non-2-eno (VAN APELDOORN et al., 2007) foi primeiramente isolada na Noruega da cianobactéria *Oscillatoria formosum* e também na Irlanda da *Anabaena* sp (ARAOZ et al., 2010). Outras espécies produtoras desta toxina são: *Raphidiopsis* sp e *Phormidium* sp (VAN APELDOORN et al., 2007). Namikoshi e colaboradores encontraram em 2003 uma cepa de *Raphidiopsis* sp produtora de anatoxina-a, homoanatoxina-a e uma nova variante dessa última, a 4-hidroxi-homoanatoxina-a, que demonstrou não ser tóxica como as anteriores, em doses de até 2 mg/kg em ratos por via intraperitoneal (NAMIKOSHI et al., 2003).

A proliferação maciça de cianobactérias produtoras de anatoxina-a e homoanatoxina-a próxima a margens de lagos e rios provou ser fatal para animais selvagens e domésticos, como exemplo vacas no Canadá, cães na Escócia, França e Nova Zelândia e flamingos no Quênia (ARAOZ et al., 2010). A anatoxina-a foi encontrada em suplementos alimentares a base de *Spirulina* sp tanto para alimentação animal (pássaros e peixes), quanto para humanos. Portanto, o controle de qualidade para produtos alimentares a base de cianobactérias deve ser mais severo, a fim de se prevenir possíveis efeitos tóxicos causados por esta toxina tanto aos animais quanto aos humanos (RELLAN et al., 2009).

O mecanismo de ação da anatoxina-a é bloquear a transmissão elétrica neuronal. A toxina é um potente agente bloqueador neuromuscular, cuja estrutura é um isômero ótico da nicotina e, portanto se liga aos receptores nicotínicos da acetilcolina, causando estimulação persistente, uma vez que a toxina não é degradada pelas acetilcolinesterases. Esta ligação aos receptores nicotínicos induz a abertura dos canais receptores de íons positivos, permitindo a passagem dos mesmos. Isto resulta na despolarização da membrana e a exposição prolongada causa dessensibilização dos receptores nicotínicos, com estimulação permanente e consequente bloqueio da transmissão elétrica neuromuscular (ARAOZ et al., 2010). Como a transmissão de estímulos é essencial para a atividade da musculatura esquelética, altas doses o suficiente pode causar paralisia muscular levando a morte por asfixia (VAN APELDOORN et al., 2007). A toxina é rapidamente absorvida quando ingerida e a toxicidade aguda é caracterizada por rápida paralisia dos músculos esqueléticos e respiratórios,

resultando em tremores, alterações no andar, convulsões e morte por falência respiratória (ROGERS et al., 2005). Outros efeitos observados à exposição de doses sub letais em ratos foram alterações da pressão arterial, frequência cardíaca e trocas gasosas, causando hipóxia e diminuição da frequência respiratória, severa acidose e morte (ARAOZ et al., 2010).

A homoanatoxina-a demonstrou ser um potente análogo da anatoxina-a (ARAOZ et al., 2010). Também é um potente agente bloqueador neuromuscular que aumenta o fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nos terminais nervosos colinérgicos (RODRIGUEZ et al., 2006a; VAN APELDOORN et al., 2007).

### 2.2.2 Anatoxinas-a(S)

A anatoxina-a(S) foi primeiramente identificada numa cepa de *Anabaena flos-aquae* nativa de lagos da América do Norte e *Anabaena lemmermanii* (JAMES et al., 2008). Posteriormente foi encontrada em cepas Brasileiras de *Anabaena spiroides* (MOLICA et al., 2005) e reclassificadas como *Anabaena oumiana* (WERNER; LAUGHINGHOUSE, 2009).

Estruturalmente a anatoxina-a(S) não é relacionada com a anatoxina-a. A anatoxina-a(S) é um organofosforado natural, cuja atividade é semelhante aos organofosforados e inseticidas carbamatos como o paroxon, fisostigmina e piridostigmina e também ao gás sarin. Os sintomas observados na intoxicação por anatoxina-a(S) são semelhantes aos da anatoxina-a, incluindo novos sinais como salivação intensa, excesso de lacrimação em camundongos, ratos e galinhas e ainda cromodacriorréia em ratos. Portanto, essa toxina foi nomeada como anatoxina-a(S), sendo este S a designação para salivação (JAMES et al., 2008).

Sua estrutura química é um éster fosfato metil hidroxiguanidina e o mecanismo de ação desta toxina é a inibição irreversível da acetilcolinesterase, o que por sua vez promove o bloqueio dos estímulos nervosos e musculares, causando falência respiratória e morte (VAN APELDOORN et al., 2007).

Esta toxina foi detectada em diversos lugares do mundo, como América do Norte, Dinamarca (JAMES et al., 2008) e também no Brasil em cepas isoladas de um reservatório em Recife usado para abastecimento público que se mostraram inibidoras de acetilcolinesterase (MOLICA et al., 2005).

### 2.2.3 PSPs (Paralytic Shellfish Poisoning)

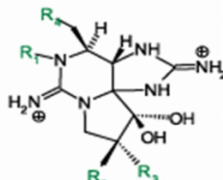
*Paralytic Shellfish Poisoning* (PSPs) é uma classe de toxinas que possuem uma estrutura tricíclica única com anéis de hidropurinas. Todas as toxinas que compõem esta classe compartilham a característica de serem alcalóides carbamatos, podendo ser: (i) alcalóides carbamatos não sulfatados – saxitoxinas e neosaxitoxinas; (ii) monosulfatados – goniatoxinas ou (iii) dissulfatados – toxinas-C. Ainda existem os derivados decarbamoil dc(-), que podem estar presentes nas variantes monossulfatadas e não sulfatadas. As principais variações desta molécula estão esquematizadas na Figura 2. Várias novas toxinas, como *Lyngbya-wollei* toxins (LWTXs) que também fazem parte desta classe, foram identificadas em cepas de cianobactérias (VAN APELDOORN et al., 2007).

