

SÍLVIA PEDROSO MELEGARI

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO TÓXICA DA
SAXITOXINA E AVALIAÇÃO DE SUA ADSORÇÃO EM
MATERIAIS ALTERNATIVOS PARA APLICAÇÃO EM
SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental, área de concentração Toxicologia Ambiental.

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.
Co-orientadora: Prof^a. Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto, Dr^a.

**FLORIANÓPOLIS
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M519e Melegari, Silvia Pedroso

Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água [tese] / Silvia Pedroso Melegari ; orientador, William Gerson Matias, co-orientadora, Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto. - Florianópolis, SC, 2010.
205 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia ambiental. 2. Saxitoxina. 3. células Vero. 4. Toxicologia genética. 5. Adsorção. 6. Quitina. I. Matias, William Gerson. II. Pinto, Cátia Regina Silva de Carvalho. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

CDU 628.4



TERMO DE APROVAÇÃO

“Estudos de mecanismos de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água”


Sílvia Pedroso Melegari

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:


Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)


Prof. Ramon Lucas Dalsasso, Dr.


Prof.ª Maria Angeles Lobo Reccio, Dra.


Prof. Edmond Creppy, Dr.


Prof. João Sarkis Yunes, Dr.


Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

Prof. Flávio Rubens Lapolli
(Coordenador PPGEA)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
OUTUBRO/2010.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amor, José Ricardo, companheiro e melhor amigo. Agradeço por estar ao meu lado, pelo seu incentivo e admiração e por acreditar e confiar em mim. Amo você!

Aos meus pais, Zelindo e Izaura, pelo exemplo de vida. Não posso vê-los, mas sinto vocês comigo, me iluminando e me guardando! Amo vocês para sempre!

Ao Professor Dr. William Gerson Matias, pela orientação, amizade e confiança em meu trabalho!

Ao Professor Dr. Edmond Ekué Creppy, por me acolher em seu laboratório, pela confiança e pelas valiosas contribuições neste estudo!

À Professora e amiga Dra. Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto, pela coorientação, pela amizade e pela enorme paciência em seus ensinamentos.

Ao Dr. Serge Moukha e ao Dr. Theophile Mobio, pela paciência em repartirem seus conhecimentos e pelas valiosas contribuições neste estudo.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento e suporte desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, pelos serviços prestados, pelo comprometimento e pelo esforço para a conclusão desta tese!

A todos os amigos do LABTOX e do LIMA que, direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para que esse trabalho pudesse ser concluído. Obrigada, meus amigos!

À minha família: meus irmãos Angélica, Luciane e Luis Fernando; meus sobrinhos Karol, Manu, Ri, Luis, Gabi, Pê, Yuri e Tatá; minha sogra Luiza; minhas cunhadas Deinha, Bu e Dami, e meus cunhados Cleiton e Osmar! Obrigada pelo amor e carinho! Obrigada por acreditarem em mim!

E, acima de tudo, a Deus, pela vida, pela boa saúde e pela oportunidade que me foi oferecida.

RESUMO

Entre os diversos problemas de saúde pública ligados ao abastecimento de água, a contaminação de mananciais de água doce por cianotoxinas tem sido muito enfatizada devido ao risco toxicológico que representa. Assim, este assunto tornou-se preocupante e é cada vez mais estudado pela comunidade científica, pois compromete a qualidade das águas destinada ao consumo humano, atingindo conjuntos de organismos muito além da comunidade aquática. A saxitoxina (STX) é uma neurotoxina produzida pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, que compõe a biota da Lagoa do Peri, um dos principais mananciais de abastecimento de água para o Município de Florianópolis-SC. Este estudo investigou o mecanismo de ação da STX por meio de métodos toxicológicos *in vitro*, além de verificar a capacidade de adsorção de conchas de ostra e quitina à STX. Os testes citotóxicos e genotóxicos *in vitro*, realizados para avaliar a ação da STX sobre células Neuro 2A (N2A) e Vero, foram os testes do MTT, a fragmentação e a metilação do DNA, a lipoperoxidação e a frequência de células micronucleadas. Os ensaios de adsorção deram-se com o emprego de conchas de ostras trituradas e quitina, como matrizes adsorventes para a verificação da capacidade de adsorção da STX em soluções aquosas. Para a quantificação da STX, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos nas avaliações toxicológicas demonstraram que a STX possui um potencial efeito citotóxico e genotóxico, pois induziu as células N2A à apoptose, à fragmentação e à hipermetilação do DNA, além de causar a oxidação lipídica da membrana celular. Nessas avaliações toxicológicas ainda foi possível verificar o potencial da STX à indução de formação de micronúcleos em células N2A e Vero, com evidências dos efeitos de origem aneugênica. Nos ensaios de adsorção, foi possível verificar que a concha de ostra e a quitina foram eficientes para remoção da STX (>60% em 48h) em amostras da água, na escala de concentrações empregadas neste estudo.

Palavras-Chave: saxitoxina, células Neuro-2A, células Vero, efeito citotóxico e genotóxico, adsorção, concha de ostra, quitina.

ABSTRACT

Amongst the diverse problems of public health on the water supply, the contamination of fresh water sources from cyanotoxins had been emphasized due toxicological risk. Thus, this subject that concern more and more studied by the scientific community, therefore compromises the waters quality destined to the human consumption, reaching organisms beyond the aquatic community. The saxitoxin (STX) is a neurotoxin produced in blooms of *Cylindrospermopsis raciborski*, cyanobacteria that composes the biota of Peri Lagoon - Florianópolis/SC. This study evaluated the mechanism of action of STX through toxicology methods *in vitro*, besides verifying the absorption capacity of oyster shell and chitin to STX. To evaluate the action of STX in Neuro 2A (N2A) and Vero cells, the cytotoxic and genotoxic *in vitro* essays employed were: MTT assay, DNA methylation and fragmentation, lipid peroxidation and frequency of micronucleated cells. From the adsorption essays were employed oyster shells powdered and chitin as adsorbents matrices and verifying the capacity of absorption of STX soluble to these adsorbents. The quantification of STX was for high performance liquid chromatography (HPLC). The results of toxicological evaluation showed that STX had a potential cytotoxic and genotoxic effects. The STX' exposure induced to N2A cells to cellular apoptosis, DNA fragmentation and methylation and lipid oxidation of cellular membrane. The toxicological evaluation demonstrated that STX induced to the N2A and Vero cells exposed to micronuclei formation, with evidenced to aneugenic effects. The adsorption assays verified that oyster shell and chitin were efficient to remove the STX (>60% in 48h) from water samples, in the concentrations scale employed in this study.

Keywords: Saxitoxin (STX), Neuro 2A cells, Vero cells, cytotoxic and genotoxic effects, adsorption, oyster shell, chitin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Vista panorâmica do Parque da Lagoa do Peri (Fonte: Oliveira, 2002).....	38
Figura 3.2: Estruturas químicas das toxinas paralisantes de molusco (PSP).....	41
Figura 3.3: Estrutura da saxitoxina (STX).....	41
Figura 3.4: Peroxidação da saxitoxina.....	45
Figura 3.5: Mecanismo de metilação do DNA. A 5–metilcitosina é produzida pela ação das DNA-metiltransferases (DNMT 1, 3a ou 3b) que catalisam a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono na posição 5 da citosina.....	48
Figura 3.6: Fragmentação do DNA após tratamento de células Caco2 ao ácido domóico. 1: marcador DNA (“Ladder”); 2: controle; 3:15ng/mL; 4: 30ng/mL; 5:60ng/mL; 6:100ng/mL (Carvalho Pinto-Silva, 2005).....	50
Figura 3.7: Esquema simplificado da lipoperoxidação, com a formação do malondialdeído e o aduto com a guanina, M1G.....	51
Figura 3.8: Fotomicrografia da concha de ostra calcinada (Fonte: Silva, 2007).....	55
Figura 3.9: Fotomicrografia de amostras de quitina proveniente da carapaça do camarão (1300X) (Fonte: Antonino, 2007).....	56
Figura 5.1: Perfil dose-resposta da STX em células N2A na presença e ausência de O/V. Viabilidade celular (%)±DP v. Concentração de STX em nM. Condição “Sem O/V”: $R^2=0,997$; condição “Com O/V”:: $R^2= 0,9904$	70
Figure 5.2: Fragmentação do DNA de células N2A extraído após exposição à STX. O DNA foi isolado de células N2A expostas e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% nas seguintes concentrações: 1: Ladder 1000 kpb, 2: OTA (ocratoxina)10µM, 3: 3,0nM, 4: 1,5nM; 5: 0,8nM 6: Controle negativo com antibiótico e 7: Controle negativo sem antibiótico.....	72
Figura 5.3: % de DNA fragmentado para células expostas à STX, obtido pela análise da imagem do gel.....	73
Figura 5.4: % m5dC com relação a quantidade total de citosina (dC+m5dC) das amostras do DNA extraídas de células N2A expostas por 24 horas, para os controles negativo e positivo e as diferentes concentrações de STX empregadas.....	74

Figura 5.5: Lipoperoxidação induzida pelo aumento da concentração de STX em células N2A avaliando o efeito da ausência e presença de diferentes antioxidantes, com dosagem da quantidade de MDA produzido, após 24 horas de incubação (*diferença significativa com relação à células não tratadas com STX para $p < 0.05$, e ** com relação ao controle positivo para $p < 0.05$).....	80
Figura 5.6: Perfil dose-resposta da STX em células N2A e Vero, pela viabilidade celular v. concentração STX ($R^2=0,997$ para células N2A e $R^2=0,964$ para células Vero).....	86
Figura 5.7: Número de células BNMN induzidas pela STX (0,38; 0,75; 1,50; 3,00 nM) sobre 1000 células binucleadas (BN) N2A e Vero após 24 horas de exposição. A colchicina foi empregada como controle positivo. Os resultados estão expressos como média de três experimentos \pm DP (n = 3).....	87
Figura 5.8: Células N2A coradas com “acridine orange” e brometo de etídio (Aumento: 1000x) A: controle célula BN; B: célula BNMN.	88
Figura 5.9: Processo cinético de adsorção da STX em quitina e pó de concha. Condições: 10 μ M STX, 200mg de adsorvente, pH 5,0 e 25°C.....	92
Figura 5.10: Processo cinético de adsorção da STX em quitina e pó de concha. Condições: 10 μ M STX, 200mg de adsorvente, pH 7,0 e 25°C.....	93
Figura 5.11: Isotermas de adsorção Lin e N-Lin (respect.) de STX em quitina e pó de concha de ostra à 25°C e pH 5,0.....	96
Figura 5.12: Isotermas de adsorção Lin e N-Lin (respect.) de STX em quitina e pó de concha de ostra à 25°C e pH 7,0.....	97
Figura A1: Curva de calibração do método empregado para quantificação da STX nos testes de adsorção.	128
Figura A2: Cromatograma do padrão da STX 50 μ g/L.....	128
Figura A3: Curva de calibração do método empregado para quantificação da citosina e 5-metilcitosina no ensaio de metilação do DNA.....	130
Figura A4: Cromatograma da mistura dos padrões empregados para a quantificação da citosina e 5-metilcitosina (12,5 μ g/mL).....	130
Figura A5: Curva de calibração do método empregado para quantificação do MDA no ensaio de lipoperoxidação.....	132

Figura A6: Cromatograma do padrão do MDA(60nM - t_R : 4,58 min).	132
Figura A7: Curva de calibração do método empregado para quantificação da proteína BSA no ensaio de lipoperoxidação.	134
Figura A8: Esquema de diluição em cascata da STX na microplaca de 96 poços para os ensaios citotóxicos do MTT.....	135
Figura A9: Esquema de diluição em cascata da STX na microplaca de 24 poços para os ensaios de lipoperoxidação e micronúcleo.....	136
Figura A10: Esquema de diluição em cascata da STX na microplaca de 6 poços para os ensaios de fragmentação e metilação do DNA.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Condições para determinação de STX em HPLC com detector de Fluorescência. (AOAC, 2005).	68
Tabela 5.1: Lipoperoxidação medida pela % do aumento na produção do MDA com relação ao controle.....	81
Tabela 5.2: Parâmetros obtidos pelas isotermas de adsorção da STX nas diferentes condições analisadas.. Error! Bookmark not defined.	
Tabela 5.3: Valores de ΔG_{ads} para a STX para os adsorventes testados nos pH 5,0 e 7,0.	98
Tabela A1: Dados para a construção da curva de calibração da STX.	127
Tabela A2: Dados para a construção da curva de calibração da citosina e 5-metilcitosina.	129
Tabela A3: Dados para a construção da curva de calibração MDA.	131
Tabela A4: Dados para a construção da curva de calibração BSA.	133

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*
ASP: *Aminesic Shellfish Poisoning*
BNMN: *binucleated micronucleated cells*
CASAN: Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CAT: catalase
CBMN: *Cytokinesis-block micronucleus assay*
COL: Colchicina
CytB: Citocalasina B
DMSO: Dimetil-sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DSP: *Diarrheic Shellfish Poisoning*
EC50: Concentração efetiva 50%
ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FISH: Hibridização *in situ* por Fluorescência
FD: *Fluorescence detector*
GPx: glutationa peroxidase
GSH: glutationa reduzida
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ISOC-HAB: *International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms*
LABTOX: Laboratório de Toxicologia Ambiental
LIMA: Laboratório Integrado do Meio Ambiente
Lin: Linear
LMP: *Low Melting Point*
LPO: Lipoperoxidação
MBA: *Mouse Bioassay*
MDA: Malondialdeído
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MN: *micronucleus/ micronuclei*
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol il-2,5-difeniltetrazólio)
N-Lin: Não-Linear
NMP: *Normal Melting Point*
NRC: *National Research Council Canada*
NSP: *Neurotoxic Shellfish Poisoning*

O/V: ouabaína/veratridina
OMS: Organização Mundial de Saúde
PBS: *Phosphate Buffered Saline* – Tampão salino de fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
PSP: *Paralytic Shellfish Poisoning*
ROS: *Reactive Oxygen Species*
RNA: Ácido ribonucleico
RNase A: Ribonuclease A
RNase T1: Ribonuclease T1
RNS: *Reactive Nitrogen Species*
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SDS: Dodecilsulfato de sódio
SOD: Superóxido dismutase
STX: Saxitoxina
TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico
USEPA: *United State Environmental Protection Agency*
UV: ultravioleta
VitE: Vitamina E
VitC: Vitamina C
VMP: Valor máximo permitido
v.: versus
WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	23
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Hipóteses da Pesquisa	29
1.1.1. Primeira Hipótese	29
1.1.2. Segunda Hipótese	30
1.1.3. Terceira Hipótese	30
1.2. Justificativa da Pesquisa	30
CAPÍTULO II	33
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
CAPÍTULO III	35
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1. Eutrofização Natural e Artificial	35
3.2. Florações de Algas	36
3.3. Cianotoxinas	39
3.3.1. Toxinas “Paralytic Shellfish Poisons” (PSP).....	40
3.3.2. Legislação Brasileira v. Cianotoxinas.....	42
3.3.3. Quantificação da STX.....	44
3.4. Bioensaios para Monitoramento da Citotoxicidade e Genotoxicidade Celular	45
3.4.1. Teste de citotoxicidade: Teste do MTT	46
3.4.2. Teste de Micronúcleo.....	47
3.4.3. Metilação Biológica.....	47
3.4.4. Fragmentação do DNA e Apoptose	49
3.4.5. Lipoperoxidação Biológica.....	50
3.5. Propriedades Químicas dos Adsorventes Empregados na Adsorção da Saxitoxina.....	54
CAPÍTULO IV.....	59
4. METODOLOGIA	59
4.1. Instalações	59
4.2. Ensaios de Citotoxicidade e Genotoxicidade	59
4.2.1. Cultura Celular.....	59
4.2.2. Ensaio do MTT: Determinação da EC50.....	60
4.2.3. Fragmentação e Metilação do DNA	61

4.2.4. Lipoperoxidação: Extração e Quantificação do MDA	63
4.2.5. Teste do Micronúcleo: Bloqueio Citocínético (CBMN).....	65
4.3. Ensaios de Adsorção	66
4.3.1. Materiais Adsorventes	66
4.3.2. Cinéticas e Isotermas de Adsorção	66
4.3.3. Dosagem da Saxitoxina	67
CAPÍTULO V	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1. Resultados do Artigo 1: Ensaio do MTT, Fragmentação e Metilação do DNA	69
5.1.1 Influência de STX na Viabilidade Celular: Ensaio de MTT e Determinação de EC50.....	69
5.1.2. Efeitos de STX na fragmentação do DNA em células N2A	71
5.1.3. Efeitos de STX na metilação do DNA em células N2A	73
5.2. Discussão do Artigo 1	75
5.3. Resultados do artigo 2: Lipoperoxidação e Efeito Protetor de Vitaminas e Enzimas	79
5.3.1. Lipoperoxidação: efeito do estresse oxidativo	79
5.4. Discussão do Artigo 2:	81
5.5. Resultados do Artigo 3: Teste do Micronúcleo.....	85
5.5.1. Influencia da STX na viabilidade celular em Células N2A e Vero: teste do MTT e Determinação da EC50.....	85
5.5.2. Teste do Micronúcleo	87
5.6. Discussão do Artigo 3:	88
5.7. Resultados do Artigo 4: Ensaios de Adsorção	91
5.8. Discussão artigo 4	99
5.9. Considerações Finais para Complementação do Estudo de Caso: Lagoa do Peri	100
CAPÍTULO VI	103
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	103
CAPÍTULO VII	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

CAPÍTULO VIII	127
8. APÊNDICES.....	127
A1. Curva de calibração da STX.....	127
A2. Curva de calibração para quantificação da citosina e 5- metilcitosina	129
A3. Curva de calibração do malondialdeído	131
A4. Curva de calibração para a quantificação de proteínas..	133
A5. Esquema de diluição em cascata da STX nas placas de 96 poços para os ensaios citotóxicos do MTT	135
A6. Esquema de diluição em cascata da STX nas placas de 24 poços para os ensaios do micronúcleo e lipoperoxidação	136
A7. Esquema de diluição em cascata da STX nas placas de 6 poços para os ensaios de fragmentação e metilação do DNA	137
A8. Artigo 1.....	138
A9. Artigo 2.....	159
A10. Artigo 3.....	177
A11. Artigo 4.....	190

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A água é o principal constituinte de todos os organismos vivos. O homem, além de usar a água para suas funções vitais, como o fazem todas as outras espécies de organismos vivos, utiliza os recursos hídricos para um grande conjunto de atividades, tais como, produção de energia, navegação, produção de alimentos, desenvolvimento industrial, agrícola e econômico. De toda a água disponível no planeta, apenas 2,5% são de água doce; e deste percentual, apenas 0,3% pode ser tratada para a utilização como água potável. Este precioso recurso, cada vez mais escasso, vem sendo muito ameaçado por ações antropogênicas (BARATA; CRISPINO, 2006).

A água de má qualidade empobrece as populações locais e de determinadas regiões, interfere na economia regional e destrói alternativas saudáveis de desenvolvimento sustentável. (TUNDISI, 2003). O acelerado desenvolvimento urbano e industrial está submetendo a graves pressões os recursos hídricos. A crescente urbanização no entorno de rios, lagoas e represas vem causando muitos problemas para os ecossistemas aquáticos. É cada vez mais evidente a desestabilização das condições de equilíbrio desses ecossistemas, causada pelo aumento da densidade populacional nestas localidades, ultrapassando o nível da tolerância do ambiente aquático (CARVALHO, 2004).

Certas características dos ambientes aquáticos, como a alta solubilização de compostos orgânicos e inorgânicos, lhes conferem peculiaridades que possibilitam aos organismos, especialmente os autótrofos, a absorção de nutrientes por toda a superfície do corpo; assim sendo, o baixo teor de sais dissolvidos, típico de água doce, faz com que a maioria dos organismos que habitam estes ambientes seja hipertônica com relação ao meio, sendo necessárias, portanto, adaptações no sentido de manter o equilíbrio osmótico entre os líquidos internos e o meio (ESTEVES, 1998).

A diversidade da fauna e da flora das águas continentais é dependente dos mecanismos de funcionamento de rios, lagos, áreas alagadas, represas, como o ciclo hidrológico e a variedade de *habitat* e nichos. O ambiente em que vivemos caracteriza-se por uma vida vegetal muito diversificada da qual depende nossa existência. As plantas verdes, aquáticas e terrestres, são a base da cadeia de alimentos para o reino animal. Cerca de 90% da fotossíntese na Terra é realizada por plantas aquáticas, principalmente algas planctônicas. Certas algas azuis e algumas bactérias podem empregar o nitrogênio gasoso da atmosfera na construção do seu protoplasma e contribuir significativamente para a síntese de compostos nitrogenados na água e no solo onde vivem (fixação de nitrogênio) (BARATA; CRISPINO, 2006).

Os seres humanos não estão isolados de seu ambiente natural; eles estão no topo de muitas cadeias alimentares e há poucos ecossistemas nos quais a espécie humana não está envolvida (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Impactos ao meio ambiente e à saúde humana estão cada vez mais presentes no cotidiano de populações do mundo todo. Dentre as ações antropogênicas que contribuem para tais impactos, a mais preocupante é a descarga de fontes difusas e pontuais de nitrogênio e fósforo nos rios, lagos e represas, a partir de esgotos não tratados e do emprego de fertilizantes que produzem o fenômeno de eutrofização artificial, cujos efeitos ecológicos na saúde humana e nos custos do tratamento de água são relevantes (TUNDISI, 2003).

A eutrofização artificial manifesta-se com a quebra do equilíbrio ecológico. Este processo, causado pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais nos corpos d'água, disponibiliza uma quantidade maior de matéria orgânica que o sistema é capaz de decompor. Esses agentes eutrofizantes (constituídos principalmente de nitrogênio, na forma de nitrato e amônia, e fósforo, na forma de fosfato) estão diretamente relacionados com o processo fotossintético das algas, uma vez que pertencem à estrutura de muitos compostos importantes para o metabolismo da célula vegetal.

O aumento da concentração de nutrientes implica não só o aumento da densidade de algas, mas, também, alterações qualitativas, como o surgimento de novas espécies e o desaparecimento de outras. A poluição de um ambiente aquático envolve, portanto, processos de ordem física, química e biológica. As florações algais, resultado da interação desses fatores físicos, químicos e bióticos, são caracterizadas por um crescimento explosivo, autolimitante e de curta duração dos microorganismos de uma ou poucas espécies, frequentemente produzindo colorações visíveis nos corpos de águas naturais (TORGAN, 1989 *apud* MATTHIENSEN *et al.*, 1999).

A floração de algas tóxicas causa gosto e odor desagradáveis na água e altera o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. Entre as algas que podem causar floração em corpos de águas continentais, destacam-se as cianobactérias que produzem as cianotoxinas. As florações de algas tóxicas em mananciais utilizados para abastecimento público representam um risco potencial aos seus consumidores. As toxinas são altamente solúveis em águas e não podem ser removidas da água por sistema de tratamento convencional (BARTRAM *et al.*, 1999).

A contaminação direta e indireta da água por algas tóxicas e/ou toxinas liberadas em florações tem sido muito relatada em todo mundo (RIEGMAN, 1998; CLOERN, 2001; SUNDA *et al.*, 2006). Estas florações tóxicas se apresentaram prejudiciais não somente para os ecossistemas aquáticos, como também para a saúde humana. Muitos casos, que vão desde intoxicações até a morte, vêm sendo citados na literatura, tanto que se pode observar um aumento significativo na frequência, intensidade e distribuição geográfica dessas florações nas últimas décadas (RESSOM *et al.*, 1994; HALLEGRAEFF *et al.*, 1995; CHORUS; BARTRAM, 1999).

Esta problemática relatada em todo o mundo foi registrada no Brasil por Faria e Cunha (1917). Segundo tais autores, o primeiro episódio de floração de algas no Brasil ocorreu em 1913, na baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro, quando foi observada grande mortandade de peixes. Entretanto, somente

em meados dos anos 80 o fenômeno da floração de algas recebeu estudos mais aprofundados no Brasil. Estudos pioneiros no país têm sido realizados nos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul, como monitoramento do fitoplâncton tóxico, e estudos com cianobactérias de água doce, que afetam os ecossistemas costeiros, aplicando metodologias de bioensaios e cromatografia líquida de alta eficiência.

O estudo do fitoplâncton tóxico no estado do Rio de Janeiro tem sido realizado desde a década de 1970, na região de Cabo Frio (a partir de 1973), e a partir da década de 1980, na baía de Guanabara (desde 1985, com monitoramento semanal) e na baía da Ribeira (desde 1987, com monitoramento mensal) (SAR *et al.*, 2002). No Rio Grande do Sul, desde 1987, florações da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* têm sido registradas e estudadas na Lagoa dos Patos, considerada o segundo maior manancial natural do Brasil (YUNES *et al.*, 2002; YUNES, 2003; MATTHIENSEN *et al.*, 1999).

No estado de Santa Catarina, desde 1994 são realizadas amostragens de fitoplâncton na costa, sendo que já foram encontradas algumas florações de algas potencialmente tóxicas. A partir de 1997 foi estabelecido pelo governo do estado um programa de monitoramento de fitoplâncton tóxico para o desenvolvimento sustentável do cultivo de moluscos numa extensão de 400km do litoral no estado (SAR *et al.*, 2002). Um estudo recente, realizado em parceria pela Universidade Federal de Santa Catarina e o IBAMA, no qual foi monitorada a incidência de fitoplâncton tóxico na costa catarinense e seu impacto na saúde pública e no meio ambiente, apresentou dados preocupantes e confirmam a necessidade de um monitoramento constante. O estudo abrangeu mais de 500km do litoral catarinense e, dos 21 pontos amostrados, 17 apresentaram várias espécies de microalgas tóxicas (CARVALHO PINTO-SILVA, 2005).

A presença dessas algas potencialmente tóxicas preocupa, em especial, pelas toxinas produzidas que, além de serem hepatotóxicas ou neurotóxicas, podem apresentar genotoxicidade, ou seja, podem causar dano celular em nível de DNA, acelerando

ou aumentando o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Ainda no estudo de Carvalho Pinto-Silva (2005) foi comprovado, em ensaios *in vitro*, que a exposição de células de adenocarcinoma de intestino grosso humano (Caco-2) a toxinas marinhas apresentou elevada citotoxicidade e genotoxicidade. Isto indica que essas toxinas diminuem a viabilidade celular, causam danos nas membranas, alterações nos lisossomos, diminuição da atividade metabólica das mitocôndrias e induzem à apoptose (morte celular programada). Parece evidente, portanto, que a monitoração desses efeitos genotóxicos das toxinas seja de interesse fundamental na Toxicologia Ambiental para determinar quais os danos que esta contaminação pode causar em organismos vivos (KIMA; HYUN, 2006; CARVALHO PINTO-SILVA, 2005).

Aponta-se como especialmente crítico o caso de florações de cianobactérias tóxicas em corpos da água utilizados para consumo humano ou para finalidades recreacionais, uma vez que tais eventos podem apresentar sérios riscos de saúde para a população humana. A água segura, destinada ao consumo humano, é um dos fatores mais críticos para garantir a saúde em longo prazo da população. Dependendo das condições climáticas em muitas regiões e da carga de nutriente da agricultura, a comunidade fitoplanctônica presente em reservatórios, lagos e rios é dominada frequentemente por cianobactérias. Os sistemas de tratamento da água não somente têm que reduzir o odor e a cor durante o processo do tratamento de água; devem também eliminar estas células de cianobactérias e as toxinas produzidas por elas (HOEGER *et al.*, 2004).

Um acontecimento que alertou a comunidade científica brasileira e a população em geral foi um incidente de grandes proporções, ocorrido em 1996, em uma clínica de hemodiálise de Caruaru, Pernambuco, onde ocorreu intoxicação humana causada por cianotoxinas que resultou na morte de 76 pacientes intoxicados com hepatotoxinas presentes na água utilizada na hemodiálise. As mortes ocorreram até cinco meses após o início dos sintomas. De acordo com informações fornecidas pela Secretaria de Saúde de Estado de Pernambuco, a referida clínica

recebia água sem um tratamento completo e usualmente era feita uma cloração no próprio caminhão tanque utilizado para transportar a água, em períodos de falha no abastecimento pela rede pública (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001).

Em ambientes aquáticos, as cianotoxinas normalmente permanecem contidas nas células das cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre durante a morte natural, estresse celular, uso de algicidas, como sulfato de cobre ou cloração. Portanto, a ocorrência de espécies potencialmente produtoras dessas substâncias em nossos ambientes aquáticos precisa ser muito bem investigada e monitorada, a fim de evitar danos à saúde animal, humana e do próprio ecossistema. Nesse cenário de risco potencial à saúde, as variáveis cianobactérias e cianotoxinas vêm ganhando espaço em normas relacionadas à saúde e qualidade ambiental no mundo todo (DEBERT *et al.*, 2006).

Com o intuito de minimizar o risco da contaminação de águas destinadas ao consumo humano, diversos países estabeleceram procedimentos para monitorar a presença de cianotoxinas em águas tratadas, porém poucas referências propõem valores limites para cianobactérias e cianotoxinas. A Organização Mundial da Saúde (WHO), por meio do adendo da segunda edição do “*Guidelines for drinking-water quality*” (WHO, 1998), concluiu que não havia dados suficientes que possibilitassem a definição de valores de referência para qualquer outra cianotoxina, além da microcistina-LR. A WHO (1998) recomendou o valor limite máximo para microcistina-LR total (livre mais intracelular) de 1µg/L, considerando a exposição através da água de consumo humano. A terceira e mais recente edição do “*Guidelines for drinking-water quality*” (WHO, 2003) manteve o mesmo valor para microcistina-LR e não apresentou valores para as demais cianotoxinas.

Atualmente, o Brasil é o único país que estabelece limites para densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas em norma nacional, com força de lei (DEBERDT *et al.*, 2006). O Ministério da Saúde estabeleceu, por meio da Portaria nº 518 de

2004, como um dos padrões de potabilidade para substâncias que apresentam riscos à saúde, a microcistina, sendo que o valor máximo permitido (VMP) é de 1µg/L; recomenda, ainda, valores limites para cilindrospermopsina e saxitoxinas (15,0 µg/L e 3,0 µg/L de equivalentes STX/L, respectivamente) em água para consumo humano. Sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder a 20.000 células/mL (2mm³/L de biovolume), será exigida a análise de cianotoxinas ou a comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização de bioensaios em camundongos. Assim, o desenvolvimento dos métodos para reduzir eficazmente concentrações dessas toxinas, mantendo-as abaixo dos níveis aceitáveis, transformou-se num foco importante de esforços atuais da pesquisa.

Entretanto, o estabelecimento normativo de valores limites da presença de cianotoxinas em água potável permite um questionamento: até que ponto estes valores são confiáveis? O que esses valores podem causar a saúde humana? A partir dos fatos relatados, e considerando a problemática da floração de algas tóxicas, tão evidenciada nos últimos tempos, cabe ao presente estudo responder a três hipóteses que são as orientadoras desta investigação científica, as quais serão apresentadas a seguir.

1.1 HIPÓTESES DA PESQUISA

1.1.1 Primeira Hipótese

Baseando-se nas proposições teóricas de que a saxitoxina (STX) é potencialmente tóxica por pertencer a um grupo de toxinas neurotóxicas paralisantes e por sua alta solubilidade em água, havendo evidências significativas da presença de cianobactérias produtoras desta toxina em um manancial de abastecimento público, afirma-se que a STX pode causar efeitos citotóxicos e genotóxicos aos indivíduos expostos a esta toxina.

1.1.2 Segunda Hipótese

Baseando-se no fato de a genotoxicidade ser um processo que produz efeitos precoces de alteração do genoma; nos indícios de que cianotoxinas em concentrações muito baixas induzem a processos genotóxicos; e nos valores recomendados para concentrações de saxitoxinas pela Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (referente aos níveis aceitáveis de presença de cianotoxinas em águas potáveis destinadas a consumo humano), afirma-se que o valor recomendado na Portaria nº 518 do Ministério da Saúde não é seguro, pois valores abaixo do VMP causam efeitos tóxicos em nível celular.

1.1.3 Terceira Hipótese

Baseando-se no fato de a STX ser uma toxina altamente solúvel em água, dificultando, assim, aos sistemas convencionais de tratamento de água sua remoção; e considerando a possibilidade de utilização de materiais naturais que têm demonstrado eficiência de adsorção de diversos materiais de origem natural, afirma-se que a concha de ostra e a quitina podem ser empregadas como adsorventes para a remoção de STX de soluções aquosas.

1.2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A atividade antrópica tem levado a uma crescente contaminação das lagoas costeiras brasileiras. Essa contaminação causa mudanças na qualidade das águas, incluindo redução do oxigênio dissolvido, morte extensiva de peixes e aumento das incidências de florações de algas tóxicas. A Lagoa do Peri, situada na área do Parque da Lagoa do Peri, é o manancial utilizado para abastecer o sul e a costa leste da Ilha de Florianópolis - Santa Catarina. A grande problemática da Lagoa do Peri é a quantidade de algas que dificulta o tratamento da água. Essas algas causam desde obstrução de filtros até a liberação de toxina presentes em algumas espécies. De acordo

com estudos locais, a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* é a dominante absoluta da Lagoa, e vem preocupando a comunidade científica por estar entre as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. São capazes de produzir cianotoxinas que podem ser acumuladas na rede trófica atingindo conjuntos de organismos muito além da comunidade aquática: atingem também a população local que consome esta água. Até o momento, poucos estudos têm investigado a contaminação desta lagoa com toxinas e nenhum estudo ainda foi realizado investigando a genotoxicidade das toxinas presentes na Lagoa do Peri. Diante do exposto, e consciente da gravidade do problema apresentado, este estudo pretende contribuir com a comunidade científica e local, realizando uma avaliação dos efeitos tóxicos da STX, uma neurotoxina presente na Lagoa do Peri – Florianópolis/SC, através de testes de citotoxicidade e genotoxicidade desta toxina. Pretende-se ainda verificar qual a conformidade de valores de concentração de STX com a legislação vigente do Ministério da Saúde.