As saxitoxinas são produzidas tanto por cianobactérias quanto por dinoflagelados marinhos. Geralmente estão associadas às florações de dinoflagelados marinhos e foi primeiramente purificado do marisco *Saxidomus giganteus* no Alasca, em 1957, outras espécies de dinoflagelados também demonstraram ser produtores de saxitoxinas, tais como *Alexandrium* (*A. andersoni*, *A. cantanella*, *A. excavatum*, *A. fundyense*, *A. minutum*, *A. ostenfeldii*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichi*), *Gymnodinium catenatum* e *Pyrodinium bahamense* (ARAOZ et al., 2010). As florações destes organismos já levaram a maciça mortandade de peixes e outros animais, bem como a contaminação de recursos hídricos. Tipicamente, as saxitoxinas acumulam na cadeia alimentar em organismos consumidos pelos homens como frutos do mar (mariscos e ostras). Esses organismos se alimentam do fitoplâncton e são resistentes à toxina, por isso acumulam grandes concentrações de PSPs. Estima-se que ocorram 2000 casos de intoxicação em humanos por ano, com uma taxa de

mortalidade de 15% em todo o mundo (PEARSON et al., 2010). A maior epidemia atribuída a exposição às PSPs ocorreu em 1987, na Guatemala, onde 187 pessoas foram afetadas e 26 delas foram a óbito (RODRIGUE et al., 1990).

As PSPs são produzidas por diferentes espécies de cianobactérias, tais como *Anabaena sp* (*A. circinalis*, *A. lemmermanii*, *A. perturbata*, *A. flos-aquae*, *A. spiroides*), *Cylindrospermopsis sp* (*C. raciborskii*), *Planktothrix sp*, *Lyngbya wollei*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *A. isatschenkoii*. Já foram reportadas em diversos lugares do mundo, como América do Norte, Austrália, Brasil, Dinamarca e Itália (VAN APELDOORN et al., 2007).

O mecanismo de ação desta classe de cianotoxinas é o mesmo para todas as variantes, e idêntico ao da tetrodotoxina, uma toxina marinha produzida pela família *Tetraodontiformes*, cujo representante baiacu é bastante consumido pelos seres humanos, principalmente na região asiática. São consideradas neurotoxinas, pois a transmissão nervosa é bloqueada quando a porção guanidínica da toxina se liga ao sítio 1 dos canais de sódio voltagem dependentes dos neurônios, impedindo sua abertura e induzindo a paralisia muscular (KALAITZIS et al, 2011).



Toxina	Variação química			
	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	CONH <sub>2</sub>
GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>
GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>
GTX5	H	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C3	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
C4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Neo STX	OH	H	H	CONH <sub>2</sub>
GTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>
GTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>
GTX6 (B2)	OH	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
dcSTX	H	H	H	H
dcneoSTX	OH	H	H	H
dcGTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H
dcGTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H

Figura 2: Estrutura química da Saxitoxina e os radicais que denominam suas possíveis variações. Alcalóides carbamatos não sulfatados, saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO); Alcalóides carbamatos monossulfatados, goniautoxina (GTX1 – GTX4); Alcalóides carbamatos dissulfatados (C), toxina N-sulfocarbamail (B1); Derivados decarbamoil - toxinas decarbamail (dcGTX2,dc GTX3 e dcSTX) (DIENER et al., 2006).

Os sintomas que seguem a exposição geralmente se iniciam após 30 minutos e começam com o formigamento ou queimação nos lábios, língua e garganta, evoluindo para total dormência do rosto. Outros sintomas incluem sudorese, vômitos e diarreia. Nos casos de intoxicação aguda, a dormência pode se espalhar para o pescoço e extremidades progredindo para fraqueza muscular, perda da coordenação motora e finalmente paralisia. Doses letais de saxitoxina geralmente resultam em falência cardiorrespiratória devido à paralisia muscular. Até agora não existe antídoto para a intoxicação por saxitoxinas e o tratamento aplicado nos primeiros estágios da intoxicação é a remoção da toxina ainda não absorvida com o uso de carvão ativado e respiração artificial. A meia vida da toxina no organismo é cerca de 90 minutos e as chances de sobrevivência aumentam significativamente se o tratamento for iniciado até 12 h da exposição (PEARSON et al., 2010).

## 2.3 CITOTOXINA

### 2.3.1 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina é um alcalóide tricíclico, cuja estrutura molecular é composta por uma guanina tricíclica combinada com um hidroximetiluracil (VAN APELDOORN et al., 2007). São



conhecidos dois análogos da molécula, a 7-deoxicilindrospermopsina e a 7-epicilindrospermopsina (VAN APELDOORN et al., 2007; PEARSON et al., 2010). Diferentes espécies de cianobactérias já foram reportadas como produtoras desta toxina, tais como: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata*, *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica* e *Lyngbya wollei* (PEARSON et al., 2010).

Esta toxina foi descoberta em 1979 em extratos de *Cylindrospermopsis raciborskii* provenientes do reservatório de Solomon em Palm Island, Queensland, Austrália ao se investigar uma epidemia, até então com causas não identificadas, que levou 148 pessoas serem hospitalizadas com hepatenterite. Os estudos realizados com esses extratos demonstraram em animais os mesmos sintomas observados na população exposta (GRIFFITHS; SAKER, 2003).