A crescente preocupação com a disponibilidade de água potável destinada para o abastecimento público vem despertando um interesse geral para este assunto. A Declaração de Direitos Humanos de 1948 (ONU) prevê, no artigo XXV, que: “toda pessoa tem direito a um nível de vida suficiente para lhe assegurar e à sua família a saúde e o bem-estar”. Para assegurar este direito, é imprescindível que a água destinada ao consumo humano atenda a condições mínimas, seja para ingestão, seja para fins higiênicos. Para que a água do manancial não ofereça risco à saúde pública, deve-se impedir sua contaminação, evitando que receba despejo de efluentes domésticos e rejeitos industriais.

O Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC começou a desenvolver a área de toxicologia ambiental, com a criação da Disciplina de Toxicologia Ambiental (Portaria nº168/PREG/96), a partir de setembro de 1996, juntamente com a montagem e o desenvolvimento do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX. As atividades do LABTOX tiveram início em fevereiro de 1997, com o objetivo de dar suporte ao ensino, pesquisa e extensão. Esta estrutura vem sendo utilizada

em estudos científicos no âmbito das florações de algas tóxicas e controle de poluição ambiental. As técnicas desenvolvidas possibilitam introduzir nos diagnósticos de qualidade ambiental, variáveis sobre os efeitos tóxicos e genotóxicos de elementos químicos dispostos no meio ambiente.

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar o mecanismo de ação tóxica da STX e avaliar sua remoção da água por adsorção em diferentes materiais de origem natural.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar uma metodologia analítica utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e detector de fluorescência para quantificação de STX e outros compostos de interesse.
- Avaliar a citotoxicidade (viabilidade celular) da STX utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio)).
- Avaliar os efeitos tóxicos da STX em sistemas genéticos, utilizando os métodos da fragmentação do DNA e o ensaio da frequência de micronúcleo.
- Avaliar os efeitos tóxicos da STX em sistemas epigenéticos, utilizando os métodos da metilação do DNA (dosagem da m5dC) e da lipoperoxidação (dosagem do malondialdeído).
- Comparar os resultados obtidos com as medidas estabelecidas à proteção da saúde humana pela Portaria nº 518, de 2004, do Ministério da Saúde.
- Verificar a capacidade de adsorção da STX a conchas de ostras trituradas e à quitina.

CAPÍTULO III

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo foram feitas breves revisões sobre eutrofização natural e artificial, floração de algas e a sua problemática no local de estudo, a Lagoa do Peri, que é um manancial destinado ao abastecimento público, na Ilha de Santa Catarina. A seguir, foram abordadas, nesta revisão, as cianotoxinas, em especial as da STX, por ser o alvo deste estudo, destacando uma breve revisão sobre a legislação brasileira que regulamenta sua presença em águas destinadas a consumo humano e metodologias para qualificar e quantificar tais toxinas em água. Apresenta-se, ao final, uma revisão sobre alguns bioensaios para monitoramento dos efeitos genotóxicos que estas toxinas causam. Finalizando este capítulo, inserem-se, ainda, algumas informações sobre as propriedades químicas dos adsorventes empregados neste estudo.

3.1 EUTROFIZAÇÃO NATURAL E ARTIFICIAL

Os ecossistemas lacustres são paisagens temporárias que surgem a partir de depressões do terreno, preenchidas de água ao longo do tempo geológico. Podem decorrer milhares de anos até que um lago apresente as condições ideais para a proliferação de peixes e ostente plantas aquáticas superiores, como as que flutuam na superfície d'água. O processo que resulta num aumento de nutrientes essenciais para o fitoplâncton e promove o aumento da produtividade deste ambiente é chamado de eutrofização natural. Essa ação acontece de forma natural, e suas condições passam de oligotróficas a eutróficas, num processo de envelhecimento natural. Arbitariamente, o homem aprendeu a reproduzir o processo natural e, assim, surgiu a eutrofização artificial, também chamada de eutrofização acelerada ou antrópica, da qual resultam impactos ao meio ambiente e à saúde humana, cada vez mais presentes no cotidiano de populações do mundo todo.

Dentre as ações antropogênicas que contribuem para esses impactos, a mais preocupante é a descarga de fontes difusas e pontuais de nitrogênio e fósforo nos rios, lagos e represas. Isso ocorre pelo escoamento, em águas fluviais e lacustres, de esgotos não tratados e de resíduos de fertilizantes que produzem o fenômeno de eutrofização artificial, cujos efeitos ecológicos, na saúde humana e nos custos do tratamento de água, são relevantes.

A eutrofização artificial se manifesta com a quebra do equilíbrio ecológico. Este processo, num breve relato de Carvalho (2004), é causado pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais nos corpos d'água, disponibilizando uma quantidade maior de matéria orgânica que o sistema é capaz de decompor. Estes agentes eutrofizantes (constituídos principalmente de nitrogênio, na forma de nitrato e amônia, e fósforo, na forma de fosfato) estão diretamente relacionados com o processo fotossintético das algas, uma vez que pertencem à estrutura de muitos compostos importantes para o metabolismo da célula vegetal.

3.2 FLORAÇÕES DE ALGAS

A floração de algas consiste num crescimento algal excessivo, o qual pode ser resultado de fenômenos naturais regionais de ocorrência sazonal, mas que, na maioria das vezes, está relacionado a processos de eutrofização artificial causados por excesso de nutrientes vindos de efluentes domésticos, rejeitos industriais e fertilizantes da agricultura. Além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático, a floração de algas pode causar gosto e odor desagradável e modificação da cor das águas. Matias (2002) afirma que esta indução ao *stress* de sistemas ecológicos por meio de importantes poluentes modifica o *habitat*, introduzindo espécies exóticas e removendo as espécies nativas. No entanto, o mais grave é que certas espécies são capazes de produzir cianotoxinas que podem ser acumuladas na rede trófica atingindo conjuntos de organismos muito além da comunidade aquática.

A intoxicação humana por cianotoxinas ocorre pelo contato direto com a pele e mucosas, pela ingestão e pela inalação de água contendo cianobactérias. As cianotoxinas são liberadas para o ambiente quando as células destas cianobactérias se rompem. Essas toxinas não podem ser removidas da água pelos tratamentos convencionais das redes públicas de abastecimento e são resistentes à fervura. Elas são compostas por diversas classes de biomoléculas com função e mecanismos de síntese ainda não totalmente conhecidos. Algumas delas têm efeitos antibióticos contra bactérias ou outras algas. Embora existam mais de 5.000 espécies cianobactérias conhecidas, apenas um pequeno número destas produz toxinas (HALLEGRAEFF *et al.*, 1995).

A presença de florações de cianobactérias em corpos de águas artificiais ou naturais tem sido relatada em todo o mundo (BAND-SCHMIDT *et al.*, 2005; ROBERTSON *et al.*, 2004). No Brasil, muitos dados atualizados têm sido documentados, relatando casos de floração de algas. Como exemplos têm-se corpos de água como a Lagoa de Jacarepaguá, no Rio de Janeiro e a Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul, onde pesquisadores têm confirmado a presença de toxinas em valores consideráveis (TUCCI; SANT'ANNA, 2003, FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2005; MATTHIENSEN *et al.*, 1999).

Estudo de Caso: A Lagoa do Peri

Em Santa Catarina, a Lagoa do Peri, situada na área do Parque da Lagoa do Peri (regulamentada através da Lei Municipal 1.828/81, pelo Decreto Municipal nº 091/82 – IPUF, 1978), é o manancial utilizado pela CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento) para abastecer o sul e a costa leste da Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, no estado de Santa Catarina – Brasil. A Figura 3.1 traz uma vista geral do Parque da Lagoa do Peri, onde podem ser observados a Lagoa e os seus arredores. A forma de agrupamento humano se diferencia no interior do Parque, com comunidades voltadas para atividades agrícolas, associadas à fabricação da farinha de mandioca e da cachaça de cana, e com população da restinga exercendo

diversificada atividade ocupacional (GARCIA, 2002). Além da população local, todas estas atividades em torno da lagoa contribuem para um aumento na quantidade de resíduos gerados (Teive *et al*, 2008). Acredita-se que uma parte considerável deste resíduo é lançada de forma clandestina diretamente na lagoa, contribuindo para alterações nas suas características tróficas.



Figura 3.1: Vista panorâmica do Parque da Lagoa do Peri (Fonte: OLIVEIRA, 2002).

A grande problemática da Lagoa do Peri é a elevada quantidade de algas, o que dificulta o tratamento da água, pois causa desde a obstrução de filtros até a liberação de toxinas presentes em algumas espécies. Para Silveira (2003), os ambientes de água doce são os mais importantes para o crescimento de cianobactérias, visto que a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutroalcalinas (pH 6-9), temperatura entre 15 a 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo.

Em estudos apresentados por NEMAR (Núcleo de Estudos do Mar-UFSC) *apud* Garcia (2002), as espécies algais mais presente em amostras de rede na Lagoa do Peri, foram:

- Cyanophyceae: *Aphanothece comasii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Mycrocystis wesenbergii*, *Planktolyngbya limnetica*, *Pseudanabaena galeata*.
- Bacillariophyceae: *Aulacoseira ambigua*.
- Dinophyceae: *Peridinium volzii*, *Peridinales sp.*
- Chlorophyceae: *Coelastrum polychordum*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, *Monoraphidium irregulare*.

- Zygnemaphyceae: *Cosmarium bioculatum* var. *depressum*, *Staurastrum muticum*, *Staurastrum* sp, *Staurastrum tetracerum*, *Staurodesmus cuspidatus*.

No presente estudo taxonômico, destacou-se a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* como a dominante absoluta, atingindo densidades médias que corresponderam a 82% da densidade total. Devido à sua capacidade altamente invasora, a *Cylindrospermopsis raciborskii*, dentre as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores e autoridades sanitárias.

Cepas de cianobactérias da espécie *Cylindrospermopsis raciborski* já foram isoladas, obtidas primeiramente em dinoflagelados marinhos. Sua alta competitividade em ambientes eutrofizados e sua capacidade de formar florações e produzir toxinas fazem desta espécie uma das cianobactérias mais estudadas tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública. (TUCCI; SANT'ANNA, 2003).

3.3 CIANOTOXINAS

As toxinas produzidas pelas cianobactérias têm como função aumentar as defesas contra espécies zooplânctônicas, seus predadores primários. No caso de águas destinadas ao consumo humano, Amorim (1997) destaca que os tratamentos convencionais por filtração apenas evitam que as células cheguem à rede de abastecimento, mas não evitam a liberação das toxinas para a água que irá ser consumida.

A estabilidade das cianotoxinas é uma característica muito importante na tomada de decisões sobre qualidade de água quando ocorrem as florações de cianobactérias. Ransom *et al.* (1994) descrevem que algumas neurotoxinas apresentam moléculas relativamente lábeis que tendem a se decompor rapidamente sob condições naturais em subprodutos não-tóxicos, enquanto que as hepatotoxinas ciclopeptídicas são extremamente estáveis devido à estrutura química que elas possuem.⁴⁷

De acordo com Matias (1999), o consumo desta água contaminada e seus derivados podem acarretar muitos tipos de patologias: a síndrome da paralisia ou PSP (“*Paralytic Shellfish Poisoning*”), a síndrome neurotóxica ou NSP (“*Neurotoxic Shellfish Poisoning*”), a síndrome ciguatérica, a síndrome da amnésia ou ASP (“*Amnesic Shellfish Poisoning*”) e a síndrome da diarreia ou DSP (“*Diarrheic Shellfish Poisoning*”). Contudo, registros de intoxicações por toxinas são muito limitados, sendo possível que, em muitos casos, problemas provocados por estes organismos sejam confundidos com outros tipos de doenças, tais como gastroenterites, hepatites, herpes-zoster, acidentes vasculares encefálicos, etc.

3.3.1 Toxinas “Paralytic Shellfish Poisons” (PSP)

As toxinas PSP, sigla esta que pode se traduzida como “envenenamento paralisante de molusco”, é uma síndrome neurotóxica resultante da ingestão de moluscos contaminados que se alimentam de cianobactérias tóxicas. Essas toxinas agem no sistema neuromuscular; seus efeitos predominantes são neurológicos e consistem de formigamento/dormência de face, braços e pernas, queimação, torpor, sonolência, fala incoerente, ausência de coordenação muscular, sensação de flutuação e paralisia respiratória. A morte pode ocorrer no período de 2 a 25 horas após a ingestão. As toxinas associadas a esta síndrome foram referenciadas como saxitoxinas (STXs), sendo este o único agente responsável por esta contaminação. Os incidentes com toxinas PSP tiveram aumento significativo a partir da década de 1970, e até a atualidade tais contaminações são registradas em regiões do mundo, onde até então eram desconhecidas, embora sejam esporádicas e imprevisíveis. Na atualidade, as toxinas PSP são consideradas um problema global que requer uma grande consciência pública e profissional (D’MELO, 2003).

As toxinas PSPs pertencem a um grupo de compostos altamente polares e solúveis em água. Suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 3.2 a seguir. A *Cylindropermopsis raciborskii*, espécie dominante absoluta na área de estudo, quando predominante em florações, produz algumas toxinas

potencialmente venenosas: a cilindrospermopsina, um alcaloide com ação tóxica no fígado e rins e duas neurotoxinas paralisantes, a STX e a neo-saxitoxina, pertencentes à classe PSP (SIVONEN; JONES, 1999).

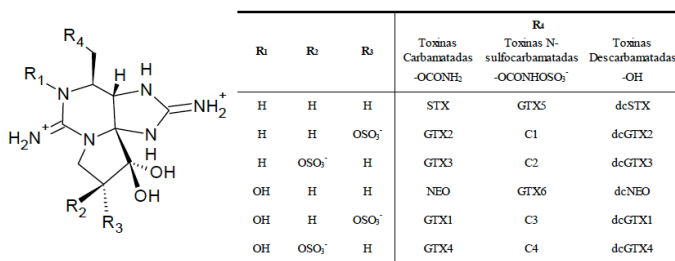


Figura 3.2: Estruturas químicas das toxinas paralisantes de molusco (PSP).

A STX pertence ao grupo dos alcalóides neurotóxicos carbamatados, não-sulfatados. Apresenta peso molecular de 299,3g/mol, e seu pK_a em água é de 8,24. É solúvel em água e metanol e pouco solúvel em etanol, e não solúvel em acetona, éter ou clorofórmio. É estável em solução ácida quente a pH 2,4, e se torna cada vez mais lábil com o aumento do pH. É resistente à cristalização, bastante higroscópica e se decompõe sem fusão (RESSOM *et al.*, 1994). A sua estrutura é apresentada na Figura 3.3 abaixo.

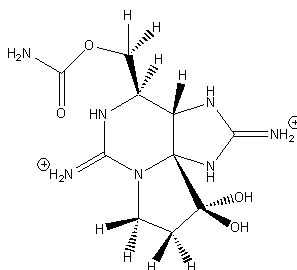


Figura 3.3: Estrutura da saxitoxina (STX).

A STX foi identificada pela primeira vez em meio de água doce proveniente da *Aphanizomenon flos-aquae*. Além da *Cylindrospermopsis*, a STX também é sintetizada por outras espécies de cianobactérias, como *Anabaena* e *Aphanizomenons*, por exemplo. A sua toxicidade é extremamente elevada, apresentando DL₅₀ de 5µg/Kg de peso corpóreo (ratos) (BOUAÏCHA, 2001).

A STX tem uma ação rápida que inibe a condução nervosa, bloqueando canais de sódio sem afetar permeabilidade a potássio. Das várias toxinas causadoras de paralisia, apenas a STX tem sido uma das neurotoxinas mais estudadas em detalhes quanto aos seus efeitos farmacológicos, haja vista a dificuldade de se isolar as outras toxinas para maiores estudos (SILVEIRA, 2003). Ainda assim, pouco tem sido investigado sobre a presença das STXs nas águas da Lagoa do Peri (MELO FILHO, 2006; MONDARDO, 2004).

São também muito escassas as informações sobre os efeitos genotóxicos (sobre o genoma) *in vitro* desta toxina. Embora tenham sido realizadas intensas pesquisas sobre o tema, poucas referências foram encontradas em bases de dados científicos, cruzando as palavras-chaves “genotoxicidade *in vitro*” e “saxitoxina”. Dados recentes de Falconer (2008), publicados no “International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms” (ISOC-HAB), simpósio organizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), relatam que ainda não existem dados disponíveis na literatura referentes às STXs sobre seus efeitos de exposição subcrônica, efeitos na reprodução, efeitos teratogênicos ou carcinogênicos.

3.3.2 Legislação Brasileira v. Cianotoxinas

A importância da água para a vida, saúde, bem-estar e desenvolvimento humano é inquestionável, e, assim sendo, toda pessoa deveria contar com o fornecimento suficiente, fisicamente e a custo acessível, de uma água salubre e de qualidade aceitável para as utilizações pessoais e domésticas de cada um. Nesse sentido, pode-se afirmar que o acesso à água potável está

intimamente relacionado com o direito à vida, direito este assegurado pela Declaração Universal de Direitos Humanos de 1948 (ONU), artigo XXV, assim como no *caput* do art. 5º da Constituição da República Federativa do Brasil, de 1988, que trata dos direitos e garantias fundamentais, no capítulo dos direitos e deveres individuais e coletivos.

Conscientes das ameaças que pressionam nossos recursos hídricos, cada vez mais as cianobactérias e cianotoxinas vêm recebendo uma atenção especial dos órgãos regulamentadores em todo o mundo. Países como Austrália e Estados Unidos criaram estratégias de controles para cianobactérias e cianotoxinas, mas, como citado anteriormente, o Brasil é o único país na atualidade que estabelece limites para densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas em norma nacional, com força de lei (DEBERDT *et al.*, 2006).

A legislação brasileira recomenda como padrão de potabilidade da água para consumo humano, valor máximo permitido (VMP) para a microcistina de 1µg/L, e recomenda que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de cilindrospermopsina e STXs, observando, respectivamente, os valores limites de 15,0µg/L e 3,0µg/L de equivalentes STX/L. Recomenda, ainda, que sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder a 20.000 células/mL (2mm³/L de biovolume), deva ser exigida a análise de cianotoxinas ou comprovação da toxicidade na água bruta por meio de realização de bioensaios em camundongos. Para análise de cianobactérias e cianotoxinas e comprovação de toxicidade por bioensaios em camundongos – até o estabelecimento de especificações em normas nacionais ou internacionais que disciplinem procedimentos – devem ser adotadas as metodologias propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua publicação *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* (BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº 518 de 2004).

3.3.3 Quantificação da Saxitoxina (STX)

A detecção e a quantificação de toxinas de cianobactérias podem ser realizadas por meio de métodos biológicos (em camundongos – MBA – Mouse Bioassay), químicos (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC) e bioquímicos (ensaios de inibição das fosfatases e imunoenaios – teste ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Dentre esses, o MBA é o método de referência e o mais antigo, empregado desde 1937 (BEN-GIGIREY *et al.*, 2007). Contudo, por uma questão ética, muitas entidades estão empenhadas em reduzir ao máximo possível o recurso a animais, incentivando pesquisadores a desenvolverem outros métodos alternativos à experimentação animal.

O HPLC permite detectar e quantificar a presença de toxinas em amostras pré-purificadas com grande sensibilidade, com a vantagem de ser um método químico. Além disso, muitos estudos têm feito comparações, demonstrando a grande eficiência do método químico com relação ao biológico (LAWRENCE *et al.*, 1995). No método químico, a detecção é feita espectrofotometricamente, utilizando um comprimento de onda que varia conforme a toxina de interesse presente na amostra. (LANÇAS, 2004; AMORIM, 1997).

As STXs em especial não são moléculas naturalmente fluorescentes, mas, para que sejam analisadas por esta técnica, passam por um processo denominado derivatização, pelo qual é introduzida na STX outra molécula com propriedade fluorescente, possibilitando assim sua detecção. Diversos estudos têm empregado esta técnica na identificação de STXs. (OSHIMA *et al.*, 2003; LAWRENCE *et al.*, 1995). Ressalte-se, contudo, que as técnicas de HPLC subdividem-se em duas técnicas que diferem na derivatização da amostra para a detecção no detector de fluorescência: a derivatização pré e pós-coluna (LANÇAS, 2004).

Atualmente, a metodologia que é referenciada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para análise de PSP é a metodologia que emprega a derivatização pré-coluna.

Esta metodologia de análise tem-se demonstrado de fácil reprodução além de ser prática e eficaz por se tratar de procedimentos de uma reação muito simples, não necessitando de equipamentos muito sofisticados acoplados ao sistema de cromatografia líquida. A reação de derivatização com os prováveis produtos é apresentada na Figura 3.4 a seguir.

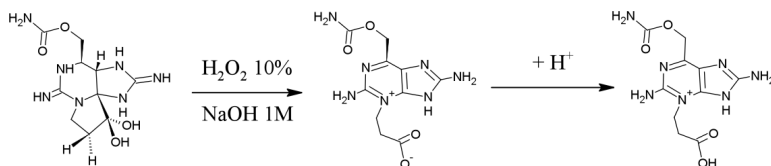


Figura 3.4: Peroxidação da saxitoxina (STX).

3.4 BIOENSAIOS PARA MONITORAMENTO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE CELULAR

O termo citotoxicidade abrange processos de morte celular induzida e o termo genotoxicidade abrange processos que alteram a base genética da vida, quer seja na estrutura físico-química do DNA (ácido desoxirribonucleico), processo este chamado de mutagênese, quer seja na alteração do determinismo genético em nível celular ou orgânico, identificado respectivamente como carcinogênese e teratogênese. A genotoxicidade estuda, sob o aspecto genético, o que perturba a vida ou induz à morte tanto no nível da célula, como no de organismo (SILVA *et al.*, 2003).

A monitoração de efeitos citotóxicos e genotóxicos de toxinas são de interesse fundamental na Toxicologia Ambiental para determinar quais os danos que esta contaminação pode causar em organismos vivos. Os ensaios citotóxicos e genotóxicos são importantes ferramentas para avaliação dos diferentes mecanismos de ação tóxica das toxinas, e estes testes têm sido incorporados entre ensaios de rotina em laboratórios de experimentação.

Diversos produtos químicos produzem efeitos adversos na estabilidade do ecossistema, podendo causar lesões do DNA, incluindo rupturas de hélice, bases modificadas e “DNA

crosslinks”, que é a ligação de um agente exógeno ou endógeno que reage em duas posições diferentes do DNA, causando um bloqueio no processo de replicação e consequente morte celular; o “*crosslink*” não pode ser reparado (KIMA; HYUN, 2006).

Agências de controle ambiental de diferentes países vêm recomendando a utilização de conjunto de testes para a avaliação de substâncias quanto às suas características genotóxicas com vistas a sua regulamentação para consumo ou liberação para o ambiente. A principal preocupação dessas entidades tem sido a detecção de genotoxicidade em testes de curta duração, bem como o estudo preditivo desses testes. O mais recomendado é a combinação de testes dependendo das características do agente tóxico, utilizando o estudo de diferentes tipos de danos. O surgimento de bases de dados mais completas, que usam técnicas de cultura de células, enriquece tanto a identificação dos agentes tóxicos como aqueles com potencial carcinogênico (SILVA *et al.*, 2003).

Dentre vários ensaios utilizados para a detecção do dano em nível citotóxico e do DNA, podem ser destacados: o teste do MTT, o teste do micronúcleo, a metilação biológica e a lipoperoxidação.

3.4.1 Teste de citotoxicidade: Teste do MTT

O princípio deste ensaio consiste na absorção do sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio)) pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. A succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, é capaz de transformar o MTT, que é de cor amarela, em cristais de formazan, que são de cor violeta. Somente as células viáveis possuem esta capacidade, indicando atividade mitocondrial e consequente viabilidade celular (WAN *et al.*, 1994).

3.4.2 Teste de Micronúcleo

Micronúcleos são pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico. Após a divisão das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada polo. A membrana nuclear é refletida ao redor desses dois conjuntos de cromossomos (SILVA *et al.*, 2003). Entretanto, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integrar ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), ele constituirá um micronúcleo.

Portanto, os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos que representam o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir à perda de material genético. O teste do micronúcleo detecta tais micronúcleos resultantes das rupturas cromossômicas durante a divisão celular ou eventos de perda de cromossomos na anáfase. Este teste detecta, portanto a mutagênese cromossômica em eucariotos dos tipos clastogênese (induzido a perda dos fragmentos cromossômicos), aneugênese (induzido a perda de um ou mais cromossomos do conjunto) e danos no fuso mitótico. Para que o micronúcleo seja visualizado, é necessária uma divisão celular após o evento mutagênico; por isso, é necessário utilizar células que estejam se multiplicando constantemente (*in vivo*, p.ex. a medula óssea), ou, então, células de cultivo celular (*in vitro*). Assim, os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de célula e, nos testes *in vitro*, os produtos a serem testados devem ser diluídos preferencialmente em água ou outro solvente não tóxico (SILVA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003).

3.4.3 Metilação Biológica

A metilação biológica consiste na transferência de grupos metil de S-adenosilmetionina (SAM, um cofator enzimático presente em todas as células eucarióticas) para a posição 5 da citosina, e é catalisada por enzimas conhecidas como DNA-

metilase (Figura 3.5). A metilação da citosina pode influenciar na expressão gênica, sendo, portanto, um fator epigenético (HAVLIS; TRBUSEK, 2002; GONZALGO, JONES, 1997).

Este fenômeno epigenético pode ser definido como mudança no material genético (especialmente no DNA e na cromatina), que altera a regulação da expressão gênica de maneira que esta é passada para as células filhas dentro das células somáticas, porém não é caracterizada como mutação, pois não envolve mudança na sequência de DNA. Tem como principais mecanismos de repressão transcricional a metilação do DNA e a acetilação das histonas. A modificação no padrão de metilação do DNA é a alteração epigenômica melhor estudada (HAVLIS; TRBUSEK, 2002; REIN *et al.*, 1998; GONZALGO; JONES, 1997; EHRLICH *et al.*, 1982).

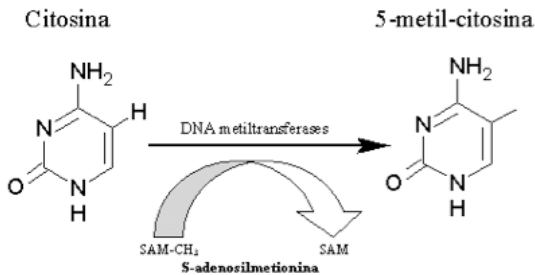


Figura 3.5: Mecanismo de metilação do DNA. A 5-metilcitosina é produzida pela ação das DNA-metiltransferases (DNMT 1, 3a ou 3b) que catalisam a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono na posição 5 da citosina.

Ocorre quase que exclusivamente nas citosinas que são seguidas imediatamente por uma guanina (dinucleotídeos CpG). A maior parte do genoma mostra uma clara depleção desses dinucleotídeos, e os que estão presentes estão quase sempre metilados (GONZALGO; JONES, 1997).

A metilação de DNA é o mecanismo que permite que determinados genes (e não outros) se manifestem dentro de células normais especializadas, visto que todas as células do

corpo trazem a mesma carga genética. O que as diferencia é a manifestação de um ou de outro gene durante o desenvolvimento e em toda a sua vida para desativar genes desnecessários (SILVA *et al.*, 2003).

3.4.4 Fragmentação do DNA e Apoptose

Um padrão morfológico de lesão celular, muito conhecido como apoptose, é atualmente aceito como um modo distinto e importante de morte celular. Destina-se a eliminar células do intoxicante ou hospedeiro por meio de uma série coordenada e programada internamente de eventos executados por um conjunto exclusivo de produtos gênicos (COTRAN *et al.*, 2000).

A apoptose é responsável por numerosos eventos fisiológicos, adaptativos e patológicos, incluindo a morte celular induzida por estímulos nocivos que são capazes de causá-la quando fornecidos em baixas doses de calor, radiação, hipóxia e produtos químicos (COTRAN *et al.*, 2000).

As células apoptóticas exibem quebras típicas do DNA em fragmentos grandes de 50 a 300 quilobases (kb). Na subsequência, há a clivagem internucleossômica do DNA em oligonucleossomas em múltiplos de 180 a 200 pares de bases (pb) por endonucleases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Estes fragmentos podem ser visualizados por eletroforese em gel de agarose com escalas de DNA. A Figura 3.6, a seguir, traz um exemplo de fragmentação do DNA em gel de agarose (COTRAN *et al.*, 2000).

Eletroforese em gel de agarose é uma técnica empregada para a separação e visualização de fragmentos de DNA e RNA, na qual os fragmentos migram em um gel de agarose durante a aplicação de uma diferença de potencial. Os fragmentos são separados de acordo com o seu tamanho. Na visualização de material genético (DNA e RNA), emprega-se o gel de agarose por apresentar porosidade irregular, funcionando assim como uma rede que separa o DNA, por diferença de tamanho, dos fragmentos menores que chegam mais rapidamente ao final da corrida eletroforética. O DNA apresenta-se com carga negativa e,

devido a esta característica, pode-se conduzi-lo de um polo com carga negativa para um polo com carga positiva. Porém, este material genético tem de estar em contato com uma solução salina que permita a condução elétrica através de íons (MARTINEZ; PAIVA, 2008). Para se obter as imagens das corridas eletroforéticas, podem ser utilizadas substâncias intercalantes como o brometo de etídio ou o SYBR Green, que revelam os ácidos nucleicos sob luz ultravioleta (ZIPER *et al.*, 2004), como mostrado na Figura 3.6.

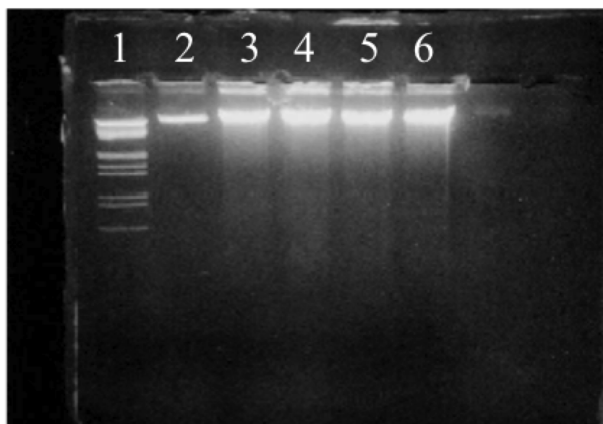


Figura 3.6: Fragmentação do DNA após tratamento de células Caco2 ao ácido domóico. 1: marcador DNA (“Ladder”); 2: controle; 3:15ng/mL; 4: 30ng/mL; 5:60ng/mL; 6:100ng/mL (CARVALHO PINTO-SILVA, 2005).

3.4.5 Lipoperoxidação Biológica

A lipoperoxidação (LPO) caracteriza-se pelo processo em que os radicais atacam os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, provocando uma reação em cadeia com lipoperoxídeos como produtos intermediários e modificações das propriedades da membrana, como permeabilidade e fluidez, além de causar dano a enzimas e receptores. Estes radicais podem ser da espécie “oxirreativa” (contendo um ou mais oxigênios reativos na sua

estrutura – do inglês ROS: *Reactive Oxygen Species*) ou da espécie “nitrorreativa” (contendo um ou mais nitrogênios reativos na sua estrutura – do inglês RNS: *Reactive Nitrogen Species*) (NAIR, 2007). Este processo pode resultar desestabilização e desintegração da membrana celular levando o ser humano a sérios problemas de saúde, desde o envelhecimento precoce até a susceptibilidade ao câncer. As proteínas podem sofrer alterações na sua conformação e perda na sua função. O DNA também pode ser alvo de ataque de radicais livres.

O processo total da LPO consiste em três estágios: a iniciação, a propagação e a terminação. Uma vez iniciado, a LPO forma radicais peróxil (ROO) que podem ser rearranjados através de uma reação de ciclização dos endoperóxidos (precursores do malondialdeído), produzindo, como produto final do processo de peroxidação, o malondialdeído (MDA) (Figura 3.7). O MDA é um biomarcador natural produzido nesta reação e que pode ser quantificado e usado para avaliação desse processo. O MDA é mutagênico em bactérias e células de mamíferos e carcinogênico em camundongos (VALKO *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

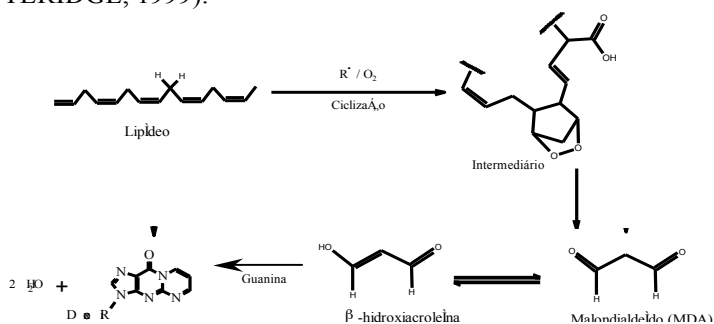


Figura 3.7: Esquema simplificado da lipoperoxidação, com a formação do malondialdeído e o aduto com a guanina, MIG.

Os antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem a oxidação desse substrato em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável. Desse modo, os antioxidantes

atuam como protetores da oxidação de biomoléculas por radicais livres e impedem a propagação da reação em cadeia por eles provocada (HALLIWELL, 2007; DAMIANI, 2006). Tais defesas antioxidantes são extremamente importantes na remoção direta de radicais livres, fornecendo assim proteção biológica máxima. Um bom antioxidante deve extinguir especificamente radicais livres, inativando-os; deve oxirreduzir metais, interagir (regenerar) com outros antioxidantes dentro da "rede antioxidante", ter um efeito positivo na expressão do gene, ser absorvido prontamente, ter uma concentração nos tecidos e nos biofluidos em um nível fisiologicamente relevante e trabalhar nos domínios aquosos e/ou membranares (VALKO *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

No sistema biológico, principais defesas enzimáticas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas servem como linha primária de defesa na destruição dos radicais livres. Além disso, antioxidantes não-enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH), o tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C), dentre outros, auxiliam no combate às ROS e RNS. Os antioxidantes estão amplamente distribuídos nos organismos vivos e constituem um sistema de defesa muito importante em condições aeróbicas (DAMIANI, 2006). Alguns antioxidantes agem em ambientes hidrofílicos; outros em ambientes hidrofóbicos, e alguns em ambos os ambientes da célula. Por exemplo, a vitamina C reage com o radical livre superóxido na fase aquosa, enquanto a vitamina E reage na fase lipofílica (HALLIWELL, 2007; VALKO *et al.*, 2006).