O efeito dessa toxina nos organismos é devido a sua citotoxicidade e ocorrem por duas maneiras: (i) inibição da síntese protéica e (ii) efeito do metabólito tóxico gerado após a biotransformação no sistema do citocromo P450 (FALCONER, 2005).

A toxina cilindrospermopsina sem alteração causa inibição da síntese de proteínas na etapa de alongação durante a tradução ribossomal. A presença do radical hidroximetil na uracila promove a possibilidade de ligação do hidrogênio com a adenina (por pareamento de bases) nos RNAs mensageiro, tradutor e ribossomal. Os metabólitos gerados a partir da biotransformação da cilindrospermopsina pelo citocromo P450 causam morte celular. Culturas de hepatócitos tratados com cilindrospermopsina mostram ser dose e tempo dependentes. Há perda da viabilidade celular calculada pela saída de lactato desidrogenase, o que indica perda da integridade da membrana celular. A mudança celular observada é o arredondamento de células de aderência anteriormente planas das monocamadas lipídicas e também irregularidades de contorno (HUMPAGE; FALCONER, 2003). Para determinar a possibilidade dos metabólitos da cilindrospermopsina serem os responsáveis pelas alterações e morte celular, enquanto a toxina inalterada é responsável pela inibição da síntese protéica, foram realizados experimentos com substâncias sabidamente inibidoras do citocromo P450, tais como, -nafoflavona, cimetidina e cetoconazol em culturas de hepatócitos de ratos. A adição de inibidores do citocromo P450 proporcionou proteção às células impedindo a morte celular. Confirma-se assim que a toxicidade da cilindrospermopsina sobre as células requer uma etapa de biotransformação para gerar o metabólito tóxico. O aumento da toxicidade observada ao decorrer do tempo (7 dias) provavelmente reflete a inibição da síntese protéica, enquanto o metabólito tóxico é responsável pela toxicidade imediata (observada dentro de 8h a 24h) (FALCONER, 2005).

## 2.4 OUTRAS TOXINAS

Outras toxinas, como a aplysiatoxina, uma bislactona fenólica, que é encontrada na cianobactéria *Lyngbya majuscula* e no seu maior predador, a lesma do mar *Stylocheilus longicauda*. A debromoaplysiatoxina é encontrada na *Schizothrix calcícola* e *Oscillatoria nigroviridis*. E ainda a lyngbiatoxina-a é encontrada em diferentes espécies de *Lyngbya*, cuja estrutura é idêntica ao isômero da teleocidina-A, encontrada no micélio do actinomiceto *Streptomyces* sp.

Ainda existem as toxinas lipopolissacarídicas (LPSs) que são constituintes da membrana externa tanto de cianobactérias quanto de bactérias gram-negativas heterotróficas e podem ser responsáveis por gastroenterites e dermatites em humanos (NICHOLSON; BURCH, 2001; VAN APELDOORN et al., 2007).

## 3 HISTÓRICO E OCORRÊNCIAS

É difícil apurar a primeira ocorrência de floração de cianobactérias, justamente por elas estarem entre os primeiros organismos vivos do planeta. Apesar da falta de evidências, existe uma forte especulação sobre a primeira das dez pragas do Egito: “e todas as águas do rio se transformaram em sangue” (Exodus, 7:20) (BÍBLIA, 2002). Uma possível explicação a este fato é a

ocorrência de um bloom de fitoplâncton (maré vermelha) que explicaria as pragas seguintes (NORTON; LYONS, 2002).

O primeiro relato de intoxicação de animais por cianobactérias data de 1878, no sul da Austrália no lago Alexandrina. Onde se observou a formação incomum de uma espuma em todo o reservatório, o que causou a morte de ovelhas, cavalos, porcos, patos e cães (FRANCIS, 1878). Outros casos relacionados com cianotoxinas em todo o mundo são reportados e relatam exposição de animais que bebem diretamente da água contaminada, sofrendo os sintomas de intoxicação e até mesmo óbito. Há casos relacionados às exposições de origem recreativa, quando as pessoas entram em contato direto com as cianotoxinas ao se banharem em águas com altas concentrações de cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1998).

Em fevereiro de 1996, em Caruaru, no Estado de Pernambuco, 110 pacientes apresentaram sintomas de intoxicação por hepatotoxinas após tratamento de hemodiálise de rotina. Subsequentemente 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda e 76 deles morreram. Em outubro de 1997, 53 destas mortes foram atribuídas a “Síndrome de Caruaru”. As vítimas foram intoxicadas pela água oriunda de um açude contaminada com microcistinas (JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998). A média do valor da concentração de microcistinas encontrada no tecido hepático de 39 das vítimas que entraram em óbito entre Fevereiro e Dezembro era 233 ng/g. A concentração estimada de microcistina na água de origem foi de 19,5 µg/l, levando-se em consideração os 120 litros de água necessários para realizar um tratamento de hemodiálise padrão e também, assumindo-se que 100% da toxina passa intacta através do sistema de filtragem (CARMICHAEL et al., 2001). Os sinais e sintomas observados nos pacientes intoxicados foram distúrbios visuais (90% dos pacientes afetados), náusea e vômito (73%), dores de cabeça (65%), fraqueza muscular (54%), dor epigástrica (46%) confusão (30%), sangramento nasal e do trato gastrointestinal (27%). Este foi o primeiro relato de um episódio de epidemia fatal de exposição à microcistina (FALCONER; HUMPAGE, 2005).

Outra ocorrência no Brasil, relacionada à presença de cianobactérias na água utilizada para consumo humano, aconteceu em 1988 na represa de Itaparica, região de Paulo Afonso na Bahia. Cerca de 2000 casos de gastroenterite foram relatados e resultaram na morte de 88 pessoas num período de 42 dias (TEIXEIRA et al., 1993).

#### 4 LEGISLAÇÃO

Frente a este cenário e à potencialidade tóxica das cianobactérias, o Ministério da Saúde brasileiro lançou a portaria número 2914 em 12 de dezembro de 2011. Esta portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e padrão de potabilidade.

As instituições fiscalizadoras são responsáveis pela realização do monitoramento de cianobactérias nas águas de mananciais. Segundo o capítulo VI (dos planos de amostragem), artigo 40º, §1º, o monitoramento de cianobactérias deve identificar os diferentes gêneros no ponto de captação e segundo o Anexo XI deve obedecer frequência mensal quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL e semanal quando o número de cianobactérias exceder este valor, acompanhadas de análises de cianotoxinas. No capítulo V (do padrão e potabilidade) o artigo 37º, define que a água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam risco à saúde e cianotoxinas. No tocante às cianotoxinas, o Anexo VIII determina como valor máximo permitido de 1 µg/l para microcistina, sendo este valor representado como o somatório das concentrações de todas as variantes detectadas e 3 µg de equivalente de saxitoxina por litro. Sendo que essas concentrações devem representar as contribuições das frações intra e extracelulares nas amostras analisadas. Esse artigo ainda estabelece como complemento que quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores de cilindropermopsina ou anatoxina-a(S) recomenda-se a análise da referida cianotoxina, observando valor máximo aceitável de 1 µg/L de cilindropermopsina, porém não se refere a concentração de anatoxina-a(S), somente recomendando-se a análise da presença da mesma (BRASIL, 2011).

Esta Portaria ainda preconiza que as técnicas para análise e metodologias analíticas para a determinações dos parâmetros previstos na portaria devem atender normas como: (i) *Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater* da APHA (*American Public Health Association*) e WEF (*Water Environment Federation*); (ii) *United States Environmental protection Agency* (USEPA); (iii) normas publicadas pela International Standartization Organization (ISO); e (iv) metodologias propostas Organização Mundial da Saúde (OMS).

Finalmente, esta nova portaria nº 2914 em seu capítulo VIII, artigo 53º revoga a portaria nº 518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004) que estabelecia os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, padrão de potabilidade entre outros.

Outros países também adotaram a indicação da OMS na sua publicação de 1998 referida anteriormente que compila vários estudos sobre as cianobactérias e defende um valor provisório para o monitoramento de microcistina-LR como 1 µg/l em água destinada ao abastecimento público. A justificativa para esse valor ser provisório, é o fato de ser específico para a variante MC-LR, pelos dados toxicológicos ainda serem limitados para as outras variantes. Na Tabela 3 podem ser observadas as concentrações de cianotoxinas monitorados em diferentes países.

**Tabela 3:** Valores das concentrações de diferentes cianotoxinas adotados para o monitoramento em diversos países (BURCH, 2008; BRASIL, 2011)

País	Cianotoxina
Brasil	1 µg/L MCs 3 µg de equivalente de STX/L
África do Sul	0 – 0,8 µg/L MC
Austrália	1,3 µg/L MC-LR ou equivalente
Canadá	1,5 µg/L MC-LR
China, Coréia, França, Japão, Noruega, Polônia e República Tcheca	1 µg/L MC-LR
Espanha	1 µg/L MCs
Itália	0,84 µg/L MCs
Nova Zelândia	6 µg/L anatoxina; 1 µg/L anatoxina-a(S); 1 µg/L cilindrospermopsina; 2 µg/L homoanatoxina-a; 1 µg/L MC-LR ou equivalente; 1 µg/L nodularina e 3 µg/L STX ou equivalente.

MC – microcistina; MCs – microcistinas (refere-se a somatória das variantes encontradas); STX - saxitoxina

## 5 EXPOSIÇÃO

A exposição humana e possível intoxicação por cianotoxinas são maiores quanto maior for a proliferação e lise das células de cianobactérias. A intoxicação pode ocorrer por diferentes vias: (i) ao beber a água contaminada; (ii) durante o uso recreacional da água, principalmente na presença de floração, através do contato da pele e também ao beber a água não intencionalmente; (iii) pela inalação de partículas em aerossol, potencialmente possível durante duchas, ao praticar esportes aquáticos, como esquí ou semelhante; (iv) pelo consumo de alimentos expostos à uma floração de cianobactérias, sejam peixes, frutos do mar ou semelhante e; (v) por hemodiálise, se a água não for propriamente tratada (CHORUS; BARTRAM, 1998).

## 6 TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DE RISCO À MICROCISTINA

A microcistina é a cianotoxina mais freqüentemente encontrada e reportada em todo o mundo. E por isso, é também a mais estudada. Estudos da exposição crônica à microcistina-LR foram realizados através da repetida administração oral da toxina em várias concentrações em ratos. O NOAEL (*no observed adverse effect level*), ou seja, nível ou concentração no qual não foram observados efeitos adversos, determinado foi 40 µg/kg peso corpóreo em ratos. Em doses maiores

foi observadas mudanças no fígado dos animais expostos, com degeneração do tecido e também outras desordens envolvendo as enzimas hepáticas. O LOAEL (*lowest observed adverse effect level*), ou seja, o menor nível ou concentração no qual se observou efeitos adversos foi determinado em porcos na concentração de 100 µg/kg (DITTMANN; WIEGAND, 2006).