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livre, catalisando a dismutação do ânion superóxido. Está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular. Embora o ânion superóxido não seja altamente danoso, pode extrair elétrons de diversos componentes celulares, causando reações em cadeia de radicais livres. O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o peróxido de

hidrogênio, que deve se retirado do meio o mais rapidamente possível (VALKO *et al.*, 2006).

A CAT é uma enzima presente em células de plantas, mamíferos e bactérias aeróbicas. Desempenha a função de eficiente catalisador do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Está localizada, principalmente, no peroxissoma; entretanto, outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT. A catálise do peróxido de hidrogênio é importante, pois, na presença de Fe^{+2} , leva à formação de radical hidroxil (reação de Fenton), altamente reativo e danoso às biomoléculas (VALKO *et al.*, 2006).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um importante e poderoso antioxidante que atua em ambientes hidrofílicos do corpo. Seus parceiros antioxidantes preliminares são a vitamina E e os carotenóides, que trabalham juntos tão bem quanto as enzimas antioxidantes. A vitamina C coopera com a vitamina E para regenerar o α -tocoferol dos radicais α -tocoferóis nas membranas e nas lipoproteínas O ácido ascórbico participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O ácido ascórbico puro é sólido, branco, cristalino e muito solúvel em água. O ácido ascórbico é necessário *in vivo* como cofator de várias enzimas, sendo as mais conhecidas a prolina-hidroxilase e a lisina-hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. A deficiência do ascorbato na dieta humana causa o escorbuto. A mais impressionante propriedade química do ascorbato é a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons) (VALKO *et al.*, 2006).

A vitamina E (α -tocoferol) é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação. Oito tocoferóis são conhecidos, porém o α -tocoferol é o mais importante biologicamente, o que faz com que os termos α -tocoferol e vitamina E sejam quase intercambiáveis na literatura. Como mencionado anteriormente, o ácido ascórbico é conhecido como o maior antioxidante hidrofílico, e evidências recentes

sugerem que o α -tocoferol e o ácido ascórbico funcionam juntos em um processo cíclico (VALKO *et al.*, 2006).

3.5 PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS ADSORVENTES EMPREGADOS NA ADSORÇÃO DA SAXITOXINA (STX)

O crescimento excessivo de cianobactérias em reservatórios de água potável é um problema cada vez mais comum associado com a eutrofização. Por isso existem diferentes alternativas de tratamento numa estação de tratamento de água (ETA) no que concerne à remoção dessas cianobactérias e cianotoxinas (CHOW *et al.*, 1999). Quando ocorre a lise das células de cianobactérias, por causas naturais ou por uso de algicidas, as cianotoxinas são liberadas, passando a haver essencialmente toxinas solúveis (JONES; NEGRI, 1997; CHOW *et al.*, 1999). Neste caso, é preciso que existam processos de tratamento que consigam assegurar a sua eficiente e consistente remoção. São necessários processos que removam compostos orgânicos solúveis, tais como o uso de ozônio, carvão ativado, nanofiltração ou osmose inversa, biodegradação, dentre tantas outras possibilidades de métodos que vêm sendo testados e otimizados (CHOW *et al.*, 1999; SENS *et al.*, 2005; AMORIM, 2007). Há evidências de que a utilização de elevadas dosagens de carvão ativado em pó apresenta bom desempenho nesse sentido. Contudo, trata-se de um processo lento e de custo elevado devido às grandes quantidades de carvão que precisam ser empregadas (KEIJOLA *et al.*, 1988; HIMBERG *et al.*, 1989). Diferentes alternativas de remoção de cianotoxinas já vêm sendo testadas (MILLER *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2005; BURNS *et al.*, 2009); porém, dada a escassez de informação ainda existente, a utilização de filtros com materiais alternativos para a remoção de STX ainda é um assunto novo e não muito explorado (SILVA, 2005).

Conchas de moluscos bilvalves, em especial as ostras, são constituídas preferencialmente de aragonita, que é uma modificação mineral do carbonato de cálcio (KITANO *et al.*, 1976). O carbonato de cálcio (CaCO_3), por sua vez, apresenta-se

em três modificações minerais, sendo a calcita o mais comum e o constituinte principal de vastas formações de rochas sedimentares de calcário. A ocorrência de aragonita está vinculada a determinadas circunstâncias físico-químicas durante sua formação. O terceiro polimorfo, a vaterita, é um mineral bem mais escasso (BESSLER; RODRIGUES, 2008). A aragonita tem um arranjo atômico mais compacto do que a calcita e é o mineral formador das conchas, pérolas e corais. Estes carbonatos de cálcio biogênicos são importantes contribuintes na remoção de fosfatos de águas, sendo que a aragonita oferece maior superfície ativa, e maiores sítios adsorventes ativos que a calcita. A capacidade de adsorção da aragonita é em torno de 20 vezes maior que a da calcita; índice baseado no nº de moles de fosfato adsorvido por grama de partícula (MILLERO *et al.*, 2001). A Figura 3.8, a seguir, apresenta uma fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da aragonita proveniente de concha de ostras.

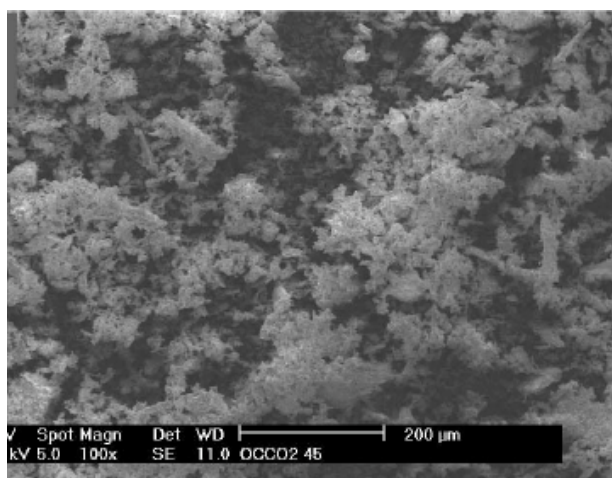


Figura 3.8: Fotomicrografia da concha de ostra calcinada (Fonte: SILVA, 2007).

A quitina é um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-dioxi-D-glicopirranose, que são

interligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (KUMAR, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2007). A quitina é um material de fontes naturais renováveis, biodegradável, não-tóxico, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos (AZEVEDO *et al.*, 2007; ANTONINO, 2007). As principais fontes para a obtenção de quitina em laboratório são os exoesqueletos de vários crustáceos, como caranguejos e camarões (KUMAR, 2000; ANTONINO, 2007). A quitina está fortemente associada com proteínas, material inorgânico, pigmentos e lipídios (KUMAR, 2000). Várias condições são usadas para remover essas impurezas e ainda não existe um processo padrão. Para isolar a quitina pode-se seguir as etapas de desproteíntização, desmineralização e despigmentação (AZEVEDO *et al.*, 2007). O maior problema encontrado na extração da quitina é seu modo de preparação, pois dificilmente se obtém uma quitina com as mesmas características da sintetizada anteriormente, como, por exemplo, a massa molar e o grau de acetilação. A Figura 3.9, a seguir, traz uma fotomicrografia por MEV de uma amostra de quitina proveniente de carapaça de camarão.

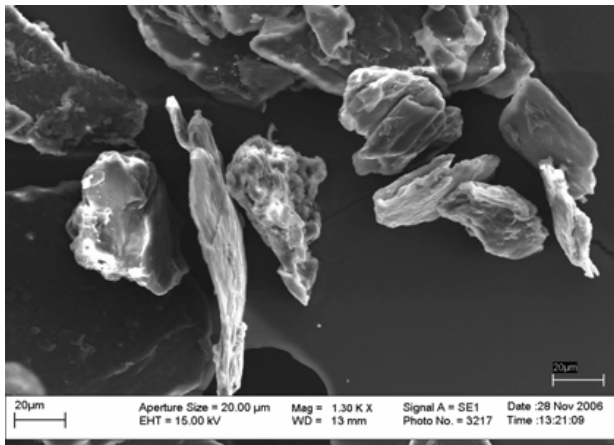


Figura 3.9: Fotomicrografia de amostras de quitina proveniente da carapaça do camarão (1300X) (Fonte: ANTONINO, 2007).

As carapaças de crustáceos e as conchas de moluscos são resíduos abundantes rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, consideram-nas poluentes. Sua reutilização reduz o impacto ambiental causado por seu acúmulo em locais onde são geradas ou estocadas (GOOSEN, 1996; AZEVEDO *et al.*, 2007). A reutilização dessas substâncias é muito relevante do ponto de vista ambiental e econômico, pois além de eliminar os resíduos da indústria pesqueira, o custo final da produção de derivados desses materiais é reduzido em cerca de 60% (MATHUR; NARANG, 1990). Na literatura científica esses materiais são comumente avaliados em estudos de adsorção dos mais diversos metais pesados de soluções aquosas: Cu(II), Zn(II), Cr(VI), Cd(II), Pb(II) (KITANO *et al.*, 1976; SOLODOVNIK, 2006; ODOEMELAM *et al.*, 2009).

CAPÍTULO IV

4 METODOLOGIA

A metodologia empregada para o desenvolvimento do estudo foi baseada na descrição a seguir. Para todos os ensaios foi empregado um padrão puro da STX, certificado pelo *Institute for Marine Biosciences* (HALIFAX, NS, Canada).

4.1 INSTALAÇÕES

Para iniciar os trabalhos da pesquisa, foi desenvolvida, no Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX –, uma metodologia de extração, purificação e dosagem da SXT através da cromatografia líquida (HPLC).

Como parte de um acordo de cooperação internacional, atividades laboratoriais foram desenvolvidas no *Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Appliquée, Faculté de Pharmacie, Université Bordeaux 2* – França, sob a orientação do Professor Edmond Creppy. Esse laboratório possui sala para cultura de células com fluxo laminar, estufa de CO₂, cromatógrafos líquido e gasoso e aparelho de absorção atômica. As pesquisas desenvolvidas no referido laboratório foram na área de genotoxicidade e citotoxicidade, como o ensaio do micronúcleo, ensaio do MTT, dosagem da MDA e dosagem de adutos de DNA.

4.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Os testes de genotoxicidade foram avaliados *in vitro*, avaliando o crescimento celular e utilizando o MDA como biomarcador. Foram também avaliados a metilação biológica e o ensaio do micronúcleo em células cultivadas em laboratório.

4.2.1. Cultura Celular

Por estar avaliando uma toxina neurotóxica, foram escolhidas duas linhagens celulares para os ensaios *in vitro*: o

neuroblastoma de camundongo Neuro-2A (N2A) e as células renais de macaco Vero. As células N2A foram obtidas da Coleção de Cultura Celular Europeia catálogo nº 89121404 (Porton Down, UK) e foram cultivadas num meio de cultura denominado “completo”, que consiste em: meio RPMI 1640 complementado com 10% de soro de feto bovino, 2% de L-glutamina (200mM), 1% de penicilina (50U/mL) e estreptomicina (50µg/mL) e 1% de piruvato de sódio (100µM) a 37°C e atmosfera com 5%CO₂ (adaptado de MANGER *et al.*, 2003). As Células Vero foram cultivadas em meio RPMI 1640 complementado com 10% de soro de feto bovino, 1% de L-glutamina (1mM), 1% de penicilina (50U/mL) e 1% de estreptomicina (50ug/mL). A cultura foi mantida a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (TERASIMA; YSUKAWA *apud* MATIAS; CREPPY, 1998).

4.2.2 Ensaio do MTT: Determinação da EC50

As células cultivadas foram incubadas em microplacas de 96 poços por 24 horas com o meio de cultura completo a 37°C e 5% de CO₂ e após esse período elas foram expostas por um período de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ às seguintes concentrações de STX: 0,19, 0,38, 0,75, 1,50, 3,00, 6,00, 12,0 e 24,0 µg/L (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0 e 64,0 nM). Foram realizadas diluições em cascatas (Apêndice A5) com soluções-estoque preparadas em água e soluções mães preparadas com o meio de cultura para posterior diluição nos poços da microplaca para garantir que o volume de solução de STX utilizado não ultrapassasse 0,5% do volume do meio de cultura. As concentrações foram avaliadas em triplicatas. Um grupo de controle negativo empregando apenas o meio de cultura e um grupo de controle positivo empregando as toxinas veratridina (0,05µM) e ouabaína (0,5µM) ou metotrexato (200mM). Após o período de exposição, o meio foi retirado e foram adicionados 200µL de uma solução de MTT 0,5mg/mL solubilizada no meio RPMI. A microplaca foi incubada por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, o meio foi removido cuidadosamente por inversão da microplaca e foram adicionados 200µL de DMSO. A

microplaca foi envolvida em papel alumínio e colocada numa mesa de agitação por 20 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em uma leitora automática de microplacas no comprimento de onda de 560nm. Os valores de absorbância das amostras foram normalizados e os valores foram expressos em porcentagem de viabilidade celular através da Equação 1 abaixo. Pela curva “Viabilidade Celular x Log da concentração”, foi determinada a EC50 (concentração efetiva que mata 50% das células). A partir da EC50, foram definidas as concentrações para os demais testes.

$$\%VC = 100 \frac{(DO_{amostra} - DO_{min})}{(DO_{max} - DO_{min})} \text{ (Equação 1)}$$

onde: %VC: viabilidade celular;
 DO max: absorbância do controle negativo;
 DO min: absorbância do controle positivo;
 DO amostra: absorbância da amostra.

4.2.3 Fragmentação e Metilação do DNA

A metilação da citosina ocorre quando um grupamento metila é adicionado no sulco da dupla hélice do DNA celular. Este estudo foi realizado em quatro etapas e foi baseado nas descrições a seguir (KOUADIO *et al.*, 2007).

1) *Extração, purificação e quantificação do DNA*: O DNA foi extraído e purificado com o uso do kit Promega “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” código A112. Após a incubação das células N2A por 24 horas em microplacas de 6 poços, foi realizada a exposição nas seguintes concentrações de STX: 0,15, 0,30, 0,60 e 1,20 µg/L (0,38, 0,75, 1,50 e 3,00 nM). Foram feitas diluições em cascata (ver Apêndice A7) com soluções-estoque preparadas em água e soluções mães preparadas com o meio de cultura para posterior diluição nos poços da microplaca para garantir que o volume de solução de STX utilizado não ultrapassasse 0,5% do volume do meio de cultura. Foram empregados grupos de controle; um negativo, utilizando apenas o

meio de cultura, e um positivo, utilizando as toxinas ocratoxina (OTA – 10 μ M) ou fumonisina B1 (FB1 – 15 μ M). Foram avaliadas sempre triplicatas de cada caso (STX e controles positivos e negativos). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após exposição, o meio de cultura contendo a STX foi retirado cuidadosamente e as células foram colocadas em suspensão em 1mL de PSB com auxílio de uma micropipeta. A suspensão celular foi transferida para microtubos e centrifugada por 30 segundos a 16.000g. O sobrenadante foi descartado e o DNA do precipitado foi extraído conforme descrição do protocolo do *kit*, com uma modificação na etapa de precipitação da proteína que consistiu em adicionar 800 μ L de clorofórmio para facilitar a separação das fases. O DNA foi diluído em água ultrapura 1/200, e quantificado por espectrometria de ultravioleta. As absorções dos ácidos nucleicos foram medidas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. A razão A260/A280 precisa estar entre 1,8 e 2,0 como garantia de que o DNA esteja com alto grau de pureza. Após a dosagem do DNA de cada amostra, um volume contendo 10 μ g de DNA foi destinado para a quantificação da 5-metilcitosina.

2) *Separação dos Fragmentos de DNA por Eletroforese*: Para eletroforese foram utilizados 10 μ g de DNA extraídos das células tratadas com as diferentes concentrações de STX, como citado anteriormente. A avaliação qualitativa da fragmentação do DNA foi realizada por eletroforese em 1,5% de gel de agarose e visualizada pela coloração com brometo de etídio. A eletroforese foi realizada em uma cuba de eletroforese horizontal (H4 - Life Technologies – Gibco BRL). A placa de acrílico contendo o gel foi colocada na cuba e coberta com 1L de tampão TBE (1M Tris-HCL pH 8,0, 0,1mM EDTA e 0,1M ácido bórico). Depois da aplicação das amostras, a cuba foi conectada a uma fonte (250 EX – Life Technologies - Gibco BRL) e ajustada para 60 volts por 180 minutos. O material foi revelado em um transiluminador de luz UV (TFX 35M - Vilber Lourmat) e fotografado com filme polaroide (Sigma, França).

3) *Liofilização e hidrólise enzimática do DNA*: Esta fase teve por objetivo hidrolisar as proteínas e separar o DNA do RNA. Para

tanto, foram liofilizados 10µg do DNA num microtubo de centrifuga durante uma noite com o auxílio de um liofilizador-centrifugador RC 10-10 (Jouan, France), sob temperatura variável, adaptado em série a uma bomba a vácuo (Edwards) e a um evaporador por resfriamento (RCT 60). O DNA foi reidratado em 10µL de água Milli-Q degaseificada. As amostras foram colocadas em um banho-maria de 100°C por 1 minuto e em seguida colocadas em banho de gelo por 15 minutos para facilitar a etapa de hidrólise. A seguir foram acrescentados a cada amostra 1µL de tampão acetato de potássio 250mM (pH 5,4), 1µL de sulfato de zinco 10mM e 10µL de Nuclease P1 (0,5U/µL). Em seguida as amostras foram incubadas por uma noite a 37°C. No dia seguinte, uma segunda hidrólise enzimática foi realizada com a adição de 2µL de tampão Tris-HCl 0,5M (pH 8,3) e 2µL de fosfatase alcalina (0,31U/µL). O tubo foi incubado por duas horas a 37°C, sendo, depois, adicionados 25µL de clorofórmio para inativar as enzimas utilizadas na hidrólise. Os tubos foram centrifugados a 13.000g por 10 minutos. A fase aquosa foi analisada por HPLC.

4) *Quantificação da m⁵dC por HPLC*: A quantificação da 5-metilcitosina foi efetuada por HPLC equipado com coluna C18-fenil-nucleosil. O solvente utilizado foi uma mistura (NH₄)H₂PO₄ 6,5 mM a pH 3,95 com metanol 4% em condições isocráticas. O volume de injeção foi de 20µL. O detector de ultravioleta foi utilizado no comprimento de onda de 254nm (Apêndice A2).

4.2.4 Lipoperoxidação: Extração e Quantificação do MDA

As células N2A foram incubadas com meio de cultura completo em microplacas de 24 poços por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período o meio de cultura completo foi removido e o meio RPMI foi adicionado com diferentes antioxidantes separadamente: vitamina C (16µg/mL), vitamina E (6µg/mL) e enzimas SOD e CAT (25µg/mL cada uma). Foi avaliado em paralelo a condição sem a presença de antioxidantes. As células foram incubadas por mais 1 hora a 37°C e 5% de CO₂. A seguir, a exposição à STX foi realizada nas seguintes concentrações: 0,15,

0,30, 0,60 e 1,20 μ g/L (0,38, 0,75, 1,50 e 3,00nM). Foram feitas diluições em cascatas (Apêndice A6) com soluções-estoque preparadas em água e soluções mães preparadas com o meio de cultura para posterior diluição nos poços da microplaca, garantindo-se, dessa forma, que o volume de solução de STX utilizado não ultrapassasse 0,5% do volume do meio de cultura. Um grupo de controle negativo, utilizando apenas o meio de cultura, e um grupo de controle positivo, utilizando as toxinas ocratoxina (OTA - 10 μ M) ou fumonisina B1 (FB1 - 15 μ M) foram empregados. Além disso, foram avaliadas sempre triplicatas de cada caso (STX e controles positivos e negativos). Após incubação de 24h, as células foram recuperadas no meio para a dosagem do MDA. A suspensão celular foi centrifugada durante 5 minutos a 800g e 4°C. O meio sobrenadante foi eliminado, e as células foram ressuspensas em 250 μ L de tampão SET e agitadas vigorosamente em um Vortex. Uma alíquota de 25 μ L da suspensão celular foi separada e congelada de todas as amostras para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Apêndice A4). As suspensões celulares e os padrões foram tratadas com 25 μ L de SDS 7%, 300 μ L de HCl 0,1N, 40 μ L de ácido fosfotungstístico 1% e 300 μ L de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Após vigorosa agitação no Vortex, os tubos foram mantidos no escuro, a 90°C, durante 1 hora, e depois resfriados com gelo durante 10 minutos. O complexo TBA-MDA formado foi extraído por 600 μ L de n-butanol. Após centrifugação por 10 minutos a 5.000g, a fase butanólica que contém o complexo MDA-TBA foi retirada e a quantificação do MDA foi realizada por HPLC-fluorescência. Foi empregada uma pré-coluna Lichosorb 738, C18 de 10 μ m de porosidade (10 x 4,6mm) e uma coluna Bischoff Prontosil Eurobond, C18 de 5 μ m de porosidade (250 x 4,6mm) com injeção automática de 90 μ L. A fase móvel isocrática utilizada foi uma mistura metanol: água 4:6 (v/v), pH 8,4 ajustado com KOH 0,5M, a um fluxo de 0,5mL/min. O detector de fluorescência empregado foi o ICS-8450 com comprimento de onda de excitação de 515nm e comprimento de onda de emissão de 553nm (Dados de calibração do método: Apêndice A3).

4.2.5 Teste do Micronúcleo: Bloqueio Citocínético (CBMN)

Este teste foi baseado em Ouanes *et al.* (2003), com algumas modificações. As células N2A e Vero foram incubadas com meio de cultura completo em microplacas de 24 poços por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultura completo foi retirado e a exposição à STX foi realizada nas seguintes concentrações: 0,15, 0,30, 0,60 e 1,20µg/L (0,38, 0,75, 1,50 e 3,00nM). Foram feitas diluições em cascatas (ver Apêndice A6) com soluções-estoque preparadas em água e soluções mães preparadas com o meio de cultura para posterior diluição nos poços da microplaca, garantindo-se, assim, que o volume de solução de STX utilizado não ultrapassasse 0,5% do volume do meio de cultura. Após 6 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂ foi adicionada a Citocalasina B (5µg/L) aos poços com as células intoxicadas. As células foram incubadas por mais 18h, a 37°C e 5% de CO₂. O meio com a STX foi removido e as células foram recuperadas com PBS e centrifugadas a 500g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram tratadas com 250µL de KCl 0,075M; depois foram recolocadas em suspensão com a ajuda de uma micropipeta e após 10 minutos foram centrifugadas a 500g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 250µL da solução metanol:ácido acético 3:1 (v:v). Após 20 minutos, as células fixadas foram espalhadas delicadamente sobre uma lâmina e deixadas secar por 30 minutos. A coloração foi feita com 50µL de uma solução de brometo de etídio/acridine orange sobre as células e uma lamínula foi colocada sobre a lâmina. A contagem das 1.000 células binucleadas para cada amostra foi realizada em microscópio fluorescente com aumento de 400X, sendo, então, anotados os números de micronúcleos encontrados.

4.3 ENSAIOS DE ADSORÇÃO

4.3.1 Materiais Adsorventes

A quitina foi produzida a partir de carapaças de camarão e foi fornecida pelo Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, sob a coordenação do Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira. A quitina bruta foi previamente triturada e passada em peneiras de 18Mesh para apresentar partículas de tamanho $\leq 1,0\text{mm}$. O pó de ostra foi produzido a partir de cascas de ostras calcinadas e trituradas. O pó de concha de ostra empregado é comercializado em lojas de produtos naturais, e já apresentava partículas de tamanho $\leq 1,0\text{mm}$, não necessitando de preparação prévia. Os materiais adsorventes foram previamente secos em estufa a 105°C por 24 horas e pesados em tubos de centrífuga do tipo “Falcon” de 50mL. Os frascos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C para eliminar do material adsorvente a interferência por degradação microbiológica.

4.3.2 Cinéticas e Isotermas de Adsorção

O método usado para avaliar o processo de adsorção foi adaptado de Miller *et al.* (2001) e Ohe (1996). Para avaliar o processo de adsorção foram realizados ensaios de cinéticas e isotermas de adsorção para ambos os adsorventes em diferentes pH.

Para as cinéticas de adsorção, soluções de STX $10\mu\text{g/L}$, em pH 5,0 e 7,0, foram expostas a $200\pm 5\text{mg}$ do adsorvente a 25°C , em réplicas, nas quais foram analisadas a concentração de STX residual nos tempos de mistura de 0, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas. Os frascos foram colocados em um agitador orbital, do tipo “Shaker”, a 200rpm e foram amostrados de 0,5mL nos respectivos intervalos de tempo.

Para as isotermas de adsorção, foram adicionados 10 mL de solução contendo STX $2-16\mu\text{g/L}$, nos pH 5,0 e 7,0, aos tubos contendo $200\pm 5\text{mg}$ de adsorvente. Os frascos foram colocados

em um agitador orbital, do tipo “Shaker”, a 200rpm e foram amostrados de 0,5mL nos respectivos intervalos de tempo.

As frações amostrais foram filtradas em membrana de 0,2 μ m e coletadas num tubo de microcentrífuga. Na sequência, as frações foram analisadas em HPLC, para a quantificação da STX. Um grupo de controle foi avaliado na mesma temperatura e tempos de mistura das amostras sem os adsorventes contendo apenas 10mL das soluções de STX nos pH 5,0 e 7,0 em um tubo estéril, para avaliar a presença do efeito de degradação da toxina por vias químicas e/ou microbiológicas.

4.3.3 Dosagem da Saxitoxina (STX)

O método analítico para a quantificação da STX foi adaptado da metodologia recomendada pela AOAC (2005). O método de quantificação recomenda a utilização de HPLC com derivatização pré-coluna e detector de fluorescência. Os equipamentos utilizados para as análises foram o cromatógrafo líquido HP1050 com bomba quaternária de eluente e o detector de fluorescência HP1046A, disponíveis no Laboratório Integrado do Meio Ambiente – LIMA – do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC. As condições para a análise estão descritas na Tabela 4.1, a seguir.

O método de derivatização pré-coluna por peroxidação da amostra foi preparado com o auxílio de micropipetas automáticas, adicionando-se 25 mL de solução aquosa de peróxido de hidrogênio 10%(v:v) a 250mL de NaOH 1M em tubos plásticos para microcentrífugas (“Eppendorf”). Esta mistura foi agitada vigorosamente, sendo depois, adicionados 100mL da amostra ou padrão de STX que foi derivatizado. O tubo foi agitado vigorosamente por 2 minutos à temperatura ambiente. Após a reação, um volume de 20mL de ácido acético glacial concentrado foi adicionado, agitando-se vigorosamente a solução reagente. Uma alíquota de 50ml desta reação foi injetada diretamente ao HPLC (Dados da curva de calibração – Apêndice A1).

Tabela 4.1: Condições para determinação de STX em HPLC com detector de fluorescência. (AOAC, 2005).

Separação no HPLC				
Coluna	Supelcosil® C18 (Supelco), 250 mm x 4,6 mm d.i., 5µm			
Eluente A	Acetonitrila			
Eluente B	Sol. tamponada de formiato de amônio 0,1N (pH 6)			
Fluxo	1,0 mL/ min			
Gradiente	Etapa	Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
	1	0,0	0	100
	2	5,0	0,5	99,5
	3	8,0	4	96
	4	10,0	4	96
	5	12,0	0	100
Detecção	Fluorescência: λ Excitação: 330nm λ Emissão: 390nm			

CAPÍTULO V

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DO ARTIGO 1: ENSAIO DO MTT, FRAGMENTAÇÃO E METILAÇÃO DO DNA

Os resultados apresentados neste subitem fazem parte do primeiro artigo elaborado neste estudo, que avaliam os resultados da toxicidade da STX sobre as células e algas por meio de ensaios citotóxicos. O mencionado artigo intitulou-se “INVESTIGATION OF ANIMAL AND ALGAL BIOASSAYS FOR RELIABLE SAXITOXIN ECOTOXICITY AND CYTOTOXICITY RISK EVALUATION” e foi publicado na revista científica “Ecotoxicology and Environmental Safety”. O artigo original é apresentado no Apêndice A8. Neste item serão apresentados apenas os resultados referentes aos testes de toxicidade sobre células.

5.1.1 Influência de STX na Viabilidade Celular: Ensaio de MTT e Determinação de EC50

Para a determinação da EC50, uma escala de oito concentrações de STX (na condição “sem O/V” 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0 e 64,0nM e na condição “com O/V” 2,53, 5,07, 10,15, 20,3, 40,6, 81,25, 162,25 e 325nM) foi aplicada em cinco diferentes experimentos, na presença e na ausência de O/V. Após exposição das células N2A à STX e análise dos dados, a curva de viabilidade pela concentração de STX foi plotada para ambos os casos (com e sem O/V). Os resultados são apresentados na Figura 5.1.

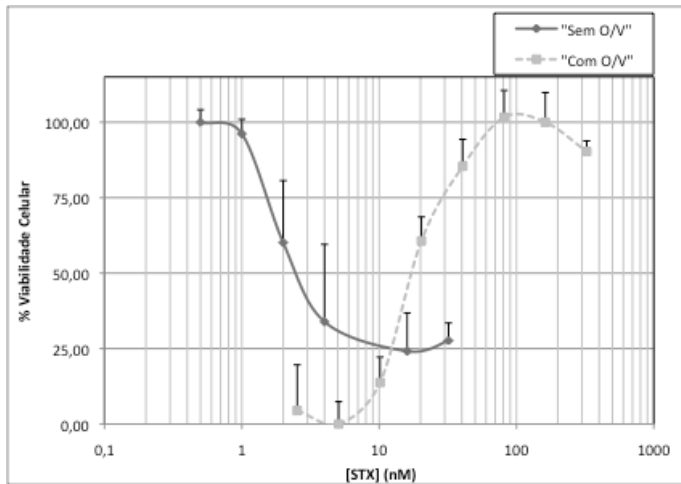


Figura 5.1: Perfil dose-resposta da STX em células N2A na presença e ausência de O/V. Viabilidade celular (%)±DP v. Concentração de STX em nM. Condição “Sem O/V”: $R^2=0,997$; condição “Com O/V”.: $R^2=0,9904$.

Uma diferença significativa foi obtida entre as curvas da condição “sem O/V” e “com O/V”. Na condição “com O/V”, uma baixa viabilidade celular foi observada, e um aumento dose-dependente da viabilidade foi verificado, e estes resultados foram confirmados pelos controles negativos e positivos. Na curva normalizada, com o aumento da concentração de STX, a condição “sem O/V” apresentou uma redução dose-dependente dos valores de viabilidade celular, com desvios padrões significativos. Entretanto os valores desses desvios padrões obtidos eram consistentes com alguns valores previamente relatados, levando-se em consideração a precisão total do bioensaio *in vitro* sob células de aproximadamente 20-30%. (HUMEPAGE *et al.* 2007). Os resultados do teste de MTT demonstram que a exposição de células de N2A às diferentes concentrações de STX conduz a uma redução dose-dependente da atividade metabólica da mitocôndria – extrapolado, neste ensaio, pela viabilidade celular. Contudo, um comportamento oposto é verificado na presença de compostos antagonistas à STX.

As EC50 da STX foram calculadas, sendo que na condição “sem O/V” foi obtido um valor de 1,1nM ($R^2= 0,997$) e na condição “com O/V” foi obtido um valor de 18,2nM ($R^2= 0,9904$). Esses valores de EC50 da STX, para ambas as circunstâncias em células N2A, são particularmente baixos, levando à conclusão de que esta linhagem celular de origem neural é muito sensível à STX. Nesta avaliação pode-se qualificar a linhagem celular empregada adequada como bioindicador para estudar os mecanismos da ação da STX em baixas concentrações. Assim, de acordo com a EC50 encontrada, os demais ensaios foram adaptados com concentrações apropriadas para 0,8, 1,5 e 3,0nM de STX.

5.1.2 Efeitos de STX na fragmentação do DNA em células N2A

A eletroforese em gel de agarose foi executada para analisar fragmentos do DNA da exposição das células de N2A à STX (Figura 5.2). Nas condições de fragmentação descritas anteriormente, uma fragmentação fraca foi observada no controle negativo. Assim, foi realizada uma amostra do controle negativo na condição sem o antibiótico (Figura 5.2-7). Nessas circunstâncias, o controle negativo não apresentou nenhuma fragmentação significativa, confirmando que essa fraca fragmentação provém da presença do antibiótico. Os fragmentos do DNA podem ser visualizados somente nas células tratadas com a STX e com o controle positivo OTA.

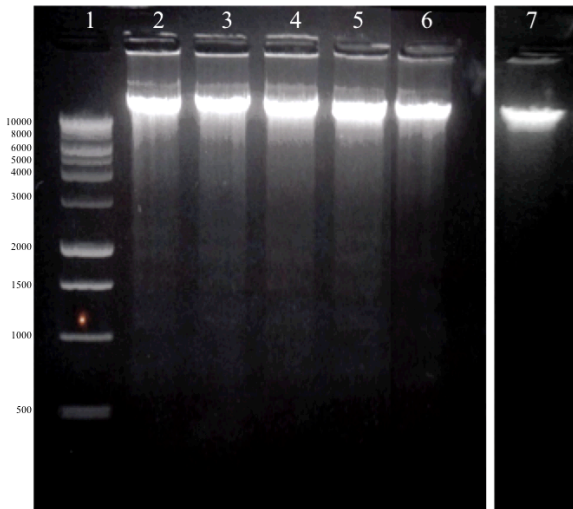


Figure 5.2: Fragmentação do DNA de células N2A extraído após exposição à STX. A eletroforese do DNA foi isolado foi realizada em gel de agarose 1,5% nas seguintes concentrações: 1: Ladder 1000 kpb, 2: OTA (ocratoxina) 10 μ M, 3: 3,0nM, 4: 1,5nM; 5: 0,8nM, 6: Controle negativo com antibiótico e 7: Controle negativo sem antibiótico.

Foi observado um aumento da fragmentação do DNA nas amostras tratadas com a STX, quando comparados com o padrão de fragmentos do DNA, denominado “Ladder”. Uma significativa parte desses fragmentos apresenta tamanhos entre 500 e 2000bp, evidenciando a possibilidade de morte celular por apoptose. Esse resultado é um indicativo de ocorrência de apoptose. Há evidências relatadas na literatura que sugerem que as poliaminas atuam no caminho da morte celular por apoptose (PACKHAM; CLEVELAND 1994; FROSTESJO *et al.*, 1997). Portanto, os resultados aqui obtidos confirmaram que a STX, considerada um composto cíclico da guanidina, induz igualmente à morte celular por apoptose.

Para avaliar de uma forma mais quantitativa os resultados observados anteriormente, a imagem do gel foi submetida a uma análise de imagens pelo programa ImageJ, que possui uma função específica para análise de géis de eletroforese. Assim, pela

normalização dos densitogramas de luminosidade das linhas de corrida das amostras, foi possível gerar um histograma com valores de % de DNA fragmentado para cada condição avaliada, resultado que é apresentado na Figura 5.3.

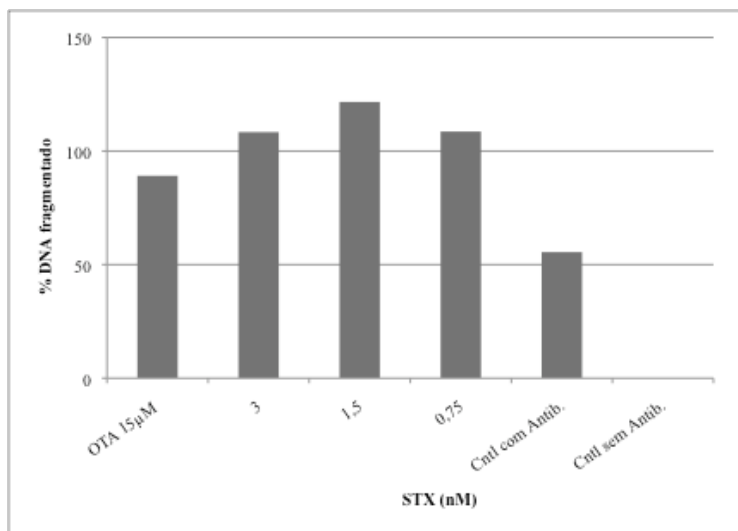


Figura 5.3: % de DNA fragmentado para células expostas à STX, obtido pela análise da imagem do gel. Legenda: OTA 15nM: ocratoxina 15nM (controle positivo); CNTL com Antib.: controle com antibiótico; CNTL sem Antib.: controle sem antibiótico.

Esse densitograma apresenta de forma mais visível o efeito tóxico da STX sobre células N2A. Para as três concentrações de STX empregadas nos testes, foi possível verificar um aumento acima de 50% quando comparado ao controle com antibiótico, resultado que não observável apenas pela análise visual da imagem do gel.

5.1.3 Efeitos de STX na metilação do DNA em células N2A

A metilação da deoxicitosina foi avaliada pela quantificação da 5-metilcitosina (m5dC) de DNA purificado das células N2A expostas à STX. Esse efeito foi avaliado pelo

método de HPLC-UV. Após 24 horas da incubação, as células N2A na cultura produziram espontaneamente $0,59 \pm 0,02\%$ de m5dC. Este valor foi considerado o valor controle sem STX. A OTA ($15 \mu\text{M}$), empregada como o controle positivo, aumentou o nível de m5dC para $3,00 \pm 0,69\%$. A concentração mais elevada de STX ($3,0 \text{ nM}$) aumentou os percentuais de m5dC para $4,43 \pm 1,41\%$ (Figura 5.4). Este resultado evidencia que a STX pode induzir células N2A à hipermetilação, resultado similar ao controle positivo, sugerindo que a STX seja um indutor potencial neste efeito específico. As bases modificadas do DNA podem representar uma fração menor do genoma, mas ainda exibem fortes efeitos biológicos (REIN *et al.*, 1998). Por exemplo, somente 3-10% das citosinas em genomas mamíferos são modificadas a m5dC, mas estas geralmente reprimem a transcrição quando aglomeradas no 5' - extremidades dos genes (FROSTESJO *et al.*, 1997; EHRLICH *et al.*, 1982).

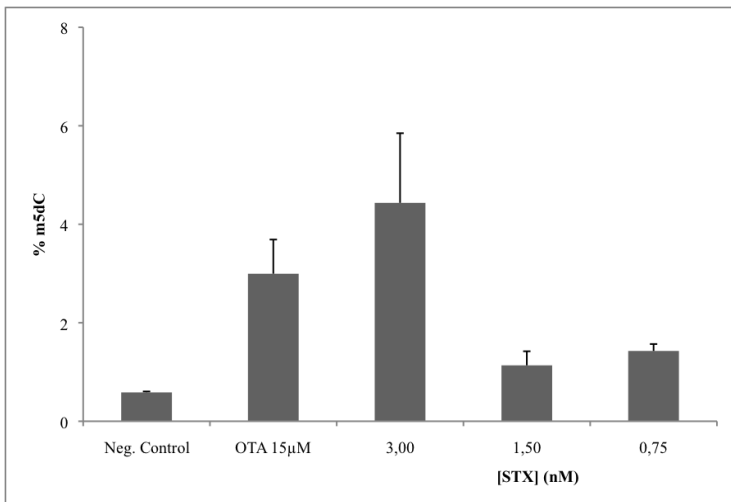


Figura 5.4: % m5dC com relação à quantidade total de citosina (dC+m5dC) das amostras do DNA extraídas de células N2A expostas por 24 horas, para os controles negativo e positivo e as diferentes concentrações de STX empregadas. Legenda: OTA 15nM: ocratoxina 15nM (controle positivo); Neg. Control: controle negativo.

5.2 DISCUSSÃO DO ARTIGO 1

O presente estudo avaliou a resposta citotóxica da STX sobre células N2A, na tentativa de identificar etapas-alvo da morte celular. Para isso foram avaliados efeitos sobre a viabilidade celular, a fragmentação do DNA das células expostas e ainda efeitos de indução à metilação do DNA. Foi empregada uma escala de concentrações de STX que foram identificadas como citotóxicas pelo ensaio do MTT.

No ensaio do MTT obteve-se um valor de EC50 de 1,1nM, na ausência de O/V, e 18,2nM, na presença de O/V. A presença do antagonista em culturas celulares diminui o tempo de ensaios de citotoxicidade para 4 a 7 horas (MANGER *et al.*, 2003). JELLETT *et al.*, (1995) e MANGER *et al.*, (1993) obtiveram valores de EC50 de 100nM na presença de O/V em células N2A. Cañete e Diogène (2008) relataram uma EC50 de 8,6nM para a STX em células N2A na presença de O/V e tempo de intoxicação de 24 horas. Não foi observada uma resposta para a STX com a mesma célula na ausência de O/V, com tratamento similar num intervalo de 0,91–58,41nM de STX. O *Gulf Coast Seafood Laboratory (GCSL) – Food and Drug Administration (FDA)*, Alabama, obteve uma EC50 aproximada de 3nM com células N2A (Comunicação pessoal reportado por Cañete and Diogène, 2008).

Ren e Frymier (2004) sugerem que todas as fontes de variação em cada estágio dos ensaios citotóxicos acabam se acumulando ao final do teste, resultando num nível bastante elevado. Por isso sugerem, também, que essas etapas sejam decompostas para identificação das variações específicas em cada uma delas.

Para Ledreux (2006), essas variações nos ensaios citotóxicos são essencialmente causadas por parâmetros de natureza biológica (estado fisiológico das células, número de células por poços) e natureza química (variação da concentração dos produtos químicos empregados, instabilidade das toxinas). Pode-se, ainda, assumir que a sensibilidade das células às toxinas aumenta com o número de replicações da cultura empregada nos testes (ALVITO *et al.*, 2001).

As discrepâncias entre os nossos resultados e os resultados de Cañete e Diogène (2008) podem ser explicadas pelas diferenças na cultura e no tratamento das células N2A, e na preparação dos ensaios citotóxicos. Cañete and Diogène (2008) empregaram na cultura de células meio RPMI com 1% de L-glutamina (200mM) e 0,5% de solução de antibióticos (10mg/mL estreptomicina and 1000U/ mL de penicilina), solução de tripsina (0.5g/L) para descolar as células dos frascos de cultura e a densidade de células foi de 35.000cels/poço nos ensaios citotóxicos com as células N2A, não sendo informado o número de passagem da cultura celular empregada nos testes. No presente estudo foi empregado meio de cultura celular suplementado com 2% de L-glutamina (200mM) e 1% de solução de antibióticos (10mg/mL estreptomicina and 1000U/ mL de penicilina). Além disso, empregaram-se raspadores para recuperação das células dos frascos de cultura e a densidade de células foi de aproximadamente 20.000 cels/poço, com passagens entre 14-25 vezes.

Dessa forma, os resultados dos ensaios citotóxicos desta pesquisa sugerem que o dano mitocondrial pode estar indiretamente envolvido no mecanismo tóxico da STX. Assim, é possível que este caminho intrínseco provoque apoptose como um os eventos finais. Para uma revisão, sugere-se ver Law e Elmore (2008). Curiosamente, os dados do presente estudo mostram, primeiramente, uma redução da atividade mitocondrial nos ensaios citotóxicos e, no segundo ensaio, os fragmentos do DNA indicam a participação provável da apoptose como o caminho principal que conduz à morte das células N2A.

Não foram encontrados relatos na literatura de que a STX induz à fragmentação do DNA. Contudo, os dados encontrados por meio desta pesquisa sugerem que a STX induz as células N2A a efeitos genotóxicos indiretos, porque fragmentos do DNA de 500 a 2.000bp foram observados em todas as concentrações de STX, incluídas aquelas com valores abaixo da EC50 (0,8nM). Os dados de metilação induzidos pela STX indicam que baixas concentrações de STX induzem a um aumento dos níveis de m5dC. Estudos com ácido ocaídico (OA), uma toxina marinha

conhecida como promotor de tumores, mostraram que ela induz à hipermetilação em diversas linhagens celulares (MATIAS; CREPPY, 1998a). Este estudo, em uma mesma linha de pesquisa, avaliou a STX como um possível promotor do tumor.

Os canais de sódio voltagem-dependentes (VGSCs) demonstram serem fortemente associados com potencial metástase, como evidenciado pelos seus altos níveis de expressão em diversos carcinomas agressivos e no controle de vários estágios da cascata metastática (ONKAL; DJAMGOZ 2009; CATTERALL *et al.*, 2007; FISKE *et al.*, 2006). Entretanto, os bloqueadores dos canais de sódio voltagem-dependentes, no caso das neurotoxinas, quando usados em concentrações apropriadas, podem ser medicinalmente úteis em uma variedade de desordens, incluindo o câncer (PREVARSKAYA *et al.*, 2007; ONKAL; DJAMGOZ 2009). Um exemplo é a tetrodotoxina (TTX), que demonstrou reduzir diretamente as células menos invasivas (ANDERSON *et al.*, 2003). Esses achados sugerem, pois, que os VGSCs são um alvo viável para a pesquisa anticâncer. No presente estudo, a STX inibiu o crescimento de células de neuroblastomas N2A, indicando uma interação no mesmo caminho da TTX. Entretanto, estudos têm demonstrado que essas toxinas (ambas bloqueadoras do VGSCs) ligam diferentemente de formas específicas no domínio I, localização Fen/Cis/Tir (KIRSCH *et al.*, 1994). Há, portanto, distinções entre a resposta dessas duas toxinas para a mutação do sítio da tirosina 401, sugerindo que a TTX apresenta uma leve interação, que pode ter uma interação íntima não ligada com membrana de célula, protegendo este sítio de modificações químicas, enquanto a STX interage fortemente com os resíduos extracelulares (PENZOTTI *et al.*, 1998).

A metilação da citosina tem consequências mutacionais e epigenéticas em genomas de mamíferos (SZYF *et al.*, 2003; BAYLIN *et al.*, 2001; GONZALGO; JONES, 1997), e citosinas metiladas devem predispor alguns genes a frequências mais altas de transições de desaminações induzidas (GONZALGO; JONES, 1997). A desaminação espontânea da $m^5dC \rightarrow T$ é um dos caminhos mais importantes indicando que a metilação pode

causar mutagênese. Os efeitos epigenéticos da m⁵dC podem ser importantes na tumorigênese, podendo envolver a inativação dos proto-oncogenes, mas igualmente a inativação de genes de supressor do tumor (GONZALGO; JONES, 1997).

Os efeitos epigenéticos da metilação do DNA e o seu relacionamento com silêncio transcricional dos genes envolvidos no sistema de regulação do crescimento celular são considerados muito importantes na definição dos processos-chave envolvidos da tumorigênese (GONZALGO; JONES, 1997). Recentemente, doenças humanas (outras além do câncer) têm sido identificadas e associadas com propriedades epigenéticas e perturbações desses genes reguladores e com a metilação de alguns genes-chave (NEWELL-PRICE *et al.*, 2000). Por exemplo, sabe-se que na maioria dos tumores extraídos em tratamentos cirúrgicos de câncer, a taxa de metilação do DNA está modificada e diversas desregulações do gene envolvido na regulação do ciclo celular são modificadas em paralelo à ativação dos oncogênes e/ou inativação de genes supressores de câncer (GONZALGO; JONES, 1997; NEWELL-PRICE *et al.*, 2000; BIRD, 2002; HERMAN; BAYLIN, 2003; FEINBERG; TYCKO, 2004; SELARU *et al.*, 2009).

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se propor uma conexão entre três processos avaliados para a genotoxicidade induzida da STX: as células expostas às baixas concentrações de STX conduzem tanto a danos mitocondriais indiretos quanto a danos do DNA, como demonstrado pelo ensaio citotóxico e pela fragmentação do DNA respectivamente, evidenciando o caminho apoptótico da morte celular. Em paralelo, tratamento de células N2A com STX apresentaram também elevados níveis de indução de processos de hipermetilação das bases do DNA, conduzindo possivelmente a um efeito inibidor de genes de supressor do tumor.

Em conclusão, os presentes dados confirmam que a linhagem celular do neuroblastoma de N2A é apropriada para a avaliação da toxicidade de STX. Os resultados indicam, ainda, que os mecanismos principais que causam efeitos tóxicos indiretos da STX envolvem as lesões mitocondrial e do DNA,

bem como a modificação do DNA por hipermetilação (considerado como um efeito epigenético) que conduz possivelmente à morte celular por um processo apoptótico ou conduzindo a processo de mutagênese e/ou tumorigênese. Dessa forma, esses dados sugerem que os sistemas de indivíduos expostos à STX durante eventos de floração de algas tóxicas podem estar expostos a tais efeitos.

5.3 RESULTADOS DO ARTIGO 2: LIPOPEROXIDAÇÃO E EFEITO PROTETOR DE VITAMINAS E ENZIMAS

Os resultados apresentados neste subitem fazem parte do segundo artigo elaborado neste estudo e apresentou a toxicidade da STX sobre as células por meio de ensaio de lipoperoxidação. O artigo intitulou-se “LIPID PEROXIDATION INDUCTION BY SAXITOXIN IN NEURO-2A CELLS: THE PROTECTIVE EFFECT OF VITAMINS C AND E, SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE” e foi submetido à revista científica “Archives of Toxicology”. O artigo original é apresentado no Apêndice A9.

5.3.1. Lipoperoxidação: efeito do estresse oxidativo

Após 24 horas de incubação, as células N2A produziram espontaneamente $83,79 \pm 5,94$ nM de MDA/mg de proteína. Esse valor foi considerado como valor controle para células N2A não tratadas com STX. Após 24 horas de exposição apenas ao antioxidante VitE, as células N2A produziram espontaneamente $59,09 \pm 1,57$ nM de MDA/mg de proteína; quando a exposição foi apenas ao antioxidante VitC8 e VitC16, as células N2A produziram espontaneamente $89,80 \pm 9,42$ e $107,31 \pm 17,29$ nM de MDA/mg de proteína respectivamente; expostas apenas ao antioxidante SOD/CAT, as células N2A produziram espontaneamente $102,47 \pm 10,88$ nM de MDA/mg de proteína. Esses valores foram considerados valores de controle para células N2A não tratadas com STX. Após 24 horas de exposição, aumentando as concentrações de STX (0,4 a 3,0 nM), a produção

de MDA das células N2A foi significativamente aumentada (Figura 5.5).

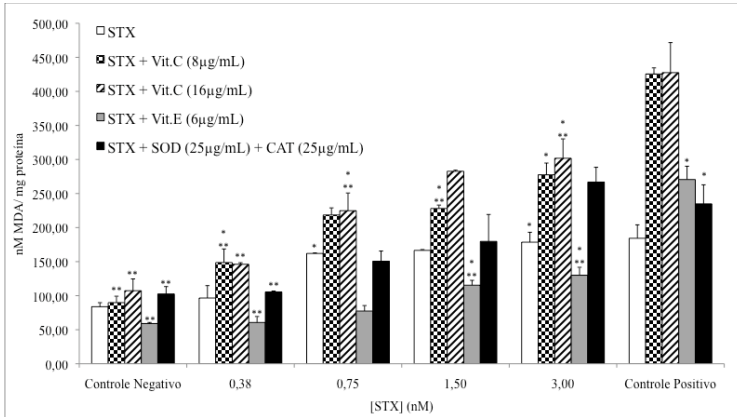


Figura 5.5: Lipoperoxidação induzida pelo aumento da concentração de STX em células N2A avaliando o efeito de ausência e presença de diferentes antioxidantes, com dosagem da quantidade de MDA produzido após 24 horas de incubação (*diferença significativa com relação a células não tratadas com STX para $p < 0.05$, e ** com relação ao controle positivo para $p < 0.05$).

A produção de MDA foi aumentada de 15 a 113% para 0,4 a 3,0nM de STX, respectivamente, quando comparada com os relativos controles de células não tratadas com STX (Tabela 5.1). Quando as células N2A foram tratadas com VitC8, essa taxa foi aumentada de 66 a 209%, e, quando tratadas com VitC16, as taxas foram aumentadas de 36 a 181% para as mesmas concentrações de STX (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Lipoperoxidação medida pela % do aumento na produção do MDA com relação ao controle.

STX (nM)	% aumento MDA				
	Sem Antioxidante	Vit. E 6µg/mL	Vit. C		SOD+CAT 25µg/mL cada
			8µg/mL	16µg/mL	
0,4	15	3	36	66	3
0,8	93	31	109	143	47
1,5	99	95	163	154	75
3,0	113	120	181	209	160
Controle Positivo	120 ¹	358 ¹	298 ²	374 ¹	129 ¹

1. OTA: 15µM; 2. MTX 20µM.

Quando as células foram tratadas com VitE e com as enzimas SOD/CAT, as taxas de produção do MDA foram significativamente diminuídas para as menores concentrações de STX, comparando-se com a condição sem antioxidantes. Para VitE, as taxas de produção do MDA foram de 3 a 120%, e para SOD/CAT foram de 3 a 160%, ambas correspondendo de 0,4 a 3,0nM de STX.

5.4 DISCUSSÃO DO ARTIGO 2:

Neste estudo foram investigados os efeitos citotóxicos individuais da STX na linhagem celular de neuroblastoma de camundongo Neuro-2A, empregando o teste do MTT. Foram investigados também os efeitos de lipoperoxidação destas células, expostas as diferentes concentração de STX, em ausência e presença de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, pela dosagem do MDA.

Em estudo prévio (PERREAULT *et al.*, 2011) foram investigados os efeitos citotóxicos e genotóxicos da STX sobre células N2A, no qual ficou evidenciado que a STX induz a efeitos genotóxicos indiretos as células N2A quando expostas nas mesmas concentrações trabalhadas neste artigo. No presente estudo os resultados do teste no MTT demonstram que a exposição das células N2A em diferentes concentrações de STX acarreta uma redução dose-dependente dos valores de viabilidade celular e consequente redução da atividade metabólica

mitocondrial. Estes resultados apontam claramente a mitocôndria como um alvo de STX. Esta evidência é um indicativo de que a STX afeta a integridade da organela e, portanto, a integridade da respiração celular. As células do sistema nervoso possuem uma quantidade elevada de mitocôndrias devido à grande necessidade de energia (COOPER; HAUSMAN, 2007). Os resultados encontrados no presente ensaio mostram que este mecanismo é afetado, podendo ser um dos motivos do efeito neurotóxico da STX. A EC50 da STX determinada para células N2A foi um valor baixo, podendo concluir que essa linhagem celular de origem neuronal é sensível à neurotoxina em estudo. Esta evidência qualifica esta célula N2A como adequada e representativa para o estudo dos mecanismos de ação com baixas concentrações de STX.

Ainda não foi reportado na literatura estudos do efeito da linhagem celular N2A expostas à STX e sua correlação com a indução à lipoperoxidação, na ausência e na presença de antioxidantes, mas é conhecido que o cérebro e o sistema nervoso são propensos a estresse oxidativo por não possuírem um sistema de defesa antioxidante adequado (HALLIWELL, 2006).

Os níveis de MDA, que aumentam em consequência da LPO pelo estresse oxidativo, foram significativamente mais elevados em células N2A expostas à STX do que nos controles sem exposição. Todos os resultados expostos evidenciam que após 24 horas de incubação, a STX induz à LPO das células N2A. As espécies OR provenientes da LPO podem ser produzidas por substâncias endógenas e exógenas (MØLLER; WALLIN, 1998). Para este caso, a STX funcionou como uma fonte exógena de estresse oxidativo, e as espécies OR foram as prováveis responsáveis pela LPO. Quando produzidas dentro das células, as espécies OR são capazes de reagir com virtualmente todos os tipos de biomoléculas (MØLLER; WALLIN, 1998). As fontes endógenas potenciais incluem a mitocôndria, o metabolismo do citocromo P450, os peroxissomas e a ativação celular inflamatória (INOUE *et al.*, 2003). Neurotoxinas geralmente conduzem à formação de OR em classes clínicas do sistema nervoso (HALLIWELL, 1987).

Avaliando a sequência dos eventos, é possível propor uma correlação dos dois processos considerados para a citotoxicidade induzida pela STX: as células N2A expostas a baixas concentrações de STX foram induzidas a lesões mitocondriais e à peroxidação da membrana lipídica. Seguindo o mecanismo de neurodegeneração proposto por Halliweel (1999), sugerem-se dois mecanismos tóxicos causados pela STX às células N2A: um primeiro mecanismo começa pelo estresse oxidativo da exposição a uma espécie reativa (STX), induzindo ao processo de LPO e formação de MDA. As consequências do mecanismo tóxico da LPO são as modificações das bases, a inibição da síntese proteica, a denaturação (?) do DNA e a formação de adutos do DNA, a qual pode induzir a processos genotóxicos, mutagênicos e ainda carcinogênicos (BAUDRIMONT *et al.*, 1997; MATIAS *et al.*, 1999; HALLIWELL, 2007). Assim, a presença do MDA citotóxico induz a uma sobrecarga de proteínas anormais, conduzindo a uma disfunção do proteossoma. Elevados níveis de dano oxidativo podem resultar não apenas no estresse oxidativo, mas também em uma falha no sistema de reparo celular (HALLIWELL, 2007). Essa disfunção causa uma desregulação do sistema protetor celular conduzindo à morte celular. No segundo mecanismo, a espécie reativa (STX) ataca diretamente a mitocôndria, causando danos mitocondriais irreversíveis e conduzindo à morte celular (HALLIWELL, 2007).

Dentre os antioxidantes empregados, a SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido; está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular. O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o peróxido de hidrogênio, retirado do meio pela CAT, que o transforma em água e oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1995; VALKO *et al.*, 2006). A CAT é uma enzima de extrema importância para a proteção do sistema nervoso e remoção do peróxido formado, estando presente em todas as partes do sistema nervoso animal (FRIDOVICH, 1995). A CAT está localizada principalmente no peroxissoma; entretanto, outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT. A VitE (α -tocoferol) é o maior e mais importante antioxidante

lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a LPO (ROY *et al.*, 2002; VALKO *et al.*, 2006). Nossos resultados sugerem que a administração da VitE em pessoas que foram contaminadas pela STX, pode equilibrar os efeitos da LPO. A VitC (ácido ascórbico) é um importante e poderoso antioxidante que atua em ambientes hidrofílicos do corpo. Seus parceiros antioxidantes preliminares são a VitE e os carotenóides, que trabalham juntos tão bem quanto as enzimas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2006).

Os pré-tratamentos com VitE e SOD+CAT ao meio de cultura antes da exposição à STX pareceram ser eficientes na prevenção à LPO quando comparados ao que ocorreu com VitC. O antioxidante VitC não se demonstrou eficiente para a proteção das células N2A quando expostas ao estresse oxidativo da STX, possivelmente devido a uma alta relação de concentração com a espécie reativa. Em condições específicas (na presença de Cu intracelular na forma de [CuZnSOD] do espaço intermembranar mitocondrial e no citosol) o ascorbato pode ser oxidado produzindo espécies citotóxicas (HALLIWELL, 2006). Neste caso, o antioxidante VitC potencializou de forma sinérgica o efeito tóxico da STX. Assim, uma pessoa que foi contaminada pela STX deve evitar o consumo de alimentos e medicamentos com altas concentrações desta vitamina. A VitC é conhecida como o maior antioxidante hidrofílico, e evidências recentes sugerem que VitE e VitC funcionam juntas em um processo cíclico (KOJO, 2004). A VitC coopera com a VitE para regenerar o α -tocoferol dos radicais α -tocopheróis nas membranas e nas lipoproteínas. Uma sugestão para futuros ensaios é a investigação da interação entre VitC e VitE no efeito protetor do estresse oxidativo provocado pela STX para diferentes tempos de incubação.

Os presentes resultados confirmam que a linhagem celular de neuroblastoma N2A é apropriada para a avaliação da toxicidade de STX e demonstraram que os principais mecanismos que provocam seus efeitos tóxicos envolvem danos mitocondriais indiretos e o estresse oxidativo, conduzindo possivelmente à morte celular com um processo apoptótico ou de lipoperoxidação

da membrana celular. Quando as células N2A foram tratadas com VitE e SOD/CAT, as taxas de produção de MDA diminuíram significativamente nas concentrações mais baixas de STX, quando comparadas à condição sem antioxidantes. O antioxidante de VitC mostrou não ser eficiente para proteger a célula N2A do ataque oxidativo de STX.

5.5 RESULTADOS DO ARTIGO 3: TESTE DO MICRONÚCLEO

Os resultados apresentados neste subitem fazem parte do terceiro artigo elaborado neste estudo, o qual apresentou a toxicidade da STX sobre as células por meio do ensaio de micronúcleo. O artigo intitulou-se “MICRONUCLEI INDUCTION IN VERO CELLS AND NEURO 2-A CELLS BY SAXITOXIN” e foi submetido à revista científica “Journal of Toxicology”. O artigo original é apresentado no Apêndice A10.

5.5.1 Influência da STX na viabilidade celular em Células N2A e Vero: teste do MTT e Determinação da EC50

Para a determinação da EC50, uma escala de oito concentrações de STX (0,5 a 64,0nM) foram aplicadas em três diferentes experimentos. Após exposição das células N2A e Vero à STX e tratamento dos dados, uma curva de viabilidade *v.* concentração de STX foi plotada para os dois casos. Este resultado é apresentado na Figura 5.6.

Uma redução dose-dependente da viabilidade celular é observada para ambos os casos com o aumento da concentração de STX de 0,5 a 64nM. É possível observar também uma significativa semelhança entre as curvas de viabilidade obtidas para as células N2A e Vero. Os resultados desses testes demonstram que a exposição das células N2A e Vero a diferentes concentrações de STX conduz à uma redução da dose-dependente da atividade metabólica da mitocôndria, e conseqüentemente da viabilidade celular.

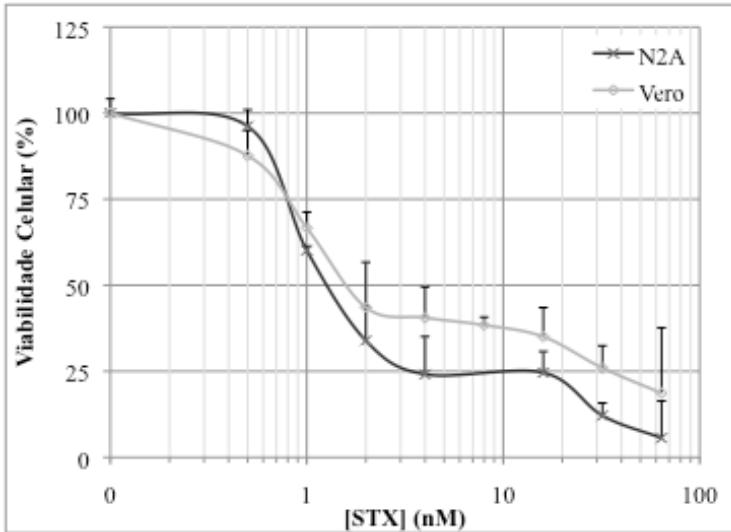


Figura 5.6: Perfil dose-resposta da STX em células N2A e Vero, pela viabilidade celular v. concentração STX ($R^2=0,997$ para células N2A e $R^2=0,964$ para células Vero).

Para os testes com as células N2A, a redução foi de 96,2% de viabilidade celular para a concentração de 0,5nM de STX e de 24,1% para 4,0nM de STX. Na dose mais elevada de STX avaliada neste estudo, a viabilidade celular foi de 5,6%. Para os testes com as células Vero, a redução foi de 87,6% de viabilidade celular para a concentração de 0,5nM de STX e de 40,6% para 4,0nM de STX. Na dose mais elevada de STX avaliada neste estudo, a viabilidade celular foi de 18,6%.

Das curvas plotadas na Figura 5.6, foi possível calcular a EC50 para as células N2A, que foi de 1,1nM, e para as células Vero, que foi de 1,05nM. Esses resultados definiram o intervalo de concentrações utilizado no teste do micronúcleo. Como foram encontrados valores muito próximos de EC50, determinou-se novamente que os valores testados seriam de 0,4, 0,8, 1,5 e 3,0nM de STX para ambas as células.

5.5.2 Teste do Micronúcleo

Com relação ao teste do micronúcleo em células N2A e Vero, as frequências de BNMN são apresentadas na Figura 5.7. Este ensaio foi empregado para identificar a genotoxicidade da STX que possa induzir algum dano genético. Durante a contagem de BNMN, foi observado um alto número de células mononucleadas. Devido à elevada quantidade dessas células, estas foram incluídas na contagem total de micronúcleos, considerando que tal condição seja induzida pela STX. Os resultados demonstram um significativo aumento dose-dependente do BNMN para as células N2A de $4,5 \pm 1,3$ ($0,38 \text{ nM}$ de STX) para $10,0 \pm 2,2$ ($3,00 \text{ nM}$ de STX), quando comparados com o controle ($1,0 \pm 0,8$), e para as células Vero de $17,5 \pm 2,1$ ($0,38 \text{ nM}$ de STX) para $27,5 \pm 2,1$ ($3,00 \text{ nM}$ de STX), quando comparados com o controle ($7,0 \pm 1,0$).

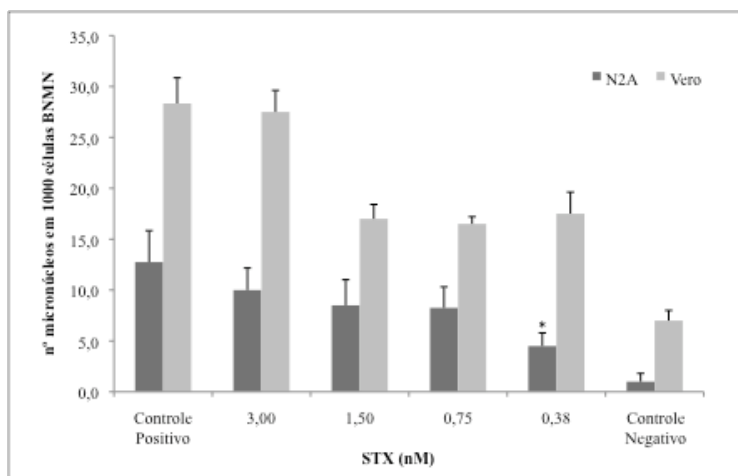


Figura 5.7: Número de células BNMN induzidas pela STX ($0,38$; $0,75$; $1,50$; $3,00 \text{ nM}$) sobre 1.000 células binucleadas (BN) N2A e Vero após 24 horas de exposição. A colchicina foi empregada como controle positivo. Os resultados estão expressos como média de três experimentos \pm DP ($n = 3$). * não apresentou diferença significativa com relação ao controle negativo ($p > 0,05$).

Nas mesmas condições, as culturas celulares tratadas com colchicina (controle positivo) demonstraram um significativo aumento quando comparadas com o controle do teste, apresentando valores de $12,8 \pm 3,5$ para células N2A e $28,3 \pm 2,5$ para células Vero. A Figura 5.8 traz a imagem de células binucleadas controle e células BNMN tratadas com STX.

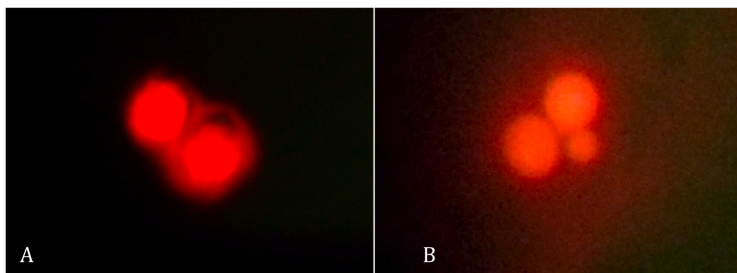


Figura 5.8: Células N2A coradas com “acridine orange” e brometo de etídio (Aumento: 1000x) A: controle célula BN; B: célula BNMN.

5.6. DISCUSSÃO DO ARTIGO 3:

No presente estudo, células N2A e Vero foram tratadas num primeiro estágio com oito concentrações de STX, num intervalo de 0,5 a 64nM, para determinar a EC50 para as células avaliadas, e em um segundo estágio com concentrações específicas (0,4-3,0nM) para avaliar a indução à formação de micronúcleos pelo teste do micronúcleo em 24 horas de exposição, enfatizando o tratamento com STX para avaliar a sua genotoxicidade de indução de danos em nível mutagênico.