Pela alta frequência e ampla ocorrência de florações de cianobactérias produtoras de toxinas hepatotóxicas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou a necessidade do monitoramento de microcistinas durante o processo de garantia da qualidade da água. Com o propósito de estabelecer um valor de referência, a OMS levou em consideração dados de intoxicação sub-crônica em ratos e também porcos. O NOAEL observado para ratos machos foi usado para calcular a IDT (ingestão diária tolerável) (Equação 1) a fim de se estabelecer limites seguros para o consumo humano. Além disso, é incorporada a fórmula fatores de segurança que garantem a incerteza entre as espécies (ratos e humanos) (10), a variabilidade da sensibilidade entre os indivíduos (10) e também a variação de inadequação de dados (10):

$$IDT = \frac{NOAEL (40\mu\text{g}/\text{kg} (pc))}{10 \times 10 \times 10} = 0,04 \mu\text{g}/\text{kg} \quad (\text{Equação 1})$$

Portanto, a ingestão diária tolerável é 0,04 µg/kg (peso corpóreo) por dia.

A partir deste valor, levando-se em consideração uma pessoa de 60 kg e ainda assumindo que 0,8 é o valor padrão de consumo de água e suplemento alimentar e ainda padronizando uma ingestão de 2 L de água por dia, calcula-se o valor de referência (VR) para microcistina (Equação 2):

$$VR = \frac{0,04 \times 60 \times 0,8}{2} = 0,96 \mu\text{g}/\text{l} \sim 1 \mu\text{g}/\text{l} \quad (\text{Equação 2})$$

Muitos países adotaram esta recomendação da OMS para o monitoramento das cianobactérias e cianotoxinas no processo da avaliação da qualidade da água. O Governo Brasileiro estabeleceu na portaria nº 518 de 25 de março de 2004 o mesmo valor de referência proposto pela OMS (CHORUS; BARTRAM, 1998).

## 7 PRINCIPAIS MÉTODOS DE DETECÇÃO

São dois os métodos geralmente empregados na detecção e quantificação das cianotoxinas: (i) ensaios de *screening* (rastreamento, reconhecimento ou varredura) biológicos ou bioquímicos e (ii) métodos físico-químicos. O princípio do método de detecção, informação resultante da análise, bem como a simplicidade e/ou complexidade do método são as principais características que diferem os dois grupos de ensaio citados anteriormente. A escolha da técnica empregada dependerá da disponibilidade e experiência com o método em questão, bem como o tipo de informação requerida. Os critérios mais importantes e que devem ser avaliados antes da escolha da técnica empregada é seletividade e sensibilidade (MSAGATI et al., 2006).

Seletividade é um parâmetro de validação dos métodos analíticos e biológicos que diz respeito ao poder do método de detectar somente o analito ou cianotoxina em questão e não outros interferentes. Quanto mais exclusivo for a detecção do método, mais seletivo ele será. A sensibilidade é outro parâmetro também utilizado na validação de métodos analíticos que diz respeito à concentração do analito ou cianotoxina detectada. Quanto menor for concentração detectada mais sensível é o método (INMETRO, 2007). Uma comparação entre a sensibilidade e seletividade de diferentes métodos de detecção pode ser vista na Figura 3.

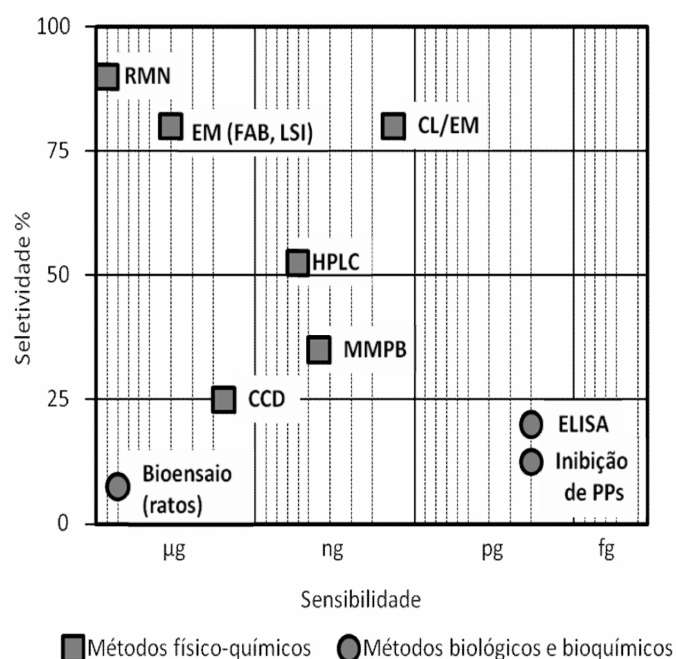
A microscopia ótica é realizada para a identificação da morfologia e também contagem do número de organismos. É o método tradicionalmente utilizado para o monitoramento dos reservatórios de água destinados ao abastecimento público. A observação por microscopia ótica é o primeiro contato com as amostras e serve de ponto de partida para outras investigações e análises (PEGRAM et al., 2008).

## 7.1 MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE VARREDURA

### 7.1.1 Bioensaio em ratos ou camundongos

Nos bioensaios realizados em ratos ou camundongos, o material (muitas vezes o extrato bruto) é administrado via injeção peritoneal no animal escolhido. Este método foi amplamente utilizado para se determinar a toxicidade de material proveniente de florações, apresentando um resultado qualitativo de, por exemplo, uma floração ser ou não tóxica. Dependendo da resposta e sintomatologia apresentada pelo animal exposto também é possível identificar a classe de toxina.

As principais limitações deste ensaio são: (i) em relação à concentração da amostra analisada, este teste é impraticável em concentrações de 1 a 2 µg/l; (ii) muitos países hoje em dia não permitem testes em animais, salvo sob licença e em número restrito.