Os efeitos genotóxicos da STX pela indução à formação de micronúcleo ainda não foram relatados na literatura científica. Em um estudo prévio (PERREAULT *et al.*, 2011), foi demonstrado o potencial efeito citotóxico da STX, induzindo à apoptose celular de células N2A, e seu significativo efeito indutor na perturbação do sistema de regulação celular. Em outro estudo (MELEGARI *et al.*, 2011) foi demonstrado que a STX pode induzir a significativos níveis de estresse oxidativo em células

N2A. Estudos similares empregando outras neurotoxinas podem ser encontrados na literatura. Guzmán *et al.* (2007) avaliaram o potencial genotóxico da tetrodotoxina em células ósseas de camundongo marrom, e não foram encontradas evidências que concluam seu potencial genotóxico. Carvalho Pinto-Silva *et al.* (2006) avaliaram o potencial genotóxico do ácido domóico e ácido ocadáico sobre células Caco-2. Ambos demonstraram-se mutagênicos, induzindo à formação de micronúcleos; entretanto, o ácido domóico apresentou apenas danos clastogênicos. Estudos avaliando outras variedades de toxinas podem ser encontrados na literatura. Humepage *et al.* (2000) avaliaram em linfoblastos WIL2-NS a atividade genotóxica da cilindrospermopsina (CYN), uma potente toxina que inibe a síntese de proteínas e é também comumente produzida pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. Seus resultados sugeriram que a CYN age induzindo danos citogenéticos por dois mecanismos: clastogênicos e aneugênicos.

A colchicina, empregada como controle positivo neste estudo, é característica pela indução a danos aneugênicos (KIRCHNER; ZELLER, 2010) e foi escolhida para avaliar a propensão de indução *in vitro* à formação de micronúcleos especificamente aneugênicos.

Com relação aos critérios morfológicos das amostras analisadas, foi verificada uma elevada presença de células mononucleadas nas amostras intoxicadas por STX, quando comparadas com o controle. Esta evidência sugere que a STX pode inibir a divisão celular. Entretanto, a maioria dos micronúcleos encontrados foram em células binucleadas, sendo esse resultado um indicativo do potencial mutagênico da STX. Não foram observados casos de necrose celular por formação de células multinucleadas (FENECH, 2000). Foram significativos os MN com o tamanho de 1/3 a 1/6 do núcleo principal encontrados em células binucleadas com relação aos MNs menores (Fig. 5.8B). Foram ainda identificadas como característica morfológica destes MNs: tocam o núcleo principal mas não o sobrepõem e apresentam a mesma intensidade de coloração do núcleo principal (FENECH, 2000). Hashimoto *et al.* (2010) realizaram um estudo

na tentativa de desenvolver uma técnica rápida que discrimine danos aneugênicos de clastogênicos levando em conta o tamanho dos micronúcleos (grandes e pequenos) em testes *in vitro*. Para isso, escolheram 9 aneugênicos e 6 clastogênicos, comparando a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e a proporção da contagem de micronúcleos grandes com relação ao total de micronúcleos encontrados. Seus resultados mostraram que todos os aneugênicos testados aumentaram significativamente a proporção de centrômeros positivos (FISH) e apresentaram maiores proporções de MN de tamanhos grandes. Com isso, concluíram que o método de classificação por tamanho do micronúcleo é um método rápido, simples e confiável para discriminar danos *in vitro* aneugênicos de clastogênicos. Embora não tenham sido empregados os ensaios FISH para a caracterização do dano deste estudo como aneugênico ou clastogênico, baseando-se nos resultados de Hashimoto *et al.* (2010) e considerando a frequência de MN de tamanho grande, foi possível estabelecer indícios de que os danos causados pela STX são de origem aneugênica.

Assim, os resultados do presente estudo permitem concluir que, nas condições testadas, a STX causou significativa indução do aumento da frequência BNMN em ambas as células N2A e Vero, pois a exposição dessas células apresentou uma correlação dose-dependente com o aumento da concentração de STX. O aumento da frequência de micronúcleo com a variação da concentração de STX evidencia que a STX induz um potencial efeito genotóxico em células N2A e Vero.

Como sugestão de futuros estudos, propõe-se que sejam efetuados ensaios do micronúcleo na presença de sondas marcadoras por ensaios FISH que identifiquem com maior segurança a natureza do dano aneugênico do clastogênico para confirmar os resultados obtidos neste estudo. A pesquisa com outras linhagens celulares, diferentes das aqui empregadas, também seria relevante para identificar o potencial genotóxico da STX sobre diferentes sistemas celulares.

5.7 RESULTADOS DO ARTIGO 4: ENSAIOS DE ADSORÇÃO

Os resultados apresentados neste subitem fazem parte do quarto artigo deste estudo (ainda em elaboração), o qual apresentou os ensaios de adsorção da STX sobre dois diferentes adsorventes (quitina e pó de ostra) em meio tamponado em dois pH diferentes. O título provisório do artigo é “ESTUDO DO USO DE QUITINA E CONCHA DE OSTRAS COMO ADSORVENTES PARA REMOÇÃO DE SAXITOXINA DE SOLUÇÃO AQUOSA” e, quando concluído, será submetido à revista científica “Science of the Total Environment”. O projeto preliminar do artigo é apresentado no Apêndice A11.

5.7.1 Efeito da concentração e o tempo de contato

A STX aquosa foi removida da solução quando em contato com os adsorventes testados (Fig. 5.9 e 5.10) e os ensaios de adsorção da STX ao longo do tempo de mistura para os pH empregados para a quitina e OSP apresentaram uma significativa remoção (>50% remoção) em ambos os casos testados em 1080min (18h) de tempo de contato. No experimento controle, apenas com a STX sem adsorvente, não foi observado alteração da concentração da toxina ao longo dos tempos de contato do teste. Este fato comprova a que houve reação de adsorção nos experimentos com a presença das matrizes adsorventes estudadas.

A taxa de remoção de STX pelos adsorventes diminui com o tempo de contato, possivelmente pela saturação dos sítios adsorventes. Esse comportamento sugere que a adsorção neste caso pode ocorrer por mecanismos de troca iônica. Essa saturação dos sítios adsorventes pode estar associada também à presença de fosfato em solução provenientes do tampão empregado, especialmente para o caso da OSP. A troca iônica entre os íons dos tampões e os adsorventes foi relatada por outros autores (MILLER *et al.* 2001; BURNS *et al.* 2008). O emprego do tampão para esses ensaios de adsorção foi importante para garantir a estabilidade do pH, uma vez que a presença desses adsorventes em solução aquosa (principalmente OSP – BLAIS *et*

at, 2003) altera notavelmente o pH do meio para valores superiores à 6,0. Para o pH 7,0, após 2880min (48h) de tempo de contato foi observado que a concentração da STX em solução tendeu a estabilizar, provavelmente atingindo a capacidade de adsorção, no equilíbrio entre adsorvente e adsorvato. Esse equilíbrio de adsorção para ambos os adsorventes em pH 5 não foi observado após 4320 min (72h) de tempo de contato. O pH parece ser o provável interferente para que se atinja o equilíbrio neste caso, favorecendo mecanismo de dessorção (MILLER *et al*, 2005.) e ainda possível perda da massa dos adsorventes por mecanismos de solubilização dos mesmos em pH de caráter ácido (SEPHTUM *et al*. 2007).

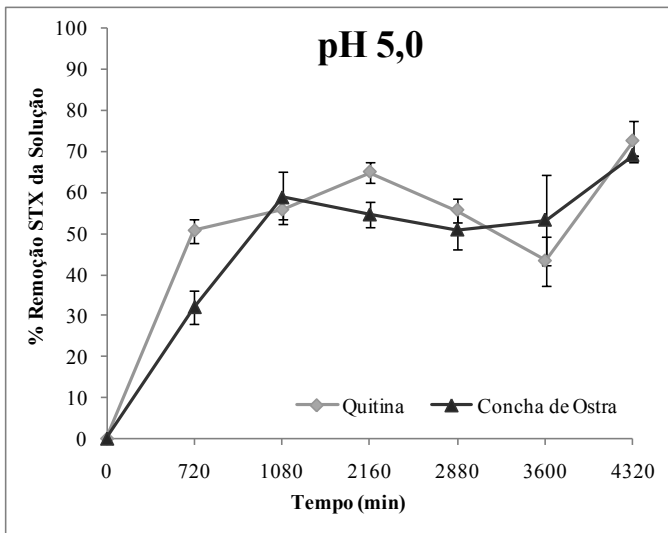


Figura 5.9: Processo cinético de adsorção da STX em quitina e pó de concha de ostra. Condições: 10 μ M STX, 200mg de adsorvente, pH 5,0 e 25°C.

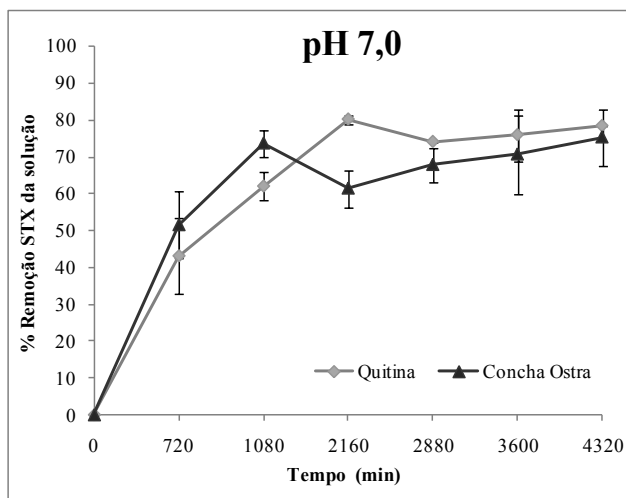


Figura 5.10: Processo cinético de adsorção da STX em quitina e pó de concha de ostra. Condições: 10 μ M STX, 200mg de adsorvente, pH 7,0 e 25°C.

5.7.2 Considerações sobre Adsorção

Os dados obtidos no equilíbrio ($t = 4320\text{min}$) foram avaliados em três diferentes modelos de isotermas que podem descrever o mecanismo de adsorção neste estudo: o modelo linear (Equação 5.1), o modelo de Langmuir (Equação 5.2) e o modelo de Freundlich (Equação 5.3), sendo a isoterma de Freundlich vêm sendo atualmente a mais adotada para a determinação da adsorção das cianotoxinas em sedimentos (MILLER *et al.*, 2001). A quantidade de STX adsorvida (μg) por kg de adsorvente foi quantificada a partir da concentração remanescente em solução, e o coeficiente de adsorção foi calculado a partir destas isotermas de adsorção (MILLER *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2005; SCHWARZENBACH *et al.*, 2003).

$$Q_e = K_d C_e \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{K_{ads} Q_m} + \frac{C_e}{Q_m} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

$$\log Q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Eq. 5.3})$$

onde Q_e é quantidade em μg de STX adsorvida por kg de adsorvente ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), C_e é concentração STX na solução no tempo de mistura ($\mu\text{g.L}^{-1}$), K_d é coeficiente de distribuição linear ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), Q_m é a capacidade máxima de adsorção ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), K_{ads} é a constante de equilíbrio de adsorção, K_F é coeficiente de adsorção Freundlich ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e n é medida de não-linearidade, relacionado com a densidade de adsorção.

As equações lineares foram obtidas das isotermas de adsorção da STX, com ajustes ao modelo Linear (Fig. 5.11) e ao modelo de Freundlich (Fig. 5.12) para os adsorventes testados à 25°C. Pelo ajuste a estes modelos, pode-se obter valores do coeficiente de distribuição (K_d) e da capacidade do sítio de adsorção (K_F) apresentados na Tabela 5.2. Os dados não se ajustaram com boa linearidade ao modelo da isoterma de adsorção de Langmuir. Propõe-se com esse comportamento que a superfície dos adsorventes não é homogênea e sítios de adsorção não possuem mesma energia para o adsorvente, o que seria equivalente a uma adsorção em monocamada, compatível com um processo de quimissorção descrita por esse modelo (SEPTHUM *et al.*, 2007).

Para o adsorvente quitina, em ambos os pHs testados, os modelos Linear e de Freundlich apresentaram ajustes aceitáveis, com valores de R^2 que variaram de 0,958-0,992. Os elevados valores de K_d (48,14-50,17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e K_F (40,46-64,24 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) mostram uma alta afinidade química deste adsorvente pela STX. Na Tabela 1 são apresentados ainda os valores de n de 0,90-1,18, revelando que a adsorção da STX pela quitina pode ser considerada processo químico favorável e indicado, confirmando a heterogeneidade e adequada distribuição dos sítios energéticos de adsorção.

Para o adsorvente OSP, ambos os modelos Linear e de Freundlich apresentaram melhores ajustes na condição pH 7,0, com R^2 que variaram de 0,992-0,995. Os elevados valores de K_d (47,31-50,65 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e K_F (46,65-54,70 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) refletem uma grande afinidade deste adsorvente pela STX. Os valores de n de

0,98-1,05 mostram que o processo de adsorção da STX a este adsorvente pode também ser considerado favorável. Para pH 5,0, os valores de R^2 variaram de 0,869-0,873. Neste caso, o ajuste aos modelos aplicados pode ter sido influenciado pela relação entre o pH do meio e a composição deste adsorvente. A constituição do OSP é na sua maioria carbonato de cálcio (~60% conforme HSU, 2009), que possui sua solubilidade aumentada em pHs ácidos

De acordo com a isoterma da adsorção de Freundlich, as frações de cobertura de superfície (Q_e) estão relacionadas à concentração do equilíbrio do adsorbato. A isoterma de Freundlich descreve o equilíbrio em superfícies heterogêneas e, por esta razão, não assume uma capacidade de adsorção em monocamada (FÁVERE *et al.*, 2010). Esta justificativa pode explicar os bons ajustes dos materiais empregados a esse modelo, pois esses adsorventes são de origem natural e é esperado que apresentem de fato superfícies heterogêneas. Para ambos os adsorventes testados, a condição pH 7,0 se demonstrou mais favorável ($R^2 = 0,983-0,995$). Essa evidencia pode ser justificada pelo comportamento observado no ensaio de tempo de contato, onde essa condição atingiu o equilíbrio de adsorção em 2880min (48h), desempenho não observado para a condição em pH 5,0 ($R^2 = 0,869-0,873$).

Tabela 5.2: Parâmetros obtidos pelas isotermas de adsorção da STX nas diferentes condições analisadas.

Adsorventes	pH	Modelo Linear		Modelo de Freundlich		
		$K_a(\mu\text{g.kg}^{-1})$	R^2	n	$K_F(\mu\text{g.kg}^{-1})$	R^2
Quitina	5.0	50.17	0.987	0.90	40.46	0.958
	7.0	48.14	0.992	1.18	64.24	0.983
Concha Ostra	5.0	47.31	0.873	1.05	54,70	0.869
	7.0	50.65	0.995	0.98	46.65	0.992

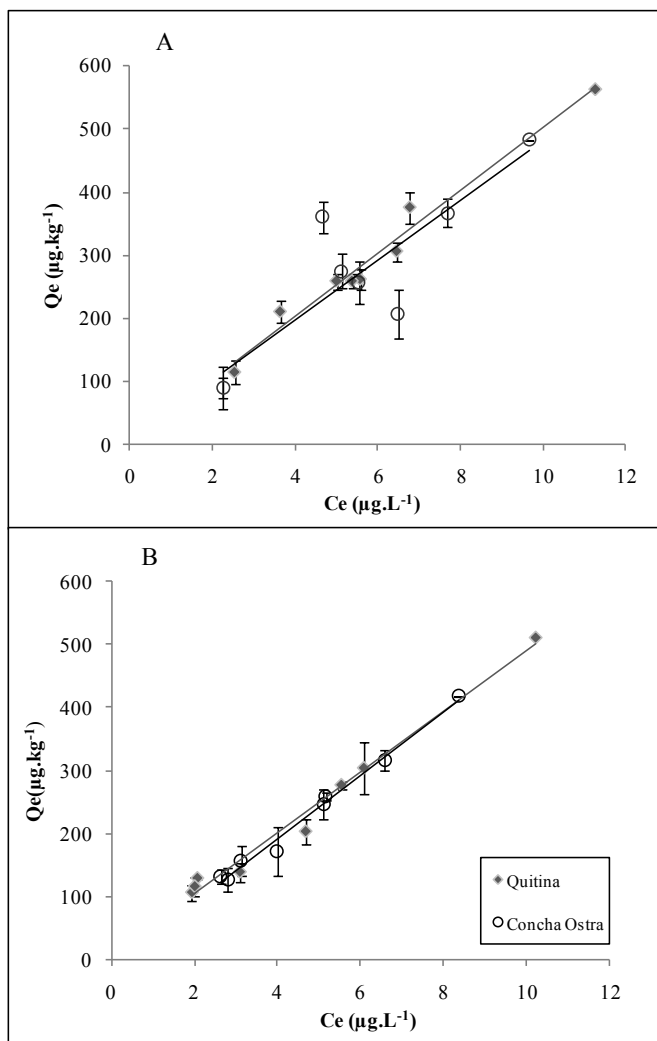


Figura 5.11: Isothermas de adsorção linear para STX em quitina e em pó de concha de ostra à 25°C em (A) pH 5,0 ($p < 0.05$), e (B) pH 7,0 ($p < 0.05$).

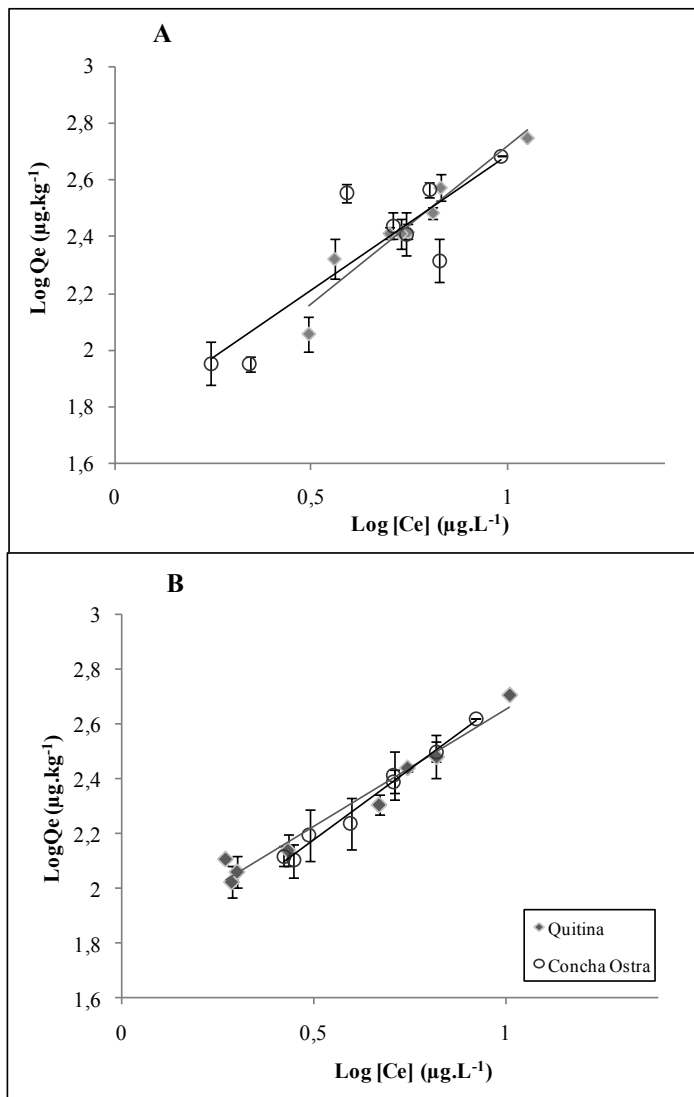


Figura 5.12: Isotermas de adsorção de Freundlich para STX em quitina e em pó de concha de ostra à 25°C em (A) pH 5,0 ($p < 0.05$), e B) pH 7,0 ($p < 0.05$).

5.7.3 Considerações Termodinâmicas

A energia livre de Gibbs de adsorção (ΔG_{ads}) é relatada por Odoemelam e Eddy (2009) de acordo com a Equação 5.4 descrita a seguir,

$$\Delta G_{ads} = - 2,303.R.T.\log K \quad (5.4)$$

onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura.

Usando os valores de K_F calculados a partir das isotermas de Freundlich, os valores de ΔG_{ads} de adsorção para a STX puderam ser calculados para os adsorventes testados em ambos os pH, e são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Valores de ΔG_{ads} para a STX para os adsorventes testados nos pH 5,0 e 7,0.

<i>Adsorventes</i>	<i>pH</i>	<i>ΔG_{ads} (kJ.mol⁻¹)</i>
Quitina	5.0	-9,182
	7.0	-10,324
Concha Ostra	5.0	-9,843
	7.0	-9,530

Os valores dos ΔG_{ads} negativos indicam que a adsorção de STX nos adsorventes foi espontânea e favorável nas condições experimentais, e indicam também que o mecanismo da adsorção química é aplicável à adsorção de STX por ambos os adsorventes testados. Estes valores podem ainda ser melhorados favorecendo uma adsorção mais efetiva, realizando combinações destes com outros adsorventes eficientes para a adsorção da STX. p.e. argilas e/ou nanomateriais (BURNS *et al.*, 2008; UPADHYAYULA *et al.*, 2009), ou ainda aumentando-se a temperatura do processo (HSU, 2009).

5.8 DISCUSSÃO ARTIGO 4

A quitina e OSP demonstraram serem adsorventes baratos e com boa capacidade de remoção da STX de soluções aquosa (>50% em 1080min), dentro dos limites de concentração estudados, sendo uma alternativa viável para utilização em ETA, abastecida por água de mananciais que apresentam risco de contaminação por STX. A taxa de remoção de STX pelos adsorventes diminui com o tempo de contato, possivelmente pela saturação dos sítios adsorventes, sugerindo que a adsorção ocorra por mecanismos de troca iônica. Verificou-se que o equilíbrio de adsorção é influenciado pelo pH do meio, sendo desfavorecido em pH ácido. As características da quitina e OSP foram consistentes com o modelo de adsorção clássico da isoterma Linear e de Freundlich, com coeficientes de adsorção que variaram de 40,5-64,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a quitina, e de 46,6-52,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para OSP. Estudos termodinâmicos revelaram que o processo de adsorção é espontâneo e favorável.

Os resultados mostram que o emprego destes materiais para a remoção de STX de solução aquosa é conveniente, ressaltando, assim, mais uma aplicação para a ampla gama de suas potenciais aplicações. A possibilidade de incorporação destes materiais em sistemas de tratamento de água é muito animadora, pois as carapaças de crustáceos e as conchas de moluscos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos são considerados poluentes ao meio ambiente. Sua reutilização reduz impactos ambientais causados nos locais onde são gerados ou estocados.

Contudo, entende-se ser necessária a realização de outros estudos que investiguem formas de incorporar estes materiais em um sistema de tratamento de água em grande escala. Assim, sugerem-se outras possibilidades de estudo:

- Avaliação do processo de adsorção destes materiais associados ao carvão ativado. Numa análise rápida e superficial, esta associação pode ser vantajosa, pois irá aumentar a eficiência do carvão ativado para a remoção da STX em solução e irá diminuir os custos, pois a quantidade

de carvão empregado será menor, podendo ainda melhorar a velocidade do processo.

- Estudo da avaliação da capacidade de adsorção destes materiais com outras cianotoxinas solúveis em água como as hepatotoxinas.
- Estudo de tratamento e destinação final destes resíduos após adsorção da STX, a fim de minimizar os impactos ambientais associados.

5.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA COMPLEMENTAÇÃO DO ESTUDO DE CASO: LAGOA DO PERI

Previamente, no exame de qualificação desta tese, foi proposto um monitoramento da Lagoa do Peri, por meio da coleta de amostras de água de alguns pontos anteriormente estabelecidos onde, por um período de 01 (um) ano, seriam realizadas coletas em intervalos sazonais. Entretanto, após melhor reflexão desta proposta, concluiu-se que essa etapa seria desnecessária, uma vez que foram encontradas produções científicas dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da UFSC, descrevendo monitoramentos sazonais da Lagoa do Peri em diferentes períodos, já realizados ao longo dos últimos anos. Tais dados, entretanto, têm sua utilidade na discussão do objetivo proposto com a metodologia inicial desta tese. Assim, cabe, aqui, apresentar um breve relato dos mencionados trabalhos, que serão úteis para verificar a presença de STX, quais as concentrações de STX naqueles períodos e a relação de tais valores com o estabelecido pela legislação brasileira.

Melo-Filho (2006) avaliou o método da ozonização como pré ou pós-tratamento à filtração direta descendente na remoção de cianobactérias e STXs. Foi empregado um método de detecção de STX por HPLC-FD, não mencionando o limite de detecção do método. A concentração de STX presente na água bruta da Lagoa do Peri variou no período de 1 (um) mês de monitoramento (maio/2005) de 3,28 a 4,09µg/L. Após o tratamento proposto, foram encontrados valores entre 0,01-0,04µg/L eq. STX.

Mondardo (2009) avaliou a filtração em margem como pré-tratamento à filtração direta descendente na remoção de células de cianobactérias e STXs. Foi empregado um método de detecção de STX por HPLC-FD, não mencionando o limite de detecção do método. Nesse estudo, num monitoramento de junho-setembro de 2005, não foram detectados valores de concentração de STX presente na água bruta da Lagoa do Peri. Entretanto, foram detectados valores de equivalentes de STX, referentes a outras STXs do grupo (NEO e GTX), em concentrações intracelular que variaram de 1,70-7,54 $\mu\text{g/L}$ eq. STX e dissolvido 3,8 $\mu\text{g/L}$ eq. STX. Essas amostras de água bruta não foram empregadas no seu tratamento por apresentarem valores muito baixos para avaliação do percentual de remoção.

Coral (2009) avaliou a remoção de cianobactérias e cianotoxinas em águas da Lagoa do Peri destinadas ao abastecimento pela associação de flotação por ar dissolvido e nanofiltração. Foi empregado um método de detecção de STX por HPLC-FD, com limite de detecção de 0,08 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em suas coletas, que ocorreram no ano de 2008, foram determinados valores de STX na água bruta que variaram entre 3,35-10,58 $\mu\text{g/L}$. Após o tratamento proposto, foram registrados percentuais de remoção que variaram de 11,03-100% dependendo de vários fatores como tipo de filtro, valores de pressão exercida e tempo de contato com os filtros.

Verificam-se, nesses estudos, que os valores de concentração de STX encontrados nas amostras de água bruta extrapolam os limites permitidos pela legislação brasileira, a Portaria n° 518 do Ministério da Saúde, que determina valores de 3,0 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes STX/L. Entretanto, os tratamentos propostos por esses estudos foram capazes de adequarem suas amostras ao valor estabelecido pela legislação vigente.

De acordo com os ensaios citotóxicos *in vitro* realizados neste estudo, foi possível encontrar um valor de EC50 para STX de 1,112nM em células N2A e 1,054nM em células Vero. Ainda foram observados, nessas mesmas concentrações, efeitos de estresse oxidativo e genotóxico induzidos pela presença da STX, como aumento da incidência de micronúcleos e indução à

hipermetilação do DNA. Foram detectados efeitos genotóxicos significativos em concentrações de 3,0nM de STX, o que equivale a uma concentração de aproximadamente 1,2µg/L. Esse valor equivale a menos da metade do valor recomendado como VMP pela legislação brasileira. Avaliando esses resultados, é possível constatar que os valores expostos anteriormente de STX em amostra de água bruta da Lagoa do Peri, em diferentes estudos, são elevados e potencialmente tóxicos.

Nesta tese foram investigados os efeitos tóxicos *in vitro* da STX sob células N2A e Vero, a fim de confirmar as duas primeiras hipóteses propostas. Todos os resultados encontrados nos ensaios citotóxicos e genotóxicos confirmaram tanto a primeira como a segunda hipótese de pesquisa. A primeira hipótese afirmava que “a saxitoxina pode causar efeito citotóxico e genotóxico aos indivíduos que são expostos a esta toxina” e a segunda hipótese afirmava que “o valor recomendado na Portaria nº 518 do Ministério da Saúde não é seguro, pois valores abaixo do VMP causam efeitos tóxicos em nível celular”.

Contudo, considerando esta problemática da presença de STX em águas destinadas ao abastecimento público e a alta solubilidade da STX em água, este estudo apresentou uma alternativa para a remoção de STX de soluções aquosas, avaliando os materiais naturais quitina e concha de ostra como adsorventes. Esses materiais apresentaram boa porcentagem de remoção (>50% em 18h), e o processo de adsorção mostrou-se favorável e espontâneo. Dessa forma, estes resultados confirmam a terceira hipótese de pesquisa que afirmou que “a quitina e a concha de ostra podem ser empregadas como adsorventes para a remoção de STX de soluções aquosas”, e propõe uma destinação para tais resíduos da indústria pesqueira, reduzindo impactos ambientais provocados por sua subutilização.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Este estudo apresentou como principal objetivo avaliar os impactos da STX na qualidade da água destinada ao consumo humano, estudando seu mecanismo de ação tóxica e avaliando seu processo de remoção da água por adsorção em diferentes materiais de origem natural. Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que:

- A STX apresentou considerável citotoxicidade *in vitro* nas células testadas N2A e Vero quando avaliadas pelo método do MTT, pois os valores de EC50 encontrados foram de 1,112nM em células N2A e 1,054nM em células Vero.
- Os ensaios genotóxicos de fragmentação e metilação do DNA demonstraram que a STX induziu uma fragmentação e uma hipermetilação do DNA das células expostas, indicativos estes de que a STX pode ser indutora de uma morte celular programada (apoptose) e de consequências mutacionais e epigenéticas nos genomas das células expostas.
- A STX apresentou potencial de indução *in vitro* de células N2A ao estresse oxidativo, elevando os níveis de MDA produzidos pela célula exposta. Ainda foi possível verificar neste ensaio que a vitamina E e as enzimas combinadas SOD+CAT exercem, nas células, um efeito protetor contra a toxicidade da STX, diminuindo significativamente os níveis de MDA produzido. Neste mesmo ensaio, verificou-se que a vitamina C potencializa os efeitos tóxicos da STX, elevando ainda mais os níveis de MDA produzidos pela célula.
- Nas condições testadas, a STX induziu significativamente o aumento da frequência BNMN em ambas as células N2A e Vero, pois a exposição dessas células à STX fez com que apresentassem um aumento dose-dependente com o aumento da concentração de STX, causando efeitos

genotóxicos nas células expostas, os quais foram identificados como aneugênicos.

- A concha de ostra calcinada e a quitina exibiram boa capacidade de remoção da STX de soluções aquosa dentro dos limites de concentração estudados, e as características da concha de ostra e da quitina foram consistentes com o modelo de adsorção clássico da isoterma Lin e N-Lin de Freundlich, segundo o qual valores de K_F apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os adsorventes testados, indicando que concha de ostra em pH 5,0 e a quitina em pH 7,0 apresentaram maior capacidade de adsorção da STX.
- Os valores dos ΔG_{ads} negativos permitem concluir que a adsorção da STX nesses materiais é favorável e espontânea, tendo, portanto, aplicabilidade como adsorventes para a remoção de STX de soluções aquosas.
- Um levantamento de estudos de outros autores, realizados no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, os quais avaliaram a concentração de STX em amostras de água bruta da Lagoa do Peri, foram relatadas concentrações que extrapolam os limites permitidos pela legislação brasileira, a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, que determina valores de 3,0 $\mu\text{g/L}$ de equivalentes STX/L.

Algumas recomendações para futuras pesquisas baseadas nestes estudos são:

- Realizar outros ensaios citotóxicos e genotóxicos que identifiquem e confirmem os resultados demonstrados pela STX neste estudo.
- Proceder a estudos com outras linhagens celulares, diferentes da empregada nesta tese, para identificar o potencial genotóxico da STX sobre diferentes sistemas celulares.
- Investigar da interação entre VitC e VitE no efeito protetor do estresse oxidativo provocado *in vitro* pela STX para diferentes tempos de incubação.

- Efetuar ensaios do micronúcleo na presença de sondas que identifiquem com maior segurança a natureza do dano como aneugênico ou clastogênico para confirmar os resultados obtidos neste estudo.
- Avaliar o processo de adsorção da concha de ostra e da quitina associadas ao carvão ativado.
- Avaliar a capacidade de adsorção da concha de ostra e da quitina com outras cianotoxinas solúveis em água como as hepatotoxinas.
- Estudar o tratamento e a destinação final dos resíduos de concha de ostra e de quitina após adsorção da STX, a fim de minimizar os impactos ambientais associados.

CAPÍTULO VII

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVITO, P. C.; GALLACHER, S.; GAGO, A.; LAWRENCE, J. F.; MARTINS, C. A.; PEREIRA, P.; BENTO, F. S.; FRANCA, F. Application of the mouse neuroblastoma bioassay to the study of PSP toxins from dinoflagellates and cyanobacteria: a comparison of data generated by the MNB assay to pre and post column HPLC. **Harmful Algae Blooms** 2000, p.257-260, 2001.

AMORIM, A. M. G. **Acumulação e depuração de microcistinas por *Mytilus Galloprovincialis* Lamarck**. Porto, 1997, 56p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal.

AMORIM, F. F. **Remoção dos Contaminantes Orgânicos β -estradiol e saxitoxinas (STX, Neo-STX e dc-STX) por meio de nanofiltração: avaliação em escala de bancada**. Brasília, 2007, 133p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – ENC/FT/UnB, Brasília.

ANDERSON, J. D.; HANSEN, T. P.; LENKOWSKI, P. W.; WALLS, A. M.; CHOUDHURY, I. M.; SCHENCK, H. A.; HÖLL, M. G.; PATEL, M. K.; SIKES, R. A.; BROWN, M. L. Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgenindependent prostate cancer cell line PC-3. **Mol. Cancer Ther.**, v. 2, p.1149-1154, 2003.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. João Pessoa, 2007, 88p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – UFPB/CCEN, João Pessoa.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Official Method 2005.06: Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish - Prechromatographic Oxidation

and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. First Action, 2005.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima e InterTox, 2003. 321p.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES S. A. ; BEZERRA D. C.; LIA FOOK M. V.; COSTA A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **REMAP**, v.2, n.3, p. 27-34, 2007.

BAND-SCHMIDT, C. J.; BUSTILLOS-GUZMÁN, J.; GÁRATE-LIZÁRRAGA, I.; LECHUGA-DEVÉZE, C. H.; REINHARDT, K.; LUCKAS, B. Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, México. **Harmful Algae**, v.4, p.21-31, 2005.

BARATA, D.; CRISPINO, L. M. B. **O ambiente aquático e as algas: curso de capacitação de monitores e educadores**. São Paulo: Instituto de Botânica – Ibt, 2006. 11p.

BARTRAM, J.; CARMICHAEL, W. W.; CHORUS, I.; JONES, G.; SKULBERG, O. M. Introduction. *In*: CHORUS, I., BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, p. 12-24, 1999.

BAUDRIMONT, I.; AHOANDJIVO, R.; CREPPY, E. E. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents. **Chem. Biol. Interact**, v. 104, p. 29-40, 1997.

BAYLIN, S. B.; ESTELLER, M.; ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p.687-692, 2001.

BEN-GIGIREY, B.; RODRÍGUEZ-VELASCO, M. L.; VILLAR-GONZÁLEZ, A.; BOTANA L. M. Influence of the sample toxic profile on the suitability of a high performance liquid chromatography method for official paralytic shellfish

toxins control. **Journal of Chromatography A**, v.1140, p.78-87, 2007.

BERGER, C.; BA, N.; GUGGER, M.; BOUVY, M.; RUSCONI, F.; COUTÉ, A.; TROUSSELLIER, M.; BERNARD, C. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Guiers (Senegal, WestAfrica). **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.57, p.355-366, 2006.

BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. Os polimorfos de carbonato de cálcio: uma síntese fácil de aragonita. **Quim. Nova**, v.31, n.1, p.178-180, 2008.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.**, v.16, p. 6-21, 2002.

BLAIS J.-F., SHEN, S., MEUNIER, N., TYAGI, R. D. Comparison of natural adsorbents for metal removal from acidic effluent. **Environmental Technology**, v.24: p.205-215 2003.

BOUAÏCHA, N. Impact sanitaire des toxines de cyanobactéries en milieu d'eau douce. **Revue Francaise des Laboratoires**, v. 336, p.39-46, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/ConstituicaoCompilado.htm. Acesso em: 01/04/2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em Saúde. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Série E, Legislação e Saúde. Brasília, 2005. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf. Acesso em: 01/04/2010.

BRUSICK, D. J.; FIELDS, W. R.; MYHR, B. C.; DOOLITTLE, D. J. Genetic Toxicology. *In*: HAYES, A.W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**, New York: Taylor & Francis, p. 1179-1181, 2007.

BURNS, J. M.; HALL, S.; FERRY, J. L. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in freshand saline waters. **Water Res.**, v. 43, p.1899-1904, 2009.

CAÑETE, E.; DIOGÈNE, J. Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. **Toxicon**, v.52, p.541-550, 2008.

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. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, 2001.

CARVALHO PINTO-SILVA, C. R. **Incidência de fitoplâncton tóxico na costa catarinense: risco para saúde pública e meio ambiente**. Florianópolis, 2005. 166p. Tese (Doutorado em Eng. Ambiental) – PPGEA-UFSC.

CARVALHO PINTO-SILVA, C. R.; FERREIRA, J. F.; COSTA, R. H. R.; BELLI FILHO, P.; CREPPY, E. E.; MATIAS, W. G. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. **Toxicon**, v. 41, p.93-97, 2003.

CARVALHO PINTO-SILVA, C. R.; MOUKHA, S.; MATIAS, W. G.; CREPPY, E. Comparative study of domoic acid and okadaic acid induced: chromosomal abnormalities in the CACO-2 cell line. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.3, n. 1, p. 4-10, 2006.

CARVALHO, S. L. Eutrofização artificial: um problema em rios, lagos e represas, **Correio de Três Lagoas**, Três Lagoas-MS, 2004.

CATTERALL, W. A.; CESTÈLE, S.; YAROV-YAROVOY, V.; YU, F. H.; KONOKI, K.; SCHEUER, T. Voltage-gated ion

channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v.49, p.124-141, 2007.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, 1999. 416p.

CHOW, C. W. K.; DRIKAS, M.; HOUSE, J.; BURCH, M. D.; VELZEBOER, R. M. A. The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Water Res.**, v.33, n.15, p.3253-3262, 1999.

CLOERN, J. E. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 210: p.223–253, 2001.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A célula: uma abordagem molecular**. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 2007. 716p.

CORAL, L. A. **Remoção de cianobactérias e cianotoxinas em águas de abastecimento pela associação de flotação por ar dissolvido e nanofiltração**. Florianópolis, 2009. 198p. Dissertação (Mestrado em Eng. Ambiental) – PPGEA-UFSC.

COSTA, I. A. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; SENNA, P. A. C.; BERNARDO, R. R.; COSTA, S. M.; CHELLAPPA, N. T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Braz. J. Biol.**, v.66, p.211-219, 2006.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Adaptações, lesão e morte celular. *In*: ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 10-18, 2000.

CREPPY, E. E.; CHIARAPPA, P.; BAUDRIMONT, I.; BORRACCI, P.; MOUKHA, S.; CARRATÙ, M. R. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are *in vitro* cytotoxicity data predictive of *in vivo* acute toxicity? **Toxicology**, v.201, p.115-123, 2004.

D'MELO, J. P. F. (Ed.) **Food safety: contaminants and toxins**. Edinburgh: CABI Publishing, 2003. 452p.

DAMIANI, C.R. **Estresse oxidativo e metabolismo em modelo animal de colite induzida por dextran sulfato de sódio**. Criciúma, 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-UNESC.

DEBERDT, G. L. B.; CANTUSIO NETO, R.; AGUJARO, L. F. **Florações de cianobactérias e sua inserção na legislação brasileira**. SANASA - Campinas / Educação Ambiental, 25/10/2006. Disponível em: http://www.sanasa.com.br/noticias/not_con1.asp?flag=PC-3. Acesso em 22/04/2008.

EHRlich, M.; GAMA-SOSA, M. A.; HUANG, L. H.; MIDGETT, R. M.; KUO, K. C.; MCCUNE, R. A.; GEHRKE, C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. **Nucleic Acids Res.**, v.10, p.2709-2721, 1982.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602p.

FALCONER, I. R. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. *In*: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. North Carolina: Springer Press, p. 607-612, 2008.

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, p.43-50, 2005.

FARIA, J. G.; CUNHA, A. M. Estudos sobre o micropâncton da baía do Rio de Janeiro e suas imediações. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.9, n.1, p.68-93, 1917.

FÁVERE, V. T.; RIELLA, H. G.; ROSA, S. Cloreto de n-(2-hidroxil) propil-3-trimetil amônio quitosana como adsorvente de corantes reativos em solução aquosa. **Quim. Nova**, XY, p.1-6, 2010.

FEINBERG A. P.; TYCKO B. The history of cancer epigenetics. **Nat. Rev. Cancer**, v.4, p.143-153, 2004.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mut. Res.**, v.455, p.81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v.14, p.605-612, 1999.

FERRÃO-FILHO, A. S.; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S. M. F. O. Influences of a microcystis aeruginosa KÜTZING bloom on zooplankton populations in Jacarepaguli Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). **Limnológica**, v.32, p.295-308, 2002.

FISKE, J. L.; FOMIN, V. P.; BROWN, M. L.; DUNCAN, R. L.; SIKES, R. A. Voltage-sensitive ion channels and cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v.25, p.493-500, 2006.

FITZGERALD, D. J.; CUNLIFFE, D. A.; BURCH, M. D. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking-water in South Australia. **Environ. Toxicol.**, v.14, p.203-209, 1998.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.**, v.64, p.97-112, 1995.

FROSTESJO, L.; HOLM, I.; GRAHN, B.; PAGE, A. W.; BESTOR, T. H.; HEBY, O. Interference with DNA methyltransferase activity and genome methylation during F9 teratocarcinoma stem cell differentiation induced by polyamine depletion. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.4359-4366, 1997.

GARCIA, T. V. **Remoção de Algas Através da Eletroflotação: Tratamento Eletrolítico Seguido de Filtração Direta no Tratamento de Água de Abastecimento.** Florianópolis, 2002. 97p. Dissertação (Mestrado em Eng. Ambiental). PPGEA-UFSC.

GONZALGO, M. L.; JONES, P. A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. **Mutat. Res.**, v.386, p.107-118, 1997.

GOOSEN, M. E. A. **Applications of chitin and chitosan.** Lancaster: Technomic Publishing Company, 1996. 336p.

GUZMÁN, A.; HENESTROSA, F. A. R.; MARÍN A. P.; HO, A.; BORROTO, J. I. G.; CARASA, I.; PRITCHARD, L. Evaluation of the genotoxic potential of the natural neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) in a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. **Mut. Res.**, v.634, p.14-24, 2007.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds.). **Manual on harmful marine microalgae**. Paris: UNESCO Publishing, 1995. 793p.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v.35, p.1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, v.1, p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J. Neurochem.**, v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1999. 704p.

HASHIMOTO, K.; NAKAJIMA, Y.; MATSUMURA, S.; CHATANI, F. An *in vitro* micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. **Toxicology in Vitro**, v.24, p.208-216, 2010.

HAVLIS, J.; TRBUSEK, M. 5-Methylcytosine as a marker for the monitoring of DNA methylation. **Journal of Chromatography B**, v.781, 373-392, 2002.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N. Engl. J. Med.**, v.349, p.2042-2054, 2003.

HIMBERG, K.; KEIJOLA, A. M.; HIISVIRTA, L.; PYYSALO, H.; SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from microcystis and oscillatoria cyanobacteria: a laboratory study. **Water Res.**, v.23, n.8, p.979-984, 1989.

HOEGER, S. J.; SHAWB, G.; HITZFELDC, B. C.; DIETRICH, D. R. Occurrence and elimination of cyanobacterial

toxins in two Australian drinking water treatment plants. **Toxicol.**, v.43, p.639-649, 2004.

HSU T-C. Experimental assessment of adsorption of Cu²⁺ and Ni²⁺ from aqueous solution by oyster shell powder. **J. Haz. Mat.** v.171: 995-1000, 2009.

HUMPAGE, A. R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I. R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mut. Res.**, v.472, p.155-161, 2000.

HUMPAGE, A. R.; LEDREUX, A.; FANOK, S.; BERNARD, C.; BRIAND, J. F.; EAGLESHAM, G.; PAPAGEORGIOU, J.; NICHOLSON, B.; STEFFENSEN, D. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.26, p.1512-1519, 2007.

ICMS - Institute of Cell and Molecular Science, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, Queen Mary, University of London, 4. Disponível em: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/apoptosis/dnafragmentation/>. Acesso em: 6 jul. 2009.

IKAWA, M.; WEGENER, K.; FOXALL, T. L.; SASNER, J. J. Comparison of the toxins of the blue-green alga aphanizomenon flos-aquae with the gonyaulaxtoxins. **Toxicol.**, v.20, p.747-752, 1982.

INOUE, M.; SATO, E. F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A. M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Curr. Med. Chem.**, v.10, p.2495-2505, 2003.

INSTITUTO DO PLANEJAMENTO URBANO DE FLORIANÓPOLIS (IPUF). **Plano Diretor do Parque da Lagoa do Peri**. Florianópolis: Relatório Final, Prefeitura Municipal De Florianópolis, 1978.

JELLET, J. F.; STEWART, J. E.; LAYCOCK, M. V. Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay. **Toxicol. In Vitro**, v.9, p.57-65, 1995.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil (Abstract). **The New England Journal of Medicine**, v.338, n.13, p.873-878, 1998.

JONES, P. A.; BRACHER, M.; MARENUS, K.; KOJIMA H. Performance of the neutral red uptake assay in the colipa international validation study on alternatives to the rabbit eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, v.13, p.325-333, 1999.

JONES, G. J.; NEGRI, A. P. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. **Water Res.**, v.31, p.525-533, 1997.

KEIJOLA, A. M.; HIMBERG, K.; ESALA, A. L.; SIVONEN K.; HIISVIRTA, L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot scale experiments. **Toxicity Assessment: An International Journal**, v.3, p.643-656, 1988.

KIMA, I.; HYUN, C. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.288-297, 2006.

KIRCHNER, S.; ZELLER, A. Comparison of different cytotoxicity measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit) in L5178Y tk+/- cells: Summary of 4 compounds (Mitomycin C, Cyclophosphamide, Colchicine and Diethylstilboestrol) with clastogenic and aneugenic mode of action. **Mut. Res.** v 702, p. 193-198, 2010.

KIRSCH, G. E.; ALAM, M.; HARTMANN, H. A. Differential effects of sulfhydryl reagents on saxitoxin and tetrodotoxin block of voltage-dependent Na channels. **Biophys. J.**, v.67, p.2305-2315, 1994.

KITANO, Y.; KANAMORI, N.; YOSHIOKA, S. Adsorption of zinc and copper ions on calcite and aragonite and its influence on the transformation of aragonite to calcite. **Geochemical Journal**, v.10, p.175-179, 1976.

KOJO, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, **Curr. Med. Chem.**, v.11, p.1041-1064, 2004.

KOUADIO, J. H.; DANOB, S.D.; MOUKHA, S.; MOBIO, T.A.; CREPPY, E. Effects of combinations of fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. **Toxicon**, v.49, p.306-317, 2007.

KUMAR, M.N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive Func. Polymers.**, v.46, p.1-27, 2000.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v.37, p.1359-1373, 1999.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96p.

LAW, M.; ELMORE, S. Mechanism of cell death. In: SMART R. C.; HODGSON, E. (Eds.). **Molecular and biochemical toxicology**. New York: John Wiley, p. 287-318, 2008.

LAWRENCE, J. F.; MÉNARD, C.; CLEROUX, C. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. **Journal of AOAC International**, v.78, n.2, p.514-520, 1995.

LEDREUX, A. **Optimisation d'un test sur lignee cellulaire de neuroblastomes pour la detection de neurotoxines de microalgues apport de techniques de chimie analytique.** Paris, 2006. These (Doctor in Sciences and Technology) – Conservatoire National des Arts et Métiers, ParisTech.

MACHADO, V. G. **Determinação do potencial tóxico e genotóxico de líquido percolado gerado em aterramento sanitário de resíduos sólidos urbanos.** Florianópolis, 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Eng. Ambiental) – PPGA-UFSC.

MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk, **Toxicon**, v.39, n.1077-1085, 2001.

MANGER, R. L.; LEJA, L. S.; LEE, S. Y.; HUNGERFORD, J. M.; KIRKPATRICK, M. A.; YASUMOTO, T.; WEKELL, M. M. Detection of paralytic shellfish poison by rapid cell bioassay: antagonism of voltage-gated sodium channel active toxins *in vitro*. **Journal of AOAC International**, v.86, p.540-543, 2003.

MANGER, R. L.; LEJA, L. S.; LEE, S. Y.; HUNGERFORD, J. M.; WEKELL, M. M. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. **Analytical Biochemistry**, v.214, p.190-194, 1993.

MARTINEZ, E. R. M.; PAIVA, L. R. S. Eletforese de ácidos nucléicos: uma prática para o ensino de genética. **Genética na Escola**, v.3, n.1, p. 43-48, 2008.

MATHUR, N. K.; NARANG, K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal Chemical Education**, v.67, p.11, 1990.

MATIAS, W. G. Algas: a problemática das eflorescências de algas marinhas nocivas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.8, p.16-17, 1999.

MATIAS, W. G. **Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique,**

in vivo et in vitro. Bordeaux, 1996. 178p. Thèse (Doctorat em toxicologie appliquée) Université de Bordeaux II – France.

MATIAS, W. G.; CREPPY, E. E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in vero cells. **Environmental Toxicology Water Quality**, v.13, p.83-88, 1998a.

MATIAS, W. G.; CREPPY, E. E. Lipoperoxidação induzida pelo ácido okadaico: uma toxina marinha. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.4, p.40-44, 1998b.

MATIAS, W. G.; TRAORE, A.; BONINI, M.; SANNI, A.; CREPPY, E. E. Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. **Human & Experimental Toxicology**, v.18, p.634-639, 1999.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS, **Rev. Brasileira Biologia**, v.59, n.3, p.361-376, 1999.

MAZIN, A. L. Suicidal function of DNA methylation in age-related genome disintegration. **Ageing Research Reviews**, v.8, p.314-327, 2009.

MELEGARI, S.P., CARVALHO-PINTO SILVA, C.R., MOUKHA, S., CREPPY, E.E., MATIAS, W.G. Lipid peroxidation induction by saxitoxin in neuro-2a cells: the protective effect of vitamins c and e, superoxide dismutase and catalase. **Toxicology** (submetido), 2010.

MELO FILHO, L. C. **Avaliação da ozonização como pré ou pós-tratamento à filtração direta descendente na remoção de cianobactérias e saxitoxinas**. Florianópolis, 2006. 263p. Tese (Doutorado em Eng. Ambiental) – PPGEA-UFSC.

MILLER, B.; ALBERTINI, S.; LOCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research**, v.392, p.45-59, 1997.

MILLER, B.; POTTER-LOCHER, F.; SEELBACH, A.; STOPPER, H.; UTESCH, D.; MADLE, S. Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. **Mutation Research**, v.410, p.81-116, 1998.

MILLER, M. J.; CRITCHLEY, M. M.; HUTSON, J.; FALLOWFIELD, H. J. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. **Water Research**, v.35, p.1461-1468, 2001.

MILLER, M. J.; HUTSON, J.; FALLOWFIELD, H. J. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins as a function of soil properties. **Journal of Water Health**, v.3, n.4, p.339-347, 2005.

MILLERO, F.; HUANG, F.; ZHU, X.; LIU, X.; ZHANG, J. Adsorption and desorption of phosphate on calcite and aragonite in seawater. **Aquatic Geochemistry**, v.7, p.33-56, 2001.

MOLICA, R. J. R.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. V. C.; COSTA, A. P. N. S. F.; CUNHA, M. C. C.; MELO, G. L.; AZEVEDO, S. M. F. O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v.4, p.743-753, 2005.

MØLLER, P.; WALLIN, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. **Mut. Res.**, v.410, p.271-290, 1998.

MONDARDO, R. I. **Avaliação da filtração em margem como pré-tratamento à filtração direta descendente na remoção de células de cianobactérias e saxitoxinas.** Florianópolis, 2009. 308p. Tese (Doutorado em Eng. Ambiental) – PPGEA-UFSC.

MONDARDO, R. I. **Influência da pré-oxidação na tratabilidade das águas via filtração direta descendente em manancial com elevadas concentrações de microalgas e cianobactérias.** Florianópolis, 2004. 147p. Dissertação (Mestrado em Eng. Ambiental) – PPGEA-UFSC.

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.1109-1120, 2007.

NEWELL-PRICE, J.; CLARK, A. J. L.; KING, P. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends in Endocrinology Metabolism**, v.11, p.142-148, 2000.

ODOEMELAM, S. A.; EDDY, N. O. Studies on the use of oyster, snail and periwinkle shells as adsorbents for the removal of Pb^{2+} from aqueous solution. **E-Journal of Chemistry**, v.6, p.213-222, 2009.

OHE, T. Antigenotoxic activities of chitin and chitosan as assayed by sister chromatid exchange. **Science of the Total Environment**, v.181, p.1-5, 1996.

OLIVEIRA, J. S. **Análise sedimentar em zonas costeiras: subsídio ao diagnóstico ambiental da Lagoa do Peri – Ilha de Santa Catarina-SC, Brasil**. Florianópolis, 2002. 154p. Dissertação (Mestrado em Geografia). Programa de Pós-Graduação em Geografia-UFSC.

ONKAL, R.; DJAMGOZ, M. B. A. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. **European Journal of Pharmacology**, v.625, p.206-219, 2009.

ONU. Declaração de Direitos Humanos de 1948, artigo 25.

ORR P. T.; JONES, G. J.; HAMILTON, G. R. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide: implications for compliance with the Australian drinking water guidelines, **Water Res.**, v.38, p.4455-4461, 2004.

OSHIMA, Y.; LUKAS, B.; HUMMERT, C. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Eds.), **Manual on harmful marine microalgae, Intergovernmental oceanographic commission manuals and guides**, Paris, France – UNESCO, p.191-209, 2003.

OUANES, Z.; ABID, S.; AYED, I.; ANANE, R.; MOBIO, T.; CREPPY, E. E.; BACHA, H. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E. **Mutation Research**, v.538, p.63-70, 2003.

PACKHAM, G.; CLEVELAND, J. L. Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, p.5741-5747, 1994.

PERREAULT, F., MATIAS, M.S., MELEGARI, S.P., CARVALHO-PINTO SILVA, C.R, CREPPY, E.E., POPOVIC, R., MATIAS, W.G. Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1021–1026, 2011.

PENZOTTI, J. L.; FOZZARD, H. A.; LIPKIND, G. M.; DUDLEY JR., S. C. Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na⁺ channel outer vestibule. **Biophysical Journal**, v.75, p.2647-2657, 1998.

PEREIRA, P.; ONODERA, H.; ANDRINOLO, D.; FRANCA, S.; ARAÚJO, F.; LAGOS, N.; OSHIMA, Y. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. **Toxicon**, v.38, p.1689-1702, 2000.

PREVARSKAYA, N.; SKRYMA, R.; BIDAUX, G.; FLOURAKIS, M.; SHUBA, Y. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. **Cell. Death Differ.** v.14, p.1295-1304, 2007.

REIN, T.; DEPAMPHILIS, M. L.; ZORBAS, H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. **Nucleic Acids Research**, v.26, p.2255-2264, 1998.

REN, S.; FRYMIER, P. D. Reducing bioassay variability by identifying sources of variation and controlling key parameters in assay protocol. **Chemosphere**, v.57, p.81-90, 2004.

RESSOM, R.; SOONG F. S.; TURCZYNOWICZ, L.; FITZGERALD J. ; SAADI, O. E.; RODER, D.; MAYNARD,T.;

FALCONER, I. **Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae)**. Canberra, Australia: Australian Government Publishing Service, 1994. 108p.

RIEGMAN, R. Species composition of harmful algal blooms in relation to macronutrient dynamics. In Anderson, D. M., Cembella, A. D. & Hallegraeff, G. M. [Eds.] **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Springer, Berlin, p. 475–488, 1998.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 356p.

ROBERTSON, A.; STIRLING, D.; ROBILLOT, C.; LLEWELLYN, L.; NEGRI, A. First report of saxitoxin in octopi. **Toxicon**, v.44, p.765-771, 2004.

ROSA, C. E.; SOUZA, M.S.; YUNES, J. S.; PROENÇA, L. A. O.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT J. M. Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: characteristics and effects on *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae), **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.956-964, 2005.

ROY S.; LADO, B. H.; KHANNA, S.; SEN, C.K. Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis. **FEBS Letters**, v.530, p.17-23, 2002.

RYU, M.; KIM, H.; LIM, M.; YOU K.; AHN, J. Comparison of dissolution and surface reactions between calcite and aragonite in l-glutamic and L-aspartic acid solutions. **Molecules**, v.15, p.258-269, 2010.

SALOZHIN, S. V., PROKHORCHUK, E. B., GEORGIEV, G.P. Methylation of DNA: one of the Major Epigenetic Markers. **Biochemistry** (Moscow), v.70, p.525-532, 2005.

SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERA, B. (Eds) **Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano**. Madri, Espanha. Instituto Español de Oceanografía, 2002. 311p.

SCHWARZENBACH, R. P; GSCHWEND, P.M.; IMBODEN, D.M. **Environmental Organic Chemistry**. 2. ed., USA. p.275-330, 2003.

SELARU, F. M.; DAVID, S.; MELTZER, S. J.; HAMILTON, J.P. Epigenetic events in gastrointestinal cancer. **American Journal of Gastroenterology**, v.104, p.1910-1912, 2009.

SENS, M. L.; MELO FILHO, L. C.; MONDADO, R. I.; PROENÇA, L. A. O. Ozonização: uma alternativa para o tratamento de água com cianobactérias. **Rev. Ciên. Tecnol.**, v.13, p.47-54, 2005.

SILVA, A. S. **Avaliação da capacidade de remoção de saxitoxinas por diferentes tipos de carvão ativado em pó (CAP) produzidos no Brasil**. Brasília, 2005. 115p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – – ENC/FT/UnB, Brasília.

SILVA, C. R.; LEMIESZEK, M. B.; FERREIRA, J. F.; RIBEIRO, R. H. C.; CREPPY, E.; MATIAS, W. G. Genotoxicidade do ácido ocadáico: indução de micronúcleo em mexilhões *Perna perna*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.20, p.56-59, 2001.

SILVA, D. **Resíduo sólido da malacocultura: caracterização e potencialidade de utilização de conchas de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhão (*Perna perna*)**. Florianópolis, 2007. 135p. Dissertação (Mestrado em Eng. Ambiental – PPGEA-UFSC).

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

SILVEIRA, A. A. **Remoção de algas da água da Lagoa do Peri através de filtração direta descendente com pré-filtração mecânica em micropeneiras**. Florianópolis, 2003. 117p. Dissertação (Mestrado em Eng. Ambiental). PPGEA-UFSC.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. *In*: CHORUS, I.; BARTMAN, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, p. 55-124, 1999.

SMART, R. C.; HODGSON, E. (Eds.). **Molecular and biochemical toxicology**. New York: John Wiley, p. 287-318, 2008.

SNYKERS, S.; VINKEN, M.; ROGIERS, V.; VANHAECKE, T. Differential role of epigenetic modulators in malignant and normal stem cells: a novel tool in preclinical *in vitro* toxicology and clinical therapy. **Arch. Toxicol.**, v. 81, 533-544, 2007.

SOLODOVNIK, T. Application of chitin containing sorbents fortreatment of water solutions. *In*: LOUREIRO, J. M.; KARTEL M. T. (Eds.). **Combined and Hybrid Adsorbents**. London: Springer, p.275-280, 2006.

STACEY, G.; VIVIANI, B. Cell Culture Models for Neurotoxicology. *In*: STACEY, G.; DOYLE, A.; FERRO, M. (Eds.). **Cell Culture Methods for *in vitro* Toxicology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 115-130, 2001.

SUNDA W. G. GRANALI E. GOBLE C. J. Positive feedback and the development and persistence of ecosystem disruptive algal blooms. **Journal of Phycology** v.42, p.963–974, 2006.

SZYF, M. DNA methylation and cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v.6, p.341-353, 2003.

TEIVE, L. F., LISBOA L. K., PETRUCIO M. M. Uma revisão da disponibilidade de dados ecológicos visando o direcionamento de novas pesquisas na Lagoa do Peri. *Biotemas*, v.21 (2): p.133-143, 2008.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Brasileira de Botanica**, v. 26, 97-112, 2003.

TUNDISI, J. G. Ciclo Hidrológico e Gerenciamento Integrado, **Gestão das Águas**, p.31-33, 2003.

UPADHYAYULA, V.K.K., DENG, S., MITCHELL, M.C., SMITH, G.B. Application of carbon nanotube technology for

removal of contaminants in drinking water: a review. **Science of the Total Environment**, v.408, 1-13, 2009:

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical and Biologic Interactions**, v.160, 1-40, 2006.

WAN, H.; WILLIAMS, R. L.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F. Cytotoxicity evaluation of Kevlar and silicon carbide by MTT assay. **Journal of Material Science: Materials in Medicine.**, v.5, p.411-415, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Guidelines for drinking-water quality. Health Criteria and other supporting information. 2. ed. Geneva: World Health Organization, p. 13-14, 1998. Addendum to v.2. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq2v1/en/index4.html. Acesso em: 19/04/2008.

YUNES, J. S. Programa AGUAAN: Agilização do gerenciamento e utilização de águas com algas nocivas. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1-2, p.117-119, 2003.

YUNES, J. S.; SALOMON, P. S.; MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; RAGGETT S. L.; CODD G. A. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. **J. Aquatic Ecosystem Health**, v, n.4), p.223-229, 2002.

ZHONG, B.; GU, Z.; WHONG, W.; WALLACE, W. E.; ONG, T. Comparative study of micronucleus assay and chromosomal aberration analysis in V79 cells exposed to ethylene oxide, **Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis**, v.11, p.227-233, 1991.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, v.32, n. 12, e103, 10p. 2004.

CAPÍTULO VIII

8. APÊNDICES

A1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA STX

Método analítico empregado: AOAC, 2005.

As análises foram realizadas por HPLC-FD e as condições de análise já foram descritas na Tabela 3.1. Foram definidos 6 pontos para a construção da curva de calibração e cada ponto foi injetado em triplicata. Os valores das áreas dos picos de injeção estão apresentados na Tabela A1 a seguir. A partir do cálculo das médias das áreas e desvios padrões, foi possível construir a curva de calibração (Figura A1) que foi empregada para a quantificação da STX nos testes de adsorção.

Tabela A1: Dados para a construção da curva de calibração da STX.

[STX] (µg/L)	Área Inj. 1	Área Inj. 2	Área Inj. 3	Média Áreas	Desvio Padrão
1,25	504	346	426	425	79,0
2,5	801	655	725	727	73,0
5,0	2519	2622	2594	2578	53,3
10	9727	6246	7474	7816	1765,5
50	42006	39401	42462	41290	1651,4
100	85048	79568	86437	83684	3631,9

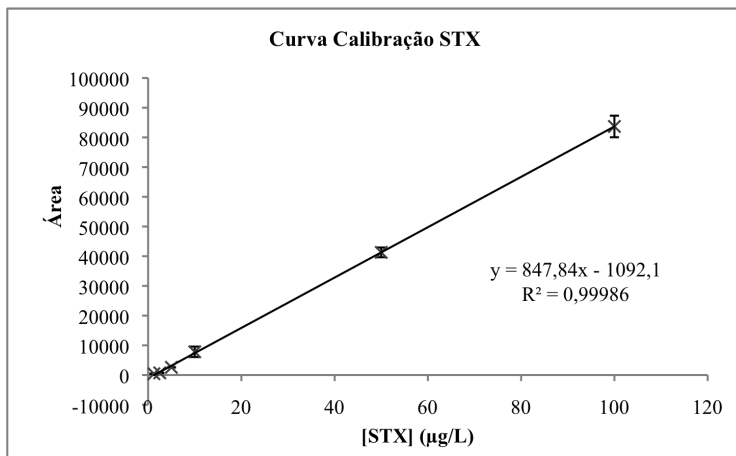


Figura A1: Curva de calibração do método empregado para quantificação da STX nos testes de adsorção.

O limite de quantificação do método aplicado foi definido como sendo o primeiro ponto da curva de calibração, ou seja $1,25\mu\text{g/L}$. Em uma posição conservadora, o limite de detecção do método foi definido como sendo o mesmo valor do limite de quantificação, ou seja $1,25\mu\text{g/L}$. A Figura A2 a seguir mostra o cromatograma de um ponto da curva de calibração da STX.

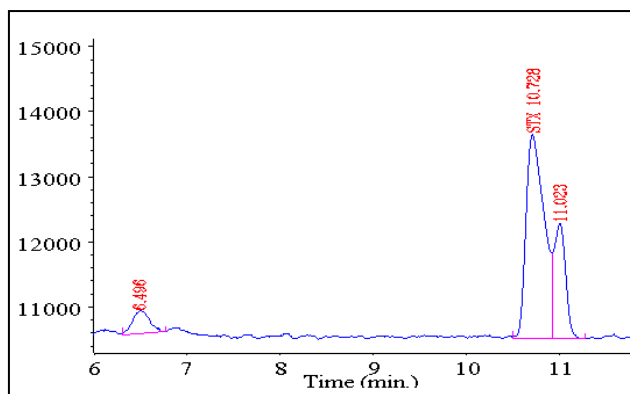


Figura A2: Cromatograma do padrão da STX $50\mu\text{g/L}$.

A2. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CITOSINA E 5-METILCITOSINA

Método analítico empregado: baseado em Kouadio et al. 2007.

As análises foram realizadas por HPLC-UV e as condições de análise já foram anteriormente. Foram definidos 07 pontos para a construção da curva de calibração. Foi empregado uma mistura das bases do DNA citosina (dC), timina (dT), guanina (dG) e adenina (dA), e a base metilada de interesse a 5-metilcitosina (m⁵dC). Os valores das áreas dos picos de injeção estão apresentados na Tabela A2 a seguir. A partir do cálculo das médias das áreas e desvios padrões, foi possível construir a curva de calibração (Figura A3) que foi empregada para a quantificação da citosina e 5-metilcitosina nos ensaios de metilação do DNA.

Tabela A2: Dados para a construção da curva de calibração da citosina e 5-metilcitosina.

Base	Área dos picos							
	t _R (min)	Pontos da curva de calibração (µg/mL)						
		1,00	3,125	6,25	12,5	25	50	100
dC	3,150	39277	122251	221921	414131	810463	1618943	3306425
m ⁵ dC	4,233	21370	70158	127373	241603	473479	950606	1945405
dT	6,416	38622	130437	237316	448425	879381	1763639	3593933
dG	8,366	37866	136040	252152	465695	921234	1888361	3844825
dA	19,33	36255	101584	204276	395710	781258	1599636	3282842

O limite de quantificação do método aplicado foi definido como sendo o primeiro ponto da curva de calibração, ou seja 1,0µg/mL. Em uma posição conservadora, o limite de detecção do método foi definido como sendo o mesmo valor do limite de quantificação, ou seja 1,0µg/mL. A Figura A4 a seguir mostra o cromatograma de um ponto da curva de calibração com a mistura dos padrões.

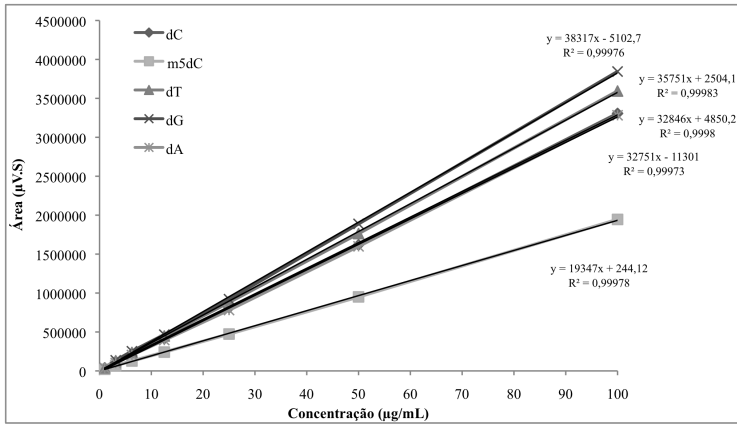


Figura A3: Curva de calibração do método empregado para quantificação da citosina e 5-metilcitosina no ensaio de metilação do DNA.