**Figura 3:** Relação entre sensibilidade e seletividade de alguns dos métodos empregados na detecção e quantificação das cianotoxinas. RMN: Ressonância Magnética Nuclear; ES: Espectrometria de Massas (FAB – Fast Atom Bombardment e LSI – Secondary Ion Mass Spectrometry); CL/EM – Cromatografia a líquido acoplada a Espectrometria de Massas; HPLC: Cromatografia a líquido de Alta Eficiência; MMPB: método do 2-metil-3-metoxi-4-ácido-fenilbutírico; CCD – Cromatografia em Camada Delgada; ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (CHORUS; BARTRAM, 1998; MSAGATI et al., 2006).

### 7.1.2 ELISA

Amplamente utilizado como método de *screening* (varredura), o ELISA, ou enzima imuno ensaio, foi desenvolvido para a detecção de microcistinas e provou ser um método muito sensível. O método se baseia no reconhecimento dos peptídeos por anticorpos monoclonais. Alguns anticorpos desenvolvidos para uma toxina específica, como por exemplo, a microcistina-LA também reconhece outras variantes desta toxina, o que torna o método pouco seletivo. É bastante utilizado em amostras ambientais e é um ótimo método de varredura, pois detecta pequenas concentrações de microcistinas (MSAGATI et al., 2006).

### 7.1.3 Ensaio de inibição de proteína fosfatase

Este método de detecção foi desenvolvido para a detecção e quantificação de microcistinas e nodularinas. Baseia-se no mecanismo de ação destas cianotoxinas, que é a inibição das porções

serina e treonina das proteínas fosfatases 1 e 2A, cuja consequência direta é a hiperfosforilação intracelular.

A extensão da inibição dessas enzimas é relacionada com a hepatotoxicidade dessa classe de toxinas e pode ser usada como uma medida da concentração das mesmas. O princípio do método é a utilização de substrato com  $^{32}\text{P}$  radiomarcado. As principais limitações deste método estão relacionadas à pequena meia vida do isótopo  $^{32}\text{P}$  e a indisponibilidade comercial das proteínas, o que requer procedimentos sofisticados para sua preparação, além do alto custo associado (MSAGATI et al., 2006).

Existem pelo menos duas variações dos ensaios de inibição: ensaios colorimétricos e fluorescentes. Esses ensaios usam substratos como *p*-nitrofenil fosfato e podem ser utilizados em associação com imunoenaios, como o Elisa, o que torna a determinação altamente sensível e específica (MSAGATI et al., 2006).

## 7.2 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

Estes métodos analíticos se baseiam nas propriedades físico-químicas das cianotoxinas, como a presença de cromóforos ultravioletas nas suas estruturas e também pesos moleculares.

### 7.2.1 HPLC - High Pressure Liquid Chromatography ou CLAE - Cromatografia a líquido de alta eficiência

Procedimentos amplamente reportados e utilizados nos dias atuais para a separação, identificação e quantificação das cianotoxinas empregam o uso do HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Diferentes fases móveis e estacionárias são utilizadas dependendo das propriedades físico-químicas das toxinas analisadas e têm a finalidade de separar os compostos. Essa separação resulta em um cromatograma, onde os picos formados são analisados de acordo com seus tempos de retenção e intensidade, possibilitando sua identificação. Os meios de detecção de compostos individuais estão acoplados ao sistema de separação (o HPLC) e os mais utilizados são: UV/Vis (absorbâncias em ultravioleta e visível) e PDA (arranjo fotodiodo) (MSAGATI et al., 2006).

O método de detecção de UV/Vis é o mais comumente empregado para o monitoramento de microcistinas após a separação cromatográfica. A maioria das microcistinas e também nodularinas tem a máxima absorção de luz ultravioleta a 238 nm, o que torna possível a detecção dessas moléculas por este método. Entretanto, algumas variantes da microcistina que contêm aminoácidos aromáticos, como o triptofano possuem absorbâncias máximas em 222 nm. Os principais problemas encontrados ao se utilizar este método é a possibilidade de co-eluição de outros compostos presentes no extrato com variantes da microcistina, como é o caso de alguns produtos provenientes de materiais plásticos, promovendo resultados errôneos e superestimação de concentrações. Outro problema é a incapacidade do método de diferenciar as variantes estruturais da microcistina (MSAGATI et al., 2006).

Por outro lado, a detecção por arranjo fotodiodo provê uma melhor detecção da microcistina por empregar um espectro completo, quando em comparação com o UV/Vis que utiliza somente um comprimento de onda. Por este método de detecção, limites menores que 1 µg/l para variantes da microcistina são detectados se a amostra for previamente concentrada e submetida a processos de purificação, como a extração em fase sólida (MSAGATI et al., 2006).

Para se quantificar as microcistinas é necessário o conhecimento prévio da variante detectada e a realização de uma curva de calibração com seu padrão analítico respectivo, o qual por sua vez é bastante caro e de difícil obtenção por importação por se tratar de substância classificada com risco associado (JAMES et al., 2008).

Diferentes toxinas são analisadas por HPLC, tais como microcistina, cilindropermopsina, saxitoxina e suas variantes (CHORUS; BARTRAM, 1998). Ainda por este método pode-se detectar anatoxina-a, homoanatoxina-a (JAMES et al., 2008).

### 7.2.2 LC-MS – Liquid Chromatography and Mass Spectrometry ou CL-EM -Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas

Quando se necessita da confirmação e identificação da cianotoxina analisada, um método mais avançado e sofisticado como o LC-MS pode ser empregado. Este método provê a melhor solução para identificação, pois usa como ferramenta de detecção, além da prévia separação pela cromatografia a líquido, a identificação dos íons gerados pela fragmentação das moléculas, produzindo desta maneira um espectro de massas. Portanto, este método permite a separação e identificação simultânea de compostos (MSAGATI et al., 2006).

O LC-MS pode contar com o emprego de diversos métodos de ionização, tais como FAB (*fast atom bombardment*), Maldi (*matrix-assisted laser desorption*), eletrospray, entre outros (FUREY et al., 2008). O LC-MS pode alcançar limites de detecção de até 0,02 µg/l (MSAGATI et al., 2006).

Em 2004, Yuan e Carmichael descreveram um método aplicando o SELDI TOF-MS (*surface-enhanced laser desorption-ionization time off light – mass spectrometry*) que detectou diferentes microcistinas e também nodularina com sensibilidade em concentrações na faixa femtomolar. Este método baseia-se em aprisionar o analito, no caso as cianotoxinas em um chip contendo um anticorpo de alta afinidade e específico, e utilizando um feixe de laser para então liberar e ionizar o analito, introduzindo-o diretamente no espectrômetro de massas (YUAN; CARMICHAEL, 2004).

Muitas toxinas podem ser detectadas e quantificadas pelo método de cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas, como microcistinas e suas variantes, nodularinas, saxitoxinas, cillindropermopsina e anatoxina-a (HILLER et al., 2007).

### 7.2.3 Cromatografia a gás

A cromatografia a gás também é um método de separação de compostos, porém é necessário que o analito investigado seja volátil. Para isso algumas vezes são usados artifícios, como agentes derivatizantes que tornam os analitos voláteis ou aumentam sua volatilidade. Dois métodos de detecção são geralmente utilizados: (i) detecção por captura de elétrons e (ii) a espectrometria de massas. Ambos os métodos são altamente sensíveis e resultam alto grau de confiabilidade para a análise (JAMES et al., 2008).

Para a detecção por captura de elétrons é necessário que os analitos conttenham substituintes halogenados em sua estrutura molecular. Quando isso não ocorre, como no caso da anatoxina-a, o extrato a ser analisado é derivatizado com reagentes contendo múltiplos átomos de halogênio, tornando a detecção possível. Já no caso da detecção por espectrometria de massas, a derivatização dos analitos, como a anatoxina-a, reduz a degradação causada pelas altas temperaturas utilizadas pelo método, ao mesmo tempo promove o aumento da volatilidade do composto de interesse, geralmente resultando em um padrão de fragmentação mais elaborado (JAMES et al., 2008).

Este método mostrou-se bastante eficiente tanto pela especificidade quanto sensibilidade nas análises de anatoxina-a, alcançando limites de detecção de até 2 ng/ml (RODRIGUEZ et al., 2006b).

## 7.3 OUTROS MÉTODOS DE DETECÇÃO

Outros métodos de detecção compreendem várias diferentes técnicas e princípios, como a cromatografia em camada delgada, um método analítico cujo princípio também é a separação de compostos. É uma técnica relativamente simples e inexpressiva, muito utilizada em décadas atrás como um método de *screening*, identificação e isolamento de cianotoxinas. Apesar de permitir análises de múltiplas amostras ao mesmo tempo é uma técnica semiquantitativa, na qual todas as amostras que sejam consideradas positivas para cianotoxinas devem ser analisadas por outro método para confirmação (JAMES et al., 2008).

Outro método bastante específico é o chamado *MMPB* (ácido 2-metil-3-metóxi-4-fenilbutírico) é um método físico-químico desenvolvido para detectar microcistinas e muito utilizado

para a detecção desta toxina em sedimentos, uma vez que a extração da microcistina em sedimento, por técnicas convencionais é bastante difícil. Baseia-se na formação do composto *mmpb* como produto de oxidação da microcistina por ozonólise e a posterior detecção do *mmpb* por espectrometria de massas. É bastante útil nos estudos de detoxificação da microcistina e sua adsorção no sedimento em amostras ambientais (TSUJI et al., 2001).

Ensaio de inibição da acetilcolinesterase são usados na detecção da anatoxina-a(S). O princípio do método se baseia no mecanismo de ação da toxina que é a inibição desta enzima. É possível determinar porcentagem de inibição da enzima. É um teste bioquímico bastante confiável para a detecção da anatoxina-a(S) (DORR et al., 2009).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é utilizado para a determinação estrutural de compostos e aplicado também na detecção ou identificação de cianotoxinas. Pode ser utilizado para a determinação de cianotoxinas conhecidas ou não e a principal limitação é que requer grandes concentrações de amostras (mg) e as mesmas devem estar purificadas (MSAGATI et al., 2006).

## REFERÊNCIAS

- ANTONIOU, M. G.; CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. Cyanotoxins: new generation of water contaminants. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, n. 9, p. 1239-1243, 2005.
- ARAOZ, R.; MOLGO, J.; DE MARSAC, N. T. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 5, p. 813-828, 2010.
- BÍBLIA. **Exodus**: 7: 20. São Paulo: Paulus, 2002.
- BISHOP, C. T.; ANET, E. F.; GORHAM, P. R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 453-471, 1959.
- BOTES, D. P.; KRUGER, H.; VILJOEN, C. C. Isolation and characterization of 4 toxins from the blue-green-alga, *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 20, n. 6, p. 945-954, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BORTOLI, S.; VOLMER, D. Characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1-19, 2014.
- BURCH, M. D. Effective doses, guidelines and regulations. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: Springer Science, 2008.
- CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 268-287, 2010.
- CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S.; AN, J. S.; MOLICA, R. J. R.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.
- CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; KRISHNAMURTHY, T.; JUAN, W. Y.; MOORE, R. E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 3, 1988.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3. ed. Geneva: WHO - World Health Organization, 1998.
- DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953-962, 1998.