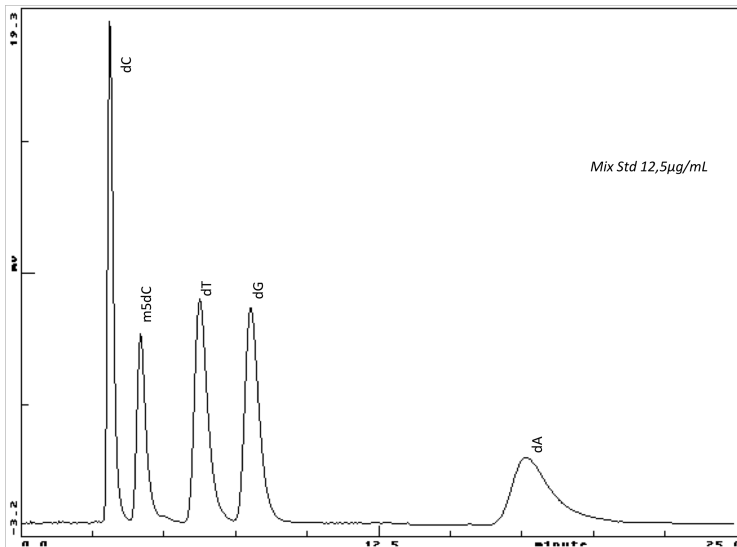


Figura A4: Cromatograma da mistura dos padrões empregados para a quantificação da citosina e 5-metilcitosina (12,5µg/mL).

A3. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MALONDIALDEÍDO

Método analítico empregado: baseado em Ouanes et al. (2003).

As análises foram realizadas por HPLC-FD e as condições de análise já foram anteriormente.. Foram definidos 07 pontos para a construção da curva de calibração no malondialdeído (MDA). Os valores das áreas dos picos de injeção estão apresentados na Tabela A3 a seguir. A partir do cálculo das médias das áreas, foi possível construir a curva de calibração (Figura A5) que foi empregada para a quantificação da citosina e 5-metilcitosina nos ensaios de metilação do DNA.

Tabela A3: Dados para a construção da curva de calibração MDA.

[MDA] (nM)	Área ($\mu\text{V.S}$)
3,8	5749
7,5	15024
15	26237
30	44678
60	119545
120	265894
240	507742

O limite de quantificação do método aplicado foi definido como sendo o primeiro ponto da curva de calibração, ou seja 3,8nM. Em uma posição conservadora, o limite de detecção do método foi definido como sendo o mesmo valor do limite de quantificação, ou seja 3,8nM. A Figura A6 a seguir mostra o cromatograma de um ponto da curva de calibração do padrão do MDA.

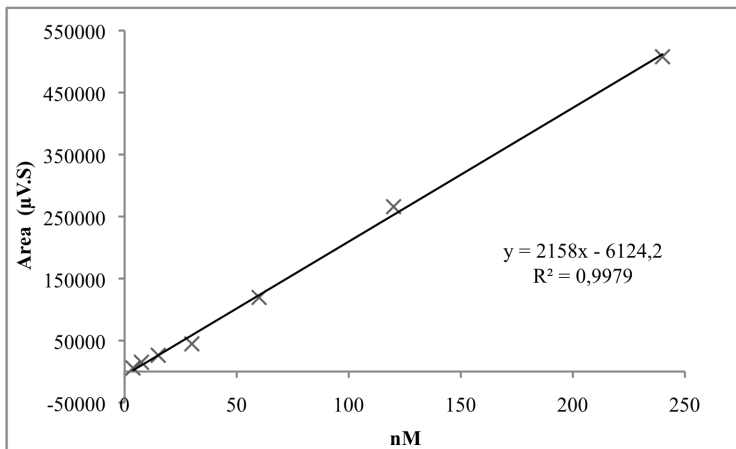


Figura A5: Curva de calibração do método empregado para quantificação do MDA no ensaio de lipoperoxidação.

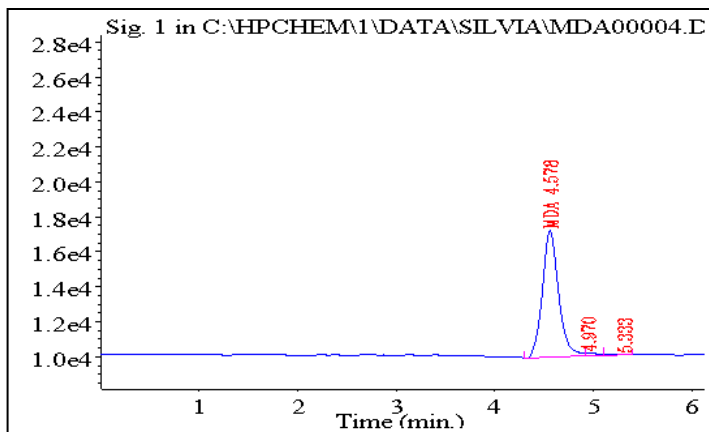


Figura A6: Cromatograma do padrão do MDA(60nM - tR: 4,58 min).

A4. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Método analítico empregado: Bradford, 1976.

As análises foram realizadas por espectrometria de ultravioleta (UV) e as condições de análise foram descritas anteriormente. Foram definidos 07 pontos para a construção da curva de calibração de dosagem da proteína nas células. Como padrão foi empregada a albumina bovina (BSA). Os valores das absorbância no comprimento de onda de 595nm estão apresentados na Tabela A4 a seguir. A partir dos valores de absorbância foi possível construir a curva de calibração (Figura A7) que foi empregada para a quantificação da proteína das amostras celulares noensaio de lipoperoxidação.

Tabela A4: Dados para a construção da curva de calibração BSA.

[BSA] µg/mL	DO 595nm
0,31	0,4817
0,63	0,4597
1,25	0,5339
2,50	0,5995
5,00	0,7405
10,00	1,0544
20,00	1,3898

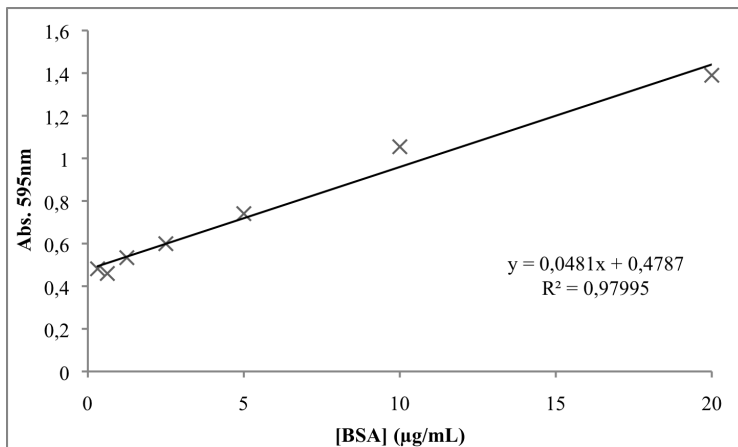


Figura A7: Curva de calibração do método empregado para quantificação da proteína BSA no ensaio de lipoperoxidação.

A5. ESQUEMA DE DILUIÇÃO EM CASCATA DA STX NAS PLACAS DE 96 POÇOS PARA OS ENSAIOS CITOTÓXICOS DO MTT

A Figura A8 a seguir apresenta como foi feito o protocolo de diluição em cascata do ensaio citotóxico. Para os ensaios com as células Vero, não foram realizadas as diluições indicadas no poço verde e laranja, conforme legenda na figura.

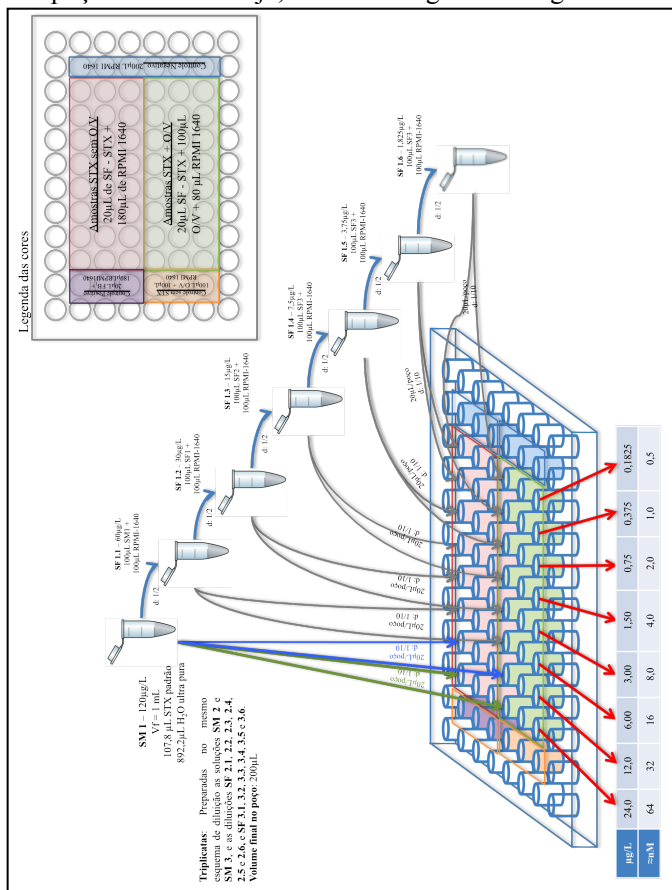


Figura A8: Esquema de diluição em cascata da STX na microplaca de 96 poços para os ensaios citotóxicos do MTT.

A6. ESQUEMA DE DILUIÇÃO EM CASCATA DA STX NAS PLACAS DE 24 POÇOS PARA OS ENSAIOS DO MICRONÚCLEO E LIPOPEROXIDAÇÃO

A Figura A9 a seguir apresenta como foi feito o protocolo de diluição em cascata do ensaio do micronúcleo e lipoperoxidação. Para o ensaio do micronúcleo, foi empregada como controle positivo a colchicina 0,3 μ M.

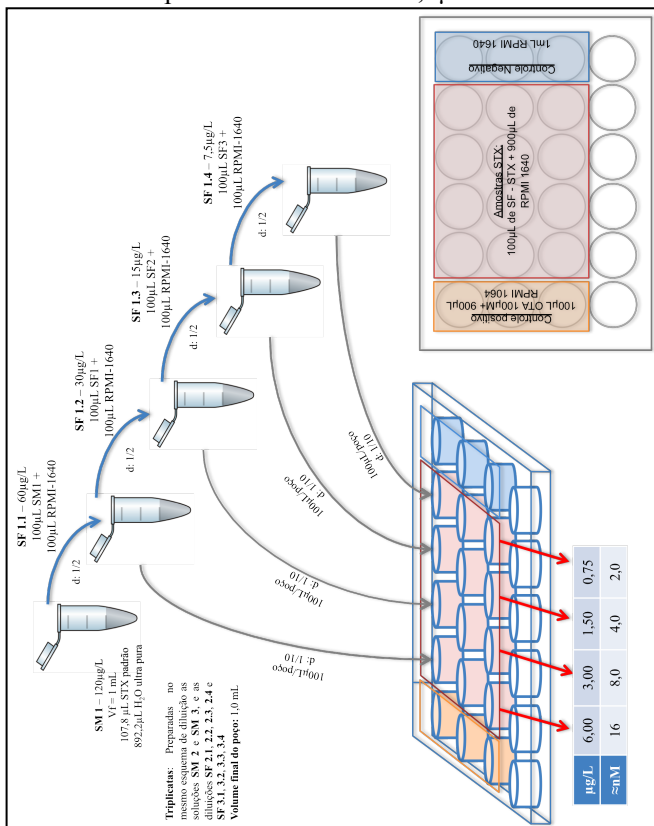


Figura A9: Esquema de diluição em cascata da STX na microplaca de 24 poços para os ensaios de lipoperoxidação e micronúcleo.

A7. ESQUEMA DE DILUIÇÃO EM CASCATA DA STX NAS PLACAS DE 6 POÇOS PARA OS ENSAIOS DE FRAGMENTAÇÃO E METILAÇÃO DO DNA

A Figura A10 a seguir apresenta como foi feito o protocolo de diluição em cascata do ensaio de fragmentação e metilação do DNA.

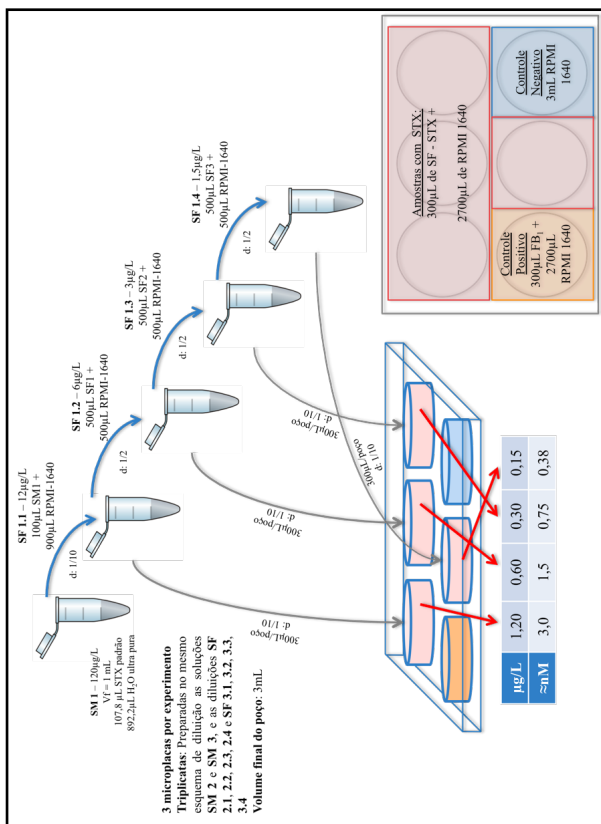


Figura A10: Esquema de diluição em cascata da STX na microplaca de 6 poços para os ensaios de fragmentação e metilação do DNA.

**A8. ARTIGO 1: PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA
*ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY***

**INVESTIGATION OF ANIMAL AND ALGAL BIOASSAYS
FOR RELIABLE SAXITOXIN ECOTOXICITY AND
CYTOTOXICITY RISK EVALUATION**

François Perreault^a, Marcelo Seleme Matias^{a,b}, Silvia Pedroso Melegari^b,
Catia Regina Silva de Carvalho Pinto^b, Edmond Ekué Creppy^c, Radovan
Popovic^a and William Gerson Matias^{a,b}.

a) Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888,
Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8

b) Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Depto. de Engenharia
Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Universitário, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil

c) Department of Toxicology and Applied Hygiene. University of Bordeaux
2, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France

Received 27 July 2010; revised 20 January 2011; accepted 26 January 2011.
Available online 19 February 2011.

Abstract: Contamination of water bodies by saxitoxin can result in various toxic effects in aquatic organisms. Saxitoxin contamination has also been shown to be a threat to human health in several reported cases, even resulting in death. In this study, we evaluated the sensitivity of animal (Neuro-2A) and algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) bioassays to saxitoxin effect. Neuro-2A cells were found to be sensitive to saxitoxin, as shown by a 24 h EC₅₀ value of 1.5 nM, which was obtained using a cell viability assay. Conversely, no saxitoxin effect was found in any of the algal biomarkers evaluated, for the concentration range tested (2–128 nM). These results indicate that saxitoxin may induce toxic effects in animal and human populations at concentrations where phytoplankton communities are not affected. Therefore, when evaluating STX risk of toxicity, algal bioassays do not appear to be reliable indicators and should always be conducted in combination with animal bioassays.

Keywords: Saxitoxin; Bioassay; Ecotoxicity; Cytotoxicity; Neuro-2A; *Chlamydomonas reinhardtii*

Abbreviations: dC, deoxycytosine; FDA, fluorescein diacetate; H₂DCFDA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; m5dC, 5-methyldeoxycytosine; MTT, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; OTA, ochratoxin; PSII, photosystem II; PSP, paralytic shellfish poisoning; ROS, reactive oxygen species; STX, saxitoxin

1. INTRODUCTION

Algal blooms represent a serious threat for aquatic life, affecting ecosystems by change in water dynamics and reduction in dissolved oxygen concentration, as well as the availability of nutrients (Sellner et al., 2003). The frequent occurrence of harmful algal blooms, where toxin-producing algae dominate the ecosystem, is even more concerning because of the risk of water contamination by phycotoxins. Algal toxins have been shown to be toxic to several aquatic organisms (Carvalho Pinto-Silva et al., 2003, Carvalho Pinto-Silva et al., 2005, Ferrao-Filho et al., 2009 and Vasconcelos et al., 2010). Some of these organisms can also accumulate high concentrations of toxins (Pereira et al., 2004), which can then be transferred to man via consumption and lead to serious human intoxication (Matias and Creppy, 1996 and Zaccaroni and Scaravelli, 2008). One toxin that is regularly associated with serious cases of human poisoning is saxitoxin (STX), which is present in aquatic food products such as mussels, fish and snails (Lehane, 2001). STX is a neurotoxic toxin classified as part of the paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. Its chemical structure has previously been determined as (3aS-(3a- α ,4- α ,10aR))-2,6-diamino-4-(((amino-carbonyl)oxy)methyl)-3a,4,8,9 tetrahydro-1H,10H-pyrrolo(1,2-c) purine-10,10-diol (Schantz et al., 1975). STX is known to be very toxic to animals (LD50 in mouse of 260 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ oral) because of its capacity to block sodium channels in muscles and nerve axons, causing a loss of sensation and potentially leading to paralysis (Falconer, 2008). This toxin can be synthesized by different species of

cyanobacteria (e.g., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya sp.* and *Anabaena sp.*) and dinoflagellate (e.g., *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum*) (Wiegand and Pflugmacher, 2005 and Ferrao-Filho et al., 2009).

The ecotoxicological risk of STX is high; it was found to induce toxicity in fish, mussels, copepods, mammals and birds (Landsberg, 2002). Contamination of water bodies by STX can induce toxic effects through water consumption, and cases of livestock intoxication by PSP-producing cyanobacteria have been reported in the literature (Negri et al., 1995). Since STX can be transferred through the trophic chain, it also represents a risk to human consumers (Pereira et al., 2004). In one reported case, post-mortem analysis of tissues and body fluids from two fishermen who died after consuming bivalves in the Patagonia Chilean fjords revealed the presence of PSP toxins (García et al., 2004). These facts demonstrate the importance of a reliable evaluation of STX toxicological and ecotoxicological risk.

Toxicity bioassays can be done on a variety of organisms, usually selected for their eco-relevance and sensitivity. For biotoxins, in vitro toxicity evaluation has been proposed as an easier, faster and more economic alternative to the traditional mouse bioassay (Jellett et al., 1995). Several cell-based assays are routinely used to study the activity of toxins, which can affect cellular homeostasis and lead to several observable effects usable as biomarkers of toxicity. For example, cellular mortality (Cañete and Diogène, 2008), mitochondrial activity (Cotran et al., 2000) and deoxyribonucleic acid (DNA) methylation rate (Matias and Creppy, 1998) have been used as biomarkers to study the toxicity of bioactive compounds. Such parameters are good indicators of toxic effects of toxins in animals. On the other hand, toxicity bioassays based on unicellular algae are known to be both reliable and practical for evaluating ecotoxicological risks. In algae, different biomarkers may be used as endpoints of a pollutant's toxicity: cell division (Moreira-Santos et al., 2004), reactive oxygen species (ROS) production (Jamers et al., 2009), antioxidant enzymes activity

(Sabatini et al., 2009) and photosynthetic activity (Popovic et al., 2003 and Juneau et al., 2007). However, the possible effects of STX on algal physiology have not yet been investigated. For other types of phycotoxins, various toxic effects were found in algae. For example, in cyanobacteria, microcystin-LR was found to induce cell lysis, inhibition of cell growth and alteration of photosynthetic processes (Singh et al., 2001). Fischerellin, produced by the cyanobacteria *Fischerella muscicola*, was also found to alter photosynthetic activity through its inhibitory effects on Photosystem II (PSII) activity (Srivastava et al., 1998). Therefore, as these examples demonstrated, microalgae may serve as models for phycotoxin ecotoxicity bioassays. Their sensitivity towards STX effect must be evaluated in order to determine their applicability for STX and PSP toxins contamination.

In this study, we evaluated the sensitivity of animal and algal cell-based bioassays towards STX effect. We investigated two different sets of biomarkers: on an animal cell culture (Neuro-2A) and an algal cell culture (*Chlamydomonas reinhardtii*), to determine their capacity to evaluate STX risk of toxicity. The sensitivity of the two cell cultures was determined using cell viability assays. Furthermore, specific effects of STX were evaluated, in the animal cells, by using the change of DNA methylation rate and, in the algal cells, the change of PSII activity and the formation of ROS.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell culture

The Neuro-2A mouse neuroblastoma cells were obtained from the National Museum of Nature, Paris, France (European Collection of Cell Cultures cat. no. 89121404; Porton Down, UK). Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycin, and 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ penicillin (all reagents were obtained from Sigma-Aldrich, Lyon, France). The culture was maintained at 37 °C in a humidified air:CO₂ (95:5)

atmosphere (Humpage et al., 2007). The green alga *C. reinhardtii* (wild type CC-125) was obtained from the Chlamydomonas Genetic Center (Duke University, Durham, NC, USA). Cells were cultivated in batch culture of 1L high salt growth medium (Harris, 1989) under continuous illumination ($100 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W; Osram Sylvania Ltd., Mississauga, ON, Canada). The culture was permanently aerated to obtain a constant CO_2 concentration in the medium and temperature in the growth chamber was kept at $23\pm 1^\circ\text{C}$. Algal cultures in the exponential phase of growth (1.5×10^6 cells. ml^{-1}) were used for treatments. Algal culture cell density was determined using a Multisizer Z3 (Beckman Colter Inc., Fullerton, CA, USA).

2.2. STX treatment

STX (NRC CRM-STX-e) was obtained from the Institute for Marine Biosciences (National Research Center, Halifax, NS, Canada). Neuro-2A cells were exposed to STX concentrations of 0.5–64 nM while *C. reinhardtii* cells were exposed to concentrations from 2 to 128 nM. Stock solutions of STX (10x concentrated) were prepared in the appropriate culture media for each cell type (see Section 2.1 for details). In all treatments, a negative control (without STX) and a positive control (without STX but with a chemical known to induce a change in the biomarker evaluated, see specific sections below for details) were also used. Neuro-2A cells were exposed during 24 h to STX, while algal cells were exposed for 24–96 h, in the same conditions as described in Section 2.1.

2.3. Neuro-2A bioassays

Cell viability was determined for Neuro-2A cells using the mitochondrial activity assay with [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT). The cells (105 cells ml^{-1}) were seeded in 96-well microplates with 5% CO_2 at 37°C for 24 h. The medium was then removed and the cells were exposed to different concentrations of STX (0.5–64 nM). After 24 h of STX treatment, the media was discarded, 200 μl of MTT

solution (0.5 mg.ml^{-1} prepared in RPMI-1640) was added and cells were then re-incubated for 2 h. After incubation, the MTT solution was discarded and $200 \mu\text{l}$ of dimethyl sulfoxide was added to dissolve the formazan crystals formed by MTT reduction inside the cell. The absorbance at 560 nm for each well was measured in the plate using a microplate reader (DYNATECH MR 4000; Dynatech Industries, Sours, France). For this assay, the positive control was ochratoxin A (OTA, $15 \mu\text{M}$) (Creppy et al., 2004). The half maximal effective concentration (EC50) was derived from the averaged MTT results using a 4-parameter sigmoidal fit (Hill-Slope model), with all MTT data normalized between positive and negative controls. Cell viability results are shown graphically as a percent of the control value, according to Humpage et al. (2007).

Cytotoxic effects of phycotoxins induce changes in cellular processes, which may alter the rate of DNA methylation by the cell. The percentage of 5-methyldeoxycytosine vs. total deoxycytosine+5-methyldeoxycytosine (m5dC vs. dC+m5dC) can therefore be used as an epigenetic indicator of a pollutant's effect in toxicity bioassays (Matias and Creppy, 1998). For DNA methylation rate evaluation, Neuro-2A cells ($1.5 \times 10^5 \text{ cells.ml}^{-1}$) were seeded in 6-well microplates and treated with 0.38, 0.75, 1.5 and 3.0 nM of STX in RPMI medium for 24 h at 37°C . For this assay, the positive control was OTA (Creppy et al., 2004). After 24 h of treatment, DNA was isolated using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières, France). The medium was removed and cells were harvested in 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) solution (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The suspension from each well was centrifuged at $16000 \times g$ for 10 s to pellet the cells; the supernatant was discarded and $600 \mu\text{l}$ of nuclei lysis solution and 3 ml RNase solution were added to each tube, followed by a 30 min incubation at 37°C . Then, at room temperature, $200 \mu\text{l}$ of protein precipitation solution was added and the tubes were inverted 4–5 times to homogenize the mixture. Samples were chilled on ice for 5 min and centrifuged at $16000 \times g$ for 4 min. The supernatant containing the DNA was removed and DNA was precipitated with $600 \mu\text{l}$ of

isopropanol and centrifuged for 1 min at 16000×g at room temperature. The isopropanol was then discarded and 600 µl of 70% ethanol in water was added to the pellet. Next, the tubes were gently inverted several times to wash the DNA and then centrifuged for 1 min at 16 000×g at room temperature. The supernatant was discarded and samples were left to dry under the laminar flow hood. Finally, the dry DNA was re-dissolved in 100 µl of DNA rehydration solution and conserved at -20 °C until use. Total DNA was quantified using the 260/280 nm absorbance ratio (Kouadio et al., 2007, with some modifications). For the measurement of m5dC, 10 µg of purified DNA was diluted with 10 µl of Milli-Q water and incubated at 100°C for 2 min. After which, 1 µl of 250 mM potassium acetate buffer (pH5.4), 1 µl of 10 mM zinc sulfate and 10 µl of 0.5 U ml⁻¹ nuclease P1 (Sigma-Aldrich, Lyon, France) were added and incubated overnight at 37 °C. After incubation, the samples were treated with 2 µl 0.5 M Tris-HCl (pH8.3) plus 2 µl of the buffer containing 0.31 U ml⁻¹ alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Lyon, France). This mixture was incubated at 37 °C for 2 h. DNA base composition was determined using an ICS-chromatograph system (Instrumentation Consumable Service, Toulouse, France) equipped with a UV Spectra Focus 3-D, at room temperature using a phenylnucleosyl column (250×3.4 mm). Elution was done with 6.5 mM H₂PO₄(NH₄) pH3.95 and 4% (v/v) methanol at a flow rate of 1 ml min⁻¹ and eluates were monitored at 254 nm. Samples were diluted 1:4 and the injection volume was 20 µl. Standard DNA bases (dC, dT, dG, dA) (100 µg.ml⁻¹ each) and m5dC (10 µg.ml⁻¹) were used for quantification. The surface under the curve was determined with the Pic3 software (Instrumentation Consumable Service, Toulouse, France) and used to quantify the base. The DNA base concentrations in mg l⁻¹ were used to calculate the rate in % of m5dC as compared to [m5dC+dC]×100 (Kouadio et al., 2007).

2.4. *C. reinhardtii* bioassays

Cell viability was determined by measuring esterases activity with the fluorescein diacetate (FDA) fluorescent probe

(Invitrogen Molecular Probe, Eugene, USA) according to Stauber et al. (2002). FDA stock solution (10 mM) was prepared in methanol in the dark. Algal cultures (20 ml, 5×10^8 cells.ml⁻¹) were exposed to a STX final concentration range of 2–128 nM. After each 24 h of treatment, 1 ml samples were collected and treated for 30 min with 0.2 mM FDA in the dark. FDA, as a non-polar molecule, diffuses passively into the cell where it is transformed into the fluorescent compound fluorescein and accumulates inside the cell. Fluorescein fluorescence was measured at 530 nm by flow cytometry (FACScan; Becton Dickinson Instruments, Mississauga, ON, Canada). Cytometry results were analyzed with the WinMDI 2.8 software. To discriminate between algal cells and noncellular particles, all measured events were separated using a relationship between particle size and red fluorescence level, originating from chlorophyll fluorescence reemission, as in Perreault et al. (2010). For this measurement, 10 mM copper (added as CuSO₄) was used as a positive control known to induce a decrease of esterases activity (Yu et al., 2007).

The intracellular ROS level was measured with the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Invitrogen Molecular Probe, Eugene, USA) according to Knauert and Knauer (2006). H₂DCFDA stock solution (10 mM) was prepared in ethanol in the dark. H₂DCFDA is a non-polar compound and diffuses into algal cells, where it is transformed by esterases into its polar, nonfluorescent form, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein. When oxidative stress is induced within the cell, this compound reacts with H₂O₂ to produce the green fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein with a maximum fluorescence emission between 517 and 530 nm. Samples of STX-treated cultures were taken and exposed to H₂DCFDA in the same way as described for FDA. Intracellular ROS level was determined by measuring the fluorescence emission at 530 nm by flow cytometry as described for FDA measurements. For this assay, the herbicide methylviologen (0.5 mM), known to induce oxidative stress in algae (Ledford et al., 2007), was used as a positive control.

PSII activity was evaluated by measuring chlorophyll a fluorescence according to Strasser et al. (2004). Algal cultures (20 ml, 5×10^5 cells.ml⁻¹) were exposed to a STX final concentration range of 2–128 nM. After 96 h of exposure, 1 ml samples were taken for chlorophyll a fluorescence measurements. Samples were diluted to 2.5×10^5 cells .ml⁻¹ and dark-adapted for 30 min before measurement. Rapid, polyphasic rise of chlorophyll a fluorescence was measured with a Plant Efficiency Analyzer fluorometer (Handy-PEA, Hansatech Ltd, King's Lynn, UK), equipped with a HPEA/LPA2 liquid-phase sensor. Rapid chlorophyll a fluorescence rise was obtained by using a 6 s saturating light ($3500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). According to Strasser et al. (2004), the fluorescence intensity at 50 μs was considered to be the F_0 value, noted as $F_{50 \mu\text{s}}$, the variable fluorescence intensities for J and I transients were determined at 2 ms ($F_{2 \text{ ms}}$) and 30 ms ($F_{30 \text{ ms}}$), respectively, and maximum fluorescence intensity P was considered as the maximal value of fluorescence yield (FM). In this assay, potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) was used as a positive control known to induce a decrease of PSII quantum yield in *C. reinhardtii* (Perreault et al., 2009).

2.5. Statistical analysis

The experiments were done using a minimum of three replicates for all conditions and repeated three times. Means and standard deviations were estimated for each treatment. The results are presented as mean \pm standard deviation and significant differences between two samples were accepted for $p < 0.05$ using the random permutation test.

3. RESULTS

3.1. STX effect on Neuro-2A cells

STX cytotoxicity was evaluated in Neuro-2A cells using integrative (cell viability) and specific (genotoxicity) toxicity biomarkers. Using the mitochondrial activity MTT assay to determine cell viability, STX was found to induce a strong cytotoxic effect in Neuro-2A cells after only 24 h of treatment.

Cell viability was already decreased by $40\pm 1.2\%$ at 1 nM of STX, while for the highest concentration (64 nM) cell viability was decreased by $80\pm 18.9\%$ ($p < 0.05$) (Fig. 1). From these results, an EC₅₀ of 1.5 nM was determined for STX in Neuro-2A cells. The sensitivity of the MTT assay was compared with the DNA methylation rate, an epigenetic bioindicator of cytotoxicity. For this experiment, three different concentrations were used to compare with the MTT assay: the EC₅₀ concentration (1.50 nM), half this concentration (0.75 nM) and twice the EC₅₀ concentration (3 nM). When Neuro-2A cells were exposed to STX for 24 h, the percentage of m5dC changed from $0.59\pm 0.02\%$ (negative, untreated control sample) to $1.43\pm 0.14\%$, $1.14\pm 0.29\%$ and $4.43\pm 1.41\%$, for 0.75, 1.50 and 3.00 nM, respectively ($p < 0.05$). In comparison, the positive control with OTA increased the percentage of m5dC from $0.59\pm 0.02\%$ to $3.00\pm 0.69\%$ ($p < 0.05$) (Fig. 2). When compared to the negative control, STX treatments increased the percentage of m5dC by 137%, 86% and 650%, for 0.75, 1.50 and 3.00 nM of STX, respectively.

3.2. STX effect on *C. reinhardtii* cells

STX ecotoxicity risk was evaluated using different toxicity biomarkers in *C. reinhardtii*. Two integrative biomarkers were used to determine the overall toxic effects of STX in *C. reinhardtii* cells, cell division rate and cell viability. Cell division, measured as culture cell density, was not significantly altered when algal cells were exposed to STX, even after 96 h of treatment with 128 nM of STX ($p > 0.05$) (Fig. 3). Neither was the yield of FDA fluorescence, indicating cell viability, affected by STX treatment ($p > 0.05$) (Fig. 4). Therefore, after 96 h of treatment to 128 nM STX, algal cells remained viable and cell division was kept at a normal rate. STX effect was additionally evaluated by specific biomarkers of toxicity, which can sometimes be more sensitive to pollutants than integrative parameters such as cell division or viability (Geoffroy et al., 2004). We evaluated STX effect on ROS production in *C. reinhardtii* cells using H₂DCFDA fluorescence, which is specific to H₂O₂ production. When *C. reinhardtii* was exposed to STX

(from 2 to 128 nM), ROS level was not increased when compared to the negative control ($p > 0.05$). In comparison, the positive control with methylviologen induced a strong (100–200 times higher) increase of intracellular ROS level ($p < 0.05$) (Fig. 5). In addition, STX effect on photosynthetic processes was investigated by the OJIP rapid chlorophyll a fluorescence rise as an indicator of PSII primary photochemical processes. After 96 h of treatment, PSII activity was not altered by STX treatment when compared to the negative control, while the positive control (dichromate) induced a decrease of PSII capacity for electron transport, shown by the lower chlorophyll a fluorescence level at the P transient (Fig. 6).