- DIENER, M.; ERLER, K.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 2, p. 147-151, Dec. 2006.
- DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins--occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 50, n. 1, p. 7-17, Jan. 2006.
- DORR, F. A.; RODRIGUEZ, V.; MOLICA, R.; HENRIKSEN, P.; KROCK, B.; PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 92-99, 2009.
- ELLEMAN, T. C.; FALCONER, I. R.; JACKSON, A. R. B.; RUNNEGAR, M. T. Isolation, characterization and pathology of toxin from a *Microcystis aeruginosa* (*Anacystis cyanea*) bloom. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 209-218, 1978.
- FALCONER, I. R. Cylindrospermopsis Toxicity. In: FALCONER, I. R. (Ed.). **Cyanobacterial toxins of drinking water supplies**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43-50, Apr. 2005.
- FRANCIS, G. Poisonous Australian Lake. **Nature**, v. 18, p. 2, 1878.
- FUREY, A.; ALLIS, O.; ORTEA, P. M.; LEHANE, M.; JAMES, K. J. Hepatotoxins: context and chemical determination. In: BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection**. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- GRIFFITHS, D. J.; SAKER, M. L. The palm island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 78-93, 2003.
- HILLER, S.; KROCK, B.; CEMBELLA, A.; LUCKAS, B. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1238-1250, 2007.
- HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I. R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 94-103, 2003.
- INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007.
- JAMES, K. J.; DAUPHARD, J. C.; FUREY, A. Cyanobacterial neurotoxins, anatoxin-a and analogues: detection and analysis. In: BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection**. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. D.; DE MELO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.
- KALAITZIS, J. A.; CHAU, R.; KOHLI, G. S.; MURRAY, S. A.; NEILAN, B. A. Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants. **Toxicon**, v. 56, n. 2, p. 244-258, 2011.
- KONST, H.; MCKERCHE, P. D.; GORHAM, P. R.; ROBERTSO, A.; HOWELL, J. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 29, n. 9, p. 221-228, 1965.
- KUJBIDA, P.; RODRIGUEZ, V. C. S.; PINTO, E. Cianobactérias e microalgas tóxicas em ambientes aquáticos. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 225-240.
- LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 7, p. 727-736, 2004.

- MACKINTOSH, R. W.; DALBY, K. N.; CAMPBELL, D. G.; COHEN, P. T. W.; COHEN, P.; MACKINTOSH, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Letters**, v. 371, n. 3, p. 236-240, 1995.
- MOLICA, R. J. R.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. C.; COSTA, A.; CUNHA, M. C. C.; MELO, G. L.; AZEVEDO, S. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, n. 4, p. 743-753, 2005.
- MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 4, p. 382-397, 2006.
- NAMIKOSHI, M.; MURAKAMI, T.; WATANABE, M. F.; ODA, T.; YAMADA, J.; TSUJIMURA, S.; NAGAI, H.; OISHI, S. Simultaneous production of homoanatoxin-a, antitoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 533-538, 2003.
- NICHOLSON, B. C.; BURCH, M. D. **Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines**. Canberra: Commonwealth of Australia, 2001.
- NORTON, S. A.; LYONS, C. Blister beetles and the ten plagues. **Lancet**, v. 359, n. 9321, p. 1950-1950, Jun. 2002.
- PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1650-1680, 2010.
- PEGRAM, R.; RUNNEGAR, M.; PFLUGMACHER, S.; HUMPAGE, A. R.; NICHOLS, T.; ETHERIDGE, S.; NEILAN, B.; THACKER, R.; LOVE, A. Cyanotoxins workgroup report. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: United States Environmental Protection Agency Papers and Springer, 2008.
- POURIA, S.; DE ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, n. 9121, p. 21-26, 1998.
- RELLAN, S.; OSSWALD, J.; SAKER, M.; GAGO-MARTINEZ, A.; VASCONCELOS, V. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2189-2195, 2009.
- RODRIGUEZ, D. C.; ETZEL, R. A.; HALL, S.; DE PORRAS, E.; VELASQUEZ, O. H.; TAUXE, R. V.; KILBOURNE, E. M.; BLAKE, P. A. Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 4, 1990.
- RODRIGUEZ, V.; MOURA, S.; PINTO, E.; PEREIRA, C. M. P.; BRAGA, R. C. Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, 2006a.
- RODRIGUEZ, V.; YONAMINE, M.; PINTO, E. Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 5, 2006b.
- ROGERS, E. H.; HUNTER, E. S.; MOSER, V. C.; PHILLIPS, P. M.; HERKOVITS, J.; MUNOZ, L.; HALL, L. L.; CHERNOFF, N. Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 25, n. 6, p. 527-534, 2005.
- SIVONEN, K. Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, v. 35, n. 6, p. 6, 2006.
- TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S. P.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v. 27, n. 3, p. 9; 1993.
- TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.
- TSUJI, K.; MASUI, H.; UEMURA, H.; MORI, Y.; HARADA, K. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. **Toxicon**, v. 39, p. 5, 2001.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J.; BAKKER, G. J. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007.

WERNER, V. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Bloom-forming and other planktonic *Anabaena* (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 89, n. 1-2, p. 17-47, 2009.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W. Detection and analysis of the cyanobacterial peptide hepatotoxins microcystin and nodularin using SELDI-TOF mass spectrometry. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 561-570, 2004.