4. DISCUSSION

Different cellular systems show great differences in their response towards pollutants. These differences are dependent on the mode of action of the pollutant and the specific particularities of the biological model considered. When selecting an appropriate model for toxicity evaluation, these differences must therefore be considered in order to obtain reliable information. It is known that STX alters ion transfer in voltage-dependent sodium channels, either by binding to a single high-affinity site or several high and low affinity sites, depending on the cellular system studied (Doyle et al., 1985, Wada et al., 1987 and Llewellyn, 2009). For this reason, cells that contain a large number of voltage-dependent sodium channels can be expected to be highly sensitive to STX effect. In our report, we showed that nanomolar concentrations of STX induced important cytotoxic effects in Neuro-2A cells. This sensitivity is in the same range (nanomolar) as previously observed for STX in Neuro-2A cells (Jellett et al., 1995 and Fairey and Ramsdell, 1999) although it must be mentioned that, in the absence of ouabaine and veratridine (as is the case in our study), Cañete and Diogene observed no effect of STX on Neuro-2A cells at a concentration of 58.41 nM for the same exposure time (Cañete and Diogène, 2008). This discrepancy cannot be explained at this time with the current results and should be further investigated in future works.

Nevertheless, Neuro-2A cells were found to be a very sensitive model for STX cytotoxicity risk evaluation.

The MTT assay is the most commonly used assay to evaluate the toxicity of phycotoxins in in vitro conditions, mainly because of its simplicity and applicability to a microplate system (Humpage et al., 2010). However, specific biomarkers of toxicity are often more sensitive than general toxicity biomarkers. Here, the sensitivity of the MTT assay was compared with an epigenetic marker of toxicity, DNA methylation rate. Change of the m5dC vs. dC+m5dC ratio was found to be associated with tumor formation by mutagenesis, activation of proto-oncogene or inactivation of tumor suppression genes (Marshall, 1991 and Gonzalzo and Jones, 1997). Using this biomarker, we found that epigenetic changes were more sensitive than the MTT assay at very low STX concentrations (0.75 nM). DNA methylation rate may therefore be used as an alternative, more sensitive biomarker for STX toxicity risk evaluation. In addition, DNA methylation may also serve as an indicator of STX risk of cancerogenicity, as was proposed earlier for okadaic acid (Matias and Creppy, 1998).

In algae, different types of voltage-dependent ion channels are also known (Wheeler and Brownlee, 2008 and Taylor, 2009). However, sodium channels in those cells were found to be very different from animal-type channels (Taylor 2009). This indicates that STX interaction with algal cells may be very different than with animal cells. Accordingly, we found that *C. reinhardtii* cells are very resistant towards STX effect. Our results show that STX did not induce any toxic effects even at a concentration 85 times higher than the EC₅₀ for Neuro-2A cells (128 nM) or for a longer exposure time (96 h). STX effect was also evaluated using two specific biomarkers of toxicity: oxidative stress and photosynthetic activity, which are often more sensitive than general biomarkers at evaluating the pollutants' effects (Geoffroy et al., 2004). Here, however, these biomarkers did not show any effect of STX on *C. reinhardtii* cells either. This low toxicity of STX is probably due to the differences in the usual binding sites of STX, the voltage-dependent sodium channel between animal and algal cells (Taylor 2009). Our results

confirm the conclusions of recent studies, where no relationship could be observed between the PSP toxins content of *A. tamarensis* and its allelopathic potential towards *Rhodomonas salina* (Tillman et al., 2009). However, the possible effects of STX on algal physiological processes had not been evaluated up to now. Using different biomarkers of toxicity in this study, we showed that algal bioassays are not reliable in cases of STX contamination at concentrations where STX toxicity towards animal cells was very high. Therefore, in the evaluation of STX risk of toxicity in natural waters, algal bioassays should always be performed in combination with animal bioassays, such as the Neuro-2A assay or in combination with other aquatic ecotoxicity models such as the daphnia assay (Ferraio-Filho et al., 2010).

5. CONCLUSIONS

In this report, we evaluated the sensitivity of two different cell-based bioassays for reliable STX toxicity risk assessment. Our results showed that the Neuro-2A mouse neuroblastoma cell was very sensitive to STX cytotoxic effect. Using the MTT assay, a 24 h EC50 value of 1.5 nM was determined in this cell type. In addition, DNA methylation rate appeared to be a more sensitive biomarker of STX toxicity than cell viability for the evaluation of low concentrations of STX. On the other hand, *C. reinhardtii* cells did not show any STX effect for all the biomarkers evaluated in the concentration range tested (2–128 nM). These results indicate that, for concentrations ranging from 0.3 to 128 nM, STX may be present in aquatic ecosystems at levels that do not induce toxic effects on phytoplankton but which can still be harmful to animal and human populations. Therefore, when evaluating the risk of toxicity of water samples, algal based bioassays do not appear reliable in cases of STX contamination and should be done in combination with animal-based bioassays.

Acknowledgments: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada) grants awarded to W.G. Matias and R.

Popovic, respectively. F. Perreault was supported by a NSERC PhD fellowship. S.P. Melegari is thankful for her fellowship in the Laboratory of Toxicology, University of Bordeaux 2 (France).

REFERENCES

- Cañete and Diogène, 2008 E. Cañete and J. Diogène, Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2A) and neuroblastoma X glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins, *Toxicol* 52 (2008), pp. 541–550.
- Carvalho Pinto-Silva et al., 2003 C.R. Carvalho Pinto-Silva, P.F. Belli, E.E. Creppy, R.H.R. Costa, J. Ferreira and W.G. Matias, Micronucleus induction in mussels exposed to Okadaic acid, *Toxicol* 41 (2003), pp. 93–97.
- Carvalho Pinto-Silva et al., 2005 C.R. Carvalho Pinto-Silva, E.E. Creppy and W.G. Matias, Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*, *Arch. Toxicol.* 79 (2005), pp. 422–426.
- Cotran et al., 2000 R.S. Cotran, V. Kumar and T. Collins, Adaptações, lesão e morte celular. In: S.R. Robbins, Editor, *Patologia Estrutural e Funcional* (6 ed.), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (2000).
- Creppy et al., 2004 E.E. Creppy, P. Chiarappa, I. Baudrimont, P. Borracci, S. Moukha and M.R. Carratù, Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?, *Toxicology* 201 (2004), pp. 115–123.
- Doyle et al., 1985 D.D. Doyle, D.M. Brill, J.A. Wasserstrom, T. Karrison and E. Page, Saxitoxin binding and “fast” sodium channel inhibition in sheep heart plasma membrane, *Am. J. Physiol.* 249 (1985), pp. 328–336.
- Fairey and Ramsdell, 1999 E.R. Fairey and J.S. Ramsdell, Reporter gene assays for algal-derived toxins, *Nat. Toxins* 7 (1999), pp. 415–421.
- Falconer, 2008 I.R. Falconer, Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. In: H.K. Hudnell, Editor, *Advances in Experimental Medicine and Biology: Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs.*, Springer, New-York (2008), pp. 607–612.
- Ferrao-Filho et al., 2009 A.D.S. Ferrao-Filho, M.C.S. Soares, V.D.F. Magalhaes and S.M.F.O. Azevedo, Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72 (2009), pp. 479–489.
- Ferrao-Filho et al., 2010 A.D.S. Ferrao-Filho, M.C.S. Soares, V.D.F. Magalhaes and S.M.F.O. Azevedo, A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test, *Environ. Pollut.* 158 (2010), pp. 2084–2093.

García et al., 2004 C. García, M.C. Bravo, M. Lagos and N. Lagos, Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords, *Toxicol* 43 (2004), pp. 149–158.

Geoffroy et al., 2004 L. Geoffroy, F. Frankart and P. Eullaffroy, Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin, *Environ. Pollut.* 131 (2004), pp. 233–241.

Gonzalzo and Jones, 1997 M.L. Gonzalzo and P.A. Jones, Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation, *Mutat. Res.* 386 (1997), pp. 107–118.

Harris, 1989 E.H. Harris, *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Academic Press, San Diego, CA (1989).

Humpage et al., 2007 A.R. Humpage, A. Ledreux, S. Fanok, C. Bernard, J.F. Briand, G. Eaglesham, J. Papageorgiou, B. Nicholson and D. Steffensen, Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007), pp. 1512–1519.

Humpage et al., 2010 A.R. Humpage, V.F. Magalhaes and S.M. Froscio, Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010), pp. 1655–1671.

Jamers et al., 2009 A. Jamers, M. Lenjou, P. Deraedt, D. Van Bockstaele, R. Blust and W. de Coen, Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae), *Eur. J. Phycol.* 44 (2009), pp. 541–550.

Jellett et al., 1995 J.F. Jellett, J.E. Stewart and M.V. Laycock, Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay, *Toxicol. In Vitro* 9 (1995), pp. 57–65.

Juneau et al., 2007 P. Juneau, B. Qiu and C.P. Deblois, Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: review, *Toxicol. Environ. Chem.* 89 (2007), pp. 609–625.

Knauert and Knauer, 2006 S. Knauert and K. Knauer, The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae, *J. Phycol.* 44 (2006), pp. 311–319.

Kouadio et al., 2007 J.H. Kouadio, S.D. Danob, S. Moukha, T.A. Mobio and E.E. Creppy, Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells, *Toxicol* 49 (2007), pp. 306–317.

Landsberg, 2002 J.H. Landsberg, The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms, *Rev. Fish. Sci.* 10 (2002), pp. 113–390.

Ledford et al., 2007 H.K. Ledford, B.L. Chin and K.K. Niyogi, Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell* 6 (2007), pp. 919–930.

Lehane, 2001 L. Lehane, Paralytic shellfish poisoning: a potential public health problem, *Med. J. Aust.* 175 (2001), pp. 29–31.

Llewellyn, 2009 L.E. Llewellyn, Sodium channel inhibiting marine toxins. In: F. Nobuhiro and K. William, Editors, *Marine Toxins as Research Tools, Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Springer, Berlin Heidelberg (2009), pp. 67–97 vol. 46.

Marshall, 1991 C.J. Marshall, Tumour suppressor genes, *Cell* 64 (1991), pp. 313–326.

Matias and Creppy, 1996 W.G. Matias and E.E. Creppy, Transplacental passage of [3H]-okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and high-performance liquid chromatography, *Hum. Exp. Toxicol.* 15 (1996), pp. 226–230.

Matias and Creppy, 1998 W.G. Matias and E.E. Creppy, 5-methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in vero cells, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 4 (1998), pp. 83–88. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (10)

Moreira-Santos et al., 2004 M. Moreira-Santos, A.M.V.M. Soares and R. Ribeiro, A phytoplankton growth assay for routine in situ environmental assessments, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004), pp. 1549–1560.

Negri et al., 1995 A.P. Negri, G.J. Jones and M. Hindmarsh, Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*, *Toxicon* 33 (1995), pp. 1321–1329.

Pereira et al., 2004 P. Pereira, E. Dias, S. Franca, E. Pereira, M. Carolino and V. Vasconcelos, Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*, *Aquat. Toxicol.* 68 (2004), pp. 339–350.

Perreault et al., 2009 F. Perreault, N. Ait Ali, C. Saison, R. Popovic and P. Juneau, Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Photochem. Photobiol. B* 96 (2009), pp. 24–29.

Perreault et al., 2010 F. Perreault, D. Dewez, C. Fortin, P. Juneau, A. Diallo and R. Popovic, Aluminum's effect on cellular division and photosynthetic electron transport in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas acidophila*, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010), pp. 887–892.

Popovic et al., 2003 R. Popovic, D. Dewez and P. Juneau, Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: heavy metals, herbicides, and air pollutants. In: P. Toivonen and J. DeEll, Editors, *Practical Applications*

of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology, Kluwer Academic Publisher (2003), pp. 152–179.

Sabatini et al., 2009 S.E. Sabatini, A.B. Juárez, M.R. Eppis, L. Bianchi, C.M. Luquet and M.D.C. Rios de Molina, Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72 (2009), pp. 1200–1206.

Schantz et al., 1975 E.J. Schantz, V.E. Ghazarossian, H.K. Schnoes, F.M. Strong, J.P. Springer, J.O. Pezzanite and J. Clardy, Letter: the structure of saxitoxin, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975), pp. 1238–1239.

Sellner et al., 2003 K.G. Sellner, G.J. Doucette and G.J. Kirkpatrick, Harmful algal blooms: causes, impacts and detection, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2003), pp. 383–406.

Singh et al., 2001 D.P. Singh, M.B. Tyagi, A. Kumar, J.K. Thakur and A. Kumar, Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2001), pp. 15–22.

Srivastava et al., 1998 A. Srivastava, F. Juttner and R.J. Strasser, Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1364 (1998), pp. 326–336.

Stauber et al., 2002 J.L. Stauber, N.M. Franklin and M.S. Adams, Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae, *Trends Biotechnol.* 20 (2002), pp. 141–143.

Strasser et al., 2004 R.J. Strasser, A. Srivastava and M. Tsimilli-Michael, Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: G. Papageorgiou and Govindjee, Editors, *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (2004), pp. 321–362.

Taylor, 2009 A.R. Taylor, A fast Na⁺/Ca²⁺-based action potential in a marine diatom, *PLoS ONE* 4 (2009), p. e4966.

Tillmann et al., 2009 U. Tillmann, T.L. Alpermann, R.C. Purificacao, B. Krock and A. Cembella, Intra-population clonal variability in allelochemical potency of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, *Harmful Algae* 8 (2009), pp. 759–769.

Vasconcelos et al., 2010 V. Vasconcelos, J. Azevedo, M. Silva and V. Ramos, Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms, *Mar. Drugs* 8 (2010), pp. 59–79.

Wada et al., 1987 A. Wada, M. Arita, H. Kobayashi and F. Izumia, Binding of [³H]saxitoxin to the voltage-dependent Na channels and inhibition of ²²Na influx in bovine adrenal medullary cells, *Neurosciences* 23 (1987), pp. 327–331.

Wiegand and Pflugmacher, 2005 C. Wiegand and S. Pflugmacher, Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204 (2005), pp. 201–218.

Wheeler and Brownlee, 2008 G.L. Wheeler and C. Brownlee, Ca²⁺ signalling in plants and green algae-changing channels, *Trends Plant Sci.* 13 (2008), pp. 509–514.

Yu et al., 2007 Y. Yu, F. Kong, M. Wang, L. Qian and X. Shi, Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 66 (2007), pp. 29–50.

Zaccaroni and Scaravelli, 2008 A. Zaccaroni and D. Scaravelli, Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. In: V. Evangelista, L. Barsanti, A.M. Frassanito, P. Passarelli and P. Gualtieri, Editors, *NATO Security through Science Series C: Environmental Security: Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*, Springer, Netherlands (2008), pp. 91–158.

Corresponding author. Fax: +55 48 37219823.

Copyright © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

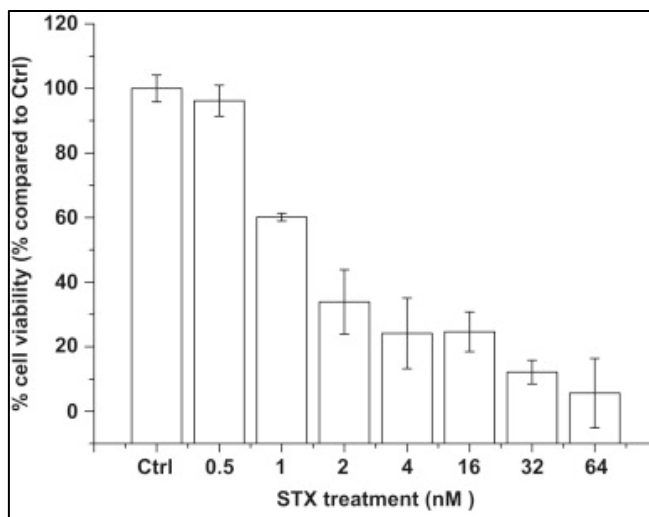


Fig. 1. Change in Neuro-2A cell viability after 24 h of STX treatments (0.5–64 nM). Cell viability was determined using the MTT assay.

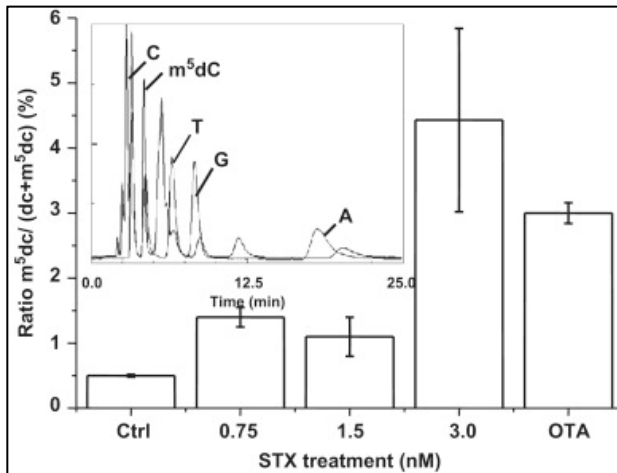


Fig. 2. Change in the ratio $m^5dC/(dC+m^5dC)$ in DNA extracts of Neuro-2A cells after a 24 h exposure to 0.75, 1.5 and 3.0 nM of STX. OTA was used as a positive control. Inset: HPLC chromatogram of m^5dC in standard mix of C, m^5dC , T, G and A ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ each) and extracted DNA of Neuro-2A cells exposed 24 h to STX (C: cytosine, T: thymine, G: guanine, A: adenine).

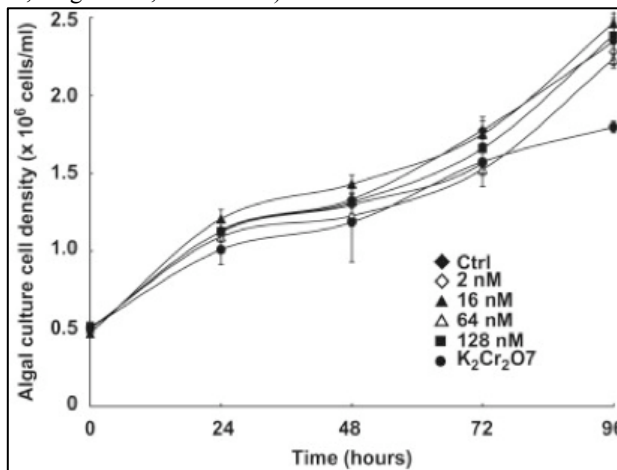


Fig. 3. Change in the algal culture cell density for *C. reinhardtii* exposed to STX concentrations from 2 to 128 nM. $K_2Cr_2O_7$ was used as a positive control.

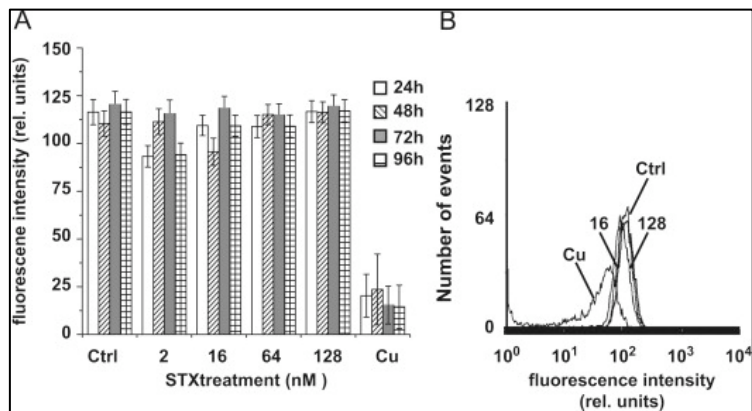


Fig. 4. (A) Change in algal cell viability in *C. reinhardtii* exposed to STX, measured by FDA fluorescence. Cu was used as a positive control. (B) Flow cytometry analysis of the distribution of FDA fluorescence level in algal cell population. Numbers indicate STX concentrations in nM.

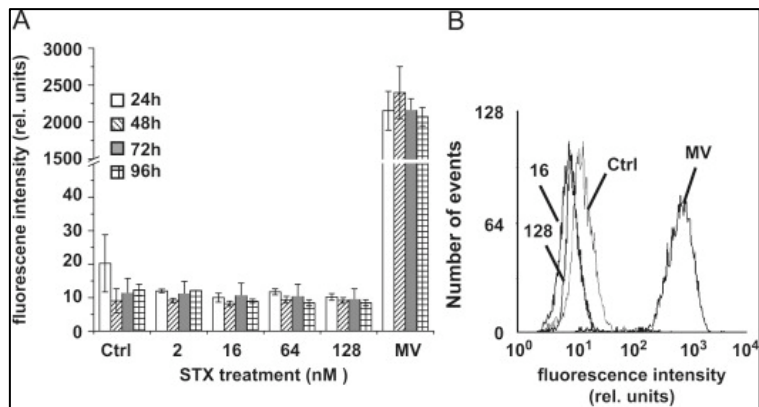


Fig. 5. (A) Change of the intracellular ROS level in *C. reinhardtii* cultures exposed to STX concentrations, measured by H₂DCFDA fluorescence. Methylviologen (MV) was used as a positive control. (B) Flow cytometry analysis of the distribution of H₂DCFDA fluorescence level in algal cell population. Numbers indicate STX concentrations in nM.

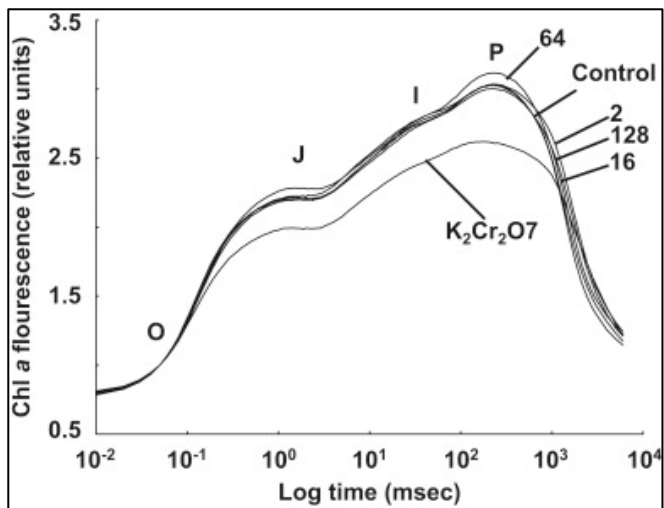


Fig. 6. Change in the rapid rise of chlorophyll a fluorescence in *C. reinhardtii* cultures exposed to STX. $K_2Cr_2O_7$ was used as a positive control. Numbers indicate STX concentrations in nM.

**A9. ARTIGO 2: SUBMETIDO À REVISTA CIENTÍFICA
*TOXICOLOGY***

**LIPID PEROXIDATION INDUCTION BY SAXITOXIN IN
NEURO-2A CELLS: THE PROTECTIVE EFFECT OF
VITAMINS C AND E, SUPEROXIDE DISMUTASE AND
CATALASE**

Silvia Pedroso Melegari¹, Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto¹,
Serge Moukha^{2,3}, Edmond Ekué Creppy² e William Gerson
Matias^{1*}

1. Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Campus Universitário- CEP: 88040-970 – Florianópolis/SC - Brasil.
2. Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2 - 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France
3. INRA- Centre de Recherche de Bordeaux Aquitaine, MICA, Unité de Mycologie et de Sécurité des Aliments, Domaine de la grande Ferrade 71 avenue Edouard Bourleaux BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

*Corresponding author. Postal address: William Gerson Matias. Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC - Brasil - Tel.: +55 48 37217742 - Fax: +55 48 37219823.

E-mail address: will@ens.ufsc.br.

Abstract: We investigated the cytotoxic effects of saxitoxin (STX) in Neuro-2A (N2A) cells, using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and measurements of malondialdehyde (MDA) levels. The cells were exposed to different concentrations of STX (0.5-64 nM) in presence of superoxide dismutase (SOD) with catalase (CAT) and vitamins E and C (VitE and VitC, respectively) for the

quantification of MDA levels. A dose-dependent decrease of cellular viability was verified with the increase of STX concentration, going from 96.2% for the concentration of 0.5nM of STX to 24.1% for the concentration of 4.0nM of STX. For the most elevated dose of STX evaluated in the study, the cellular viability went down to 5.6%. The EC₅₀ values of STX for N2A cells were of 1.112nM (R²=0.997). The MDA levels increased from 15 to 113% for 0.38-3.0nM of STX, respectively, when compared to the relative controls of cells that were not treated with STX. When the cells were treated with VitE and SOD/CAT, the production rates of MDA decreased significantly for the lower concentrations of STX, when compared to the condition without antioxidants. The VitC antioxidant was shown not to be efficient to protect the N2A cell from the oxidative attack of STX.

Keywords: saxitoxin, lipid peroxidation, oxidative stress, Vitamin E and C, superoxide dismutase, catalase.

1. INTRODUCTION

The frequency of blooms of toxic cyanobacteria in fresh water destined for human consumption is evident in worldwide literature probably due to the increase in environmental pollution and global warming (Costa et al., 2006; Berger et al., 2006; Hoeger et al., 2004, Lagos et al., 1999; Pereira et al., 2000, Tucci and Sant'anna, 2003; Molica et al., 2005), creating severe practical problems to those in charge of water supply for populations. Thus, cyanobacterial toxins, or "cyanotoxins", have become a human health concern, because they consist of diverse groups of chemical structures, each of them presenting specific toxic mechanisms (Bartam et al., 1999, Carvalho-Pinto-Silva et al., 2003) and specific toxic effects (Sivonen and Jones, 1999).

Saxitoxin (STX) is a neurotoxic toxin classified in the Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins group and it was identified for the first time in fresh water proceeding from *Aphanizomenon flos-aquae* (Ikawa et al., 1982). Apart from this species, STX can be synthesized by other species of

cyanobacteria such as *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya* and *Anabaena* (Sivonen and Jones, 1999, Bouaïcha, 2001). The fast action of STX, blocking sodium channels in nerve axons and causing loss of sensation and paralysis, confers this toxin a highly neurotoxic and potentially lethal effect 2-25 hours after ingestion. The LD50 in mice is of 8-10µg/kg i.p., 3.4µg/kg i.v. and 260µg/kg oral (Falconer, 2008). Data regarding the cytotoxic and genotoxic effects of STX are very scarce. For example, there is neither evidence of human health effects caused directly by the consumption of water containing saxitoxins – producing cyanobacteria (Fitzgerald et al., 1999) - nor data related to the concentrations of saxitoxin-type neurotoxins in drinking water that has caused neurotoxic symptoms in populations exposed to public water supply (Falconer and Humpage, 2005). Recent data published in the “International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms” (ISOC-HAB), organized by the Environmental Protection Agency of the United States of America (US-EPA), reported that there are no data on sub chronic exposure, reproductive, teratogenic or carcinogenic effects of STX (Falconer, 2008).

There are many methods to investigate the cytotoxic effects of the mechanisms of action of a toxin. The *in vitro* assay has demonstrated to be satisfactory as an alternative to the *in vivo* assay, and it has the advantages of being fast and sensible, excluding the ethical questions that emerge from assays involving animal experimentation (Smart and Hodgson, 2008).

The lipid peroxidation (LPO) assay, for example, is characterized by the process where free radicals attack polyunsaturated fatty acids of the cellular membrane, provoking a chain reaction with lipid hydroperoxides as intermediate products (Halliwell, 1987). This process causes modifications in membrane properties such as permeability and fluidity, apart from causing damage to enzymes and receptors. It can also result in the destabilization and disintegration of the cellular membrane, bringing serious health problems to man, from aging to susceptibility to cancer (Valko et al., 2006). When initiated, the LPO forms peroxy free radicals (ROO·) that can be rearranged

through a cyclization reaction of endoperoxides, producing, among other final products of this process, malondialdehyde (MDA). The MDA is a natural biomarker produced in this reaction, which can be quantified and used for the evaluation of this process. The MDA is mutagenic in bacteria and mammals cells and carcinogenic in mice; therefore, it modifies the bases of the DNA, generating bifunctional intermediates that form exocyclic DNA adducts and contributing for mutagenic and carcinogenic effects (Nair et al., 2007; Valko et al., 2006).

Antioxidants are substances that delay and/or prevent the oxidation of this substratum when in low concentrations in relation to the oxidable substratum. Antioxidants are widely distributed in living organisms and are extremely important as representatives in the direct removal of free radicals (Halliwell and Gutteridge, 1999; Valko et al., 2006). The main enzymatic antioxidants are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), which serve as primary defense in the destruction of free radicals. Non-enzymatic antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C), among others, assist in the combat against reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Matias et al., 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999; Møller and Wallin, 1997; Valko et al., 2006).

In the present study, we investigated the individual cytotoxic effects of STX in the Neuro-2A cell line, employing the MTT assay. The effects of LPO on these cells were also investigated utilizing different concentrations of STX, in the absence and presence of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, through the quantification of MDA levels.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell Lines and Culture Medium

All the chemical products used for the cell culture were provided by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). The Neuro-2A cells from the mouse neuroblastoma cell line were obtained from the National Museum of Nature, Paris – France

(from the European Collection of Cell Cultures catalogue no. 89121404; Porton Down, UK). The cells were grown in 75 cm² flasks, with a RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 2% of L-glutamine solution (200mM), 1% of sodium pyruvate solution (100mM) and 1% of antibiotic solution (10mg/mL streptomycin and 10000U/mL penicillin). The culture was maintained at 37°C in a humidified CO₂ (5%) atmosphere (adapted from Humpage et al., 2007).

2.2. MTT Assay

Cell viability was determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. The STX certified reference materials were obtained from the Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada). The cells (10⁵ cells/mL) were seeded in 96-well microplates with 5% of CO₂ at 37°C for 24 h. Then, the cell culture mediums were removed and the cells were exposed to the concentrations of STX, which was diluted in RPMI 1640 (ranging from 0.5 to 64 nM - final concentration in the well). In this test each concentration of STX was evaluated in triplicates. A negative control group (RPMI 1640 without STX) and a positive control group with veratridine 0.05mM and ouabain 0.5mM (O/V) were tested both in triplicates. After the exposure period, the supernatant was discarded and 200µL of the MTT solution (0.5 mg/mL in RPMI-1640) was added and re-incubated for an additional period of 2h. After incubation, the MTT solution was discarded and 200µL of DMSO were added to each well to dissolve the formazan crystals formed. The plates were then read on a microplate reader (DYNATECH MR 4000, France) at 560 nm. The absorbance values of the samples were normalized and the values were expressed in percentage of cellular viability. The EC₅₀ (effective molar concentration which produces 50% of the maximum possible response) was derived from the plotted data by linear extrapolation from the viability values of the dose-response curve.

2.3. Lipid peroxidation: extraction and determination of the MDA–thiobarbituric acid (TBA) adduct

Cells (10^5 cells/ml) were cultured in 24-well microplates for 24 h at 37°C as described above, and then cultures were separately incubated with different protective substances: vitamin C (8 and 16 µg/mL, respectively VitC8 and VitC16), vitamin E (6 µg/mL, VitE) and enzymes SOD/CAT (25 µg/mL each). The cells were incubated for 1 more hour. A control was employed using culture medium, and a positive control was employed using ochratoxin A (OTA - 10 µM) or methotrexate (MTX - 20 µM). The N2A cells were intoxicated for 24h at 37°C with STX in the concentrations of 0.38, 0.75, 1.50 and 3.00 nM. After incubation, the cells were scrapped and centrifuged at 2000xg for 5 min. The cell pellets were resuspended in 250 µL SET buffer (0.1M NaCl, 20mM EDTA, 50mM Tris–HCl, pH 8.0). To each sample were added: 25 µL SDS 7% (w/v), 300 µL HCl 0.1 M, 40 µL phosphotungstic acid 1% (w/v) and 300 µL thiobarbituric acid 0.67% (w/v). The tubes were shaken and incubated at 90°C for 1 h in the dark. They were further placed for 15 min in an ice bath (0°C). After this period, a volume of 300 µL of n-butanol was added and tubes were shaken vigorously. After centrifugation for 10 min at 900xg at 4°C, the n-butanol phase from each sample containing the MDA–TBA adduct was separated and analysed through high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection.

The HPLC system consisted of an ICS (Instrumentation Consumable Service, France) chromatography pump equipped with a Shimadzu 8450 Fluorescence HPLC Monitor (Japan Spectroscopic Co.). The analysis of the MDA–TBA adducts was performed at room temperature on a Prontosil Eurobond C18 column (Bischoff Chromatography, Germany, 250x4.6 mm, ϕ part.:5 µm) using methanol–water 40:60 (v/v) as the mobile phase was adjusted to pH 8.4 by the addition of KOH 0.5M. The flow rate was maintained at 0.5 mL/min and an automatic injection of 90 µL. The excitation and emission wavelengths were of 515 and 553 nm, respectively (Adapted from Matias et al., 1999). The amount of MDA-TBA measured is related to the protein content

of cellular homogenates, determined using Bradford's colorimetric method (1976).

2.4. Statistical analysis

All the results were expressed as the mean \pm SEM and the correlation factor (R^2) was calculated by the GraphPad Prism® Software, through a sigmoid of variable slope. The EC50 was estimated of this equation by GraphPad Prism® Software and only significant correlation coefficients are reported. Differences between the results of MDA levels and the control groups were compared with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test, for multiple comparisons. A significance level of $p < 0.05$ was accepted.

3. RESULTS

3.1. Influence of STX on cell viability: MTT Assay and Determination of EC50

For the cell viability of N2A cells and determination of EC50 values, a scale of eight concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16, 32 and 64nM) of STX was applied in three different experiments. The curve of cell viability as a function of the STX concentration was normalized and plotted in Figure 1. A dose-dependent decrease of cell viability of N2A cells was verified with the increase of 0.5-64nM in STX concentrations. This reduction went from 96.2% of cell viability for 0.5nM of STX to 24,1% for 4.0nM of STX. In the highest dose of STX evaluated in this study, the cell viability was 5.6%. The results of the MTT test demonstrate that the exposure of N2A cells to different concentrations of STX leads to a dose-dependent reduction of the metabolic activity in mitochondria, which parallels cell viability.

From Figure 1, it was possible to calculate the EC50 of STX, which was 1,112nM. This result was important for the second stage of the study, which consisted in the exposure of N2A cells and quantification of MDA levels to verify if STX induces cellular LPO. Therefore, appropriate experiments with approach values of EC50 such as 3.0nM, 1.5nM, 0.75nM and

0.38nM of STX were adapted for further use in the lipid peroxidation tests.

3.2. LPO and the effect of oxidative stress

After 24h of incubation, the N2A cells in culture spontaneously produced 83.79 ± 5.94 nM MDA/mg protein. This value was considered the control value for N2A cells without STX. After 24h of exposure to the VitE antioxidant, the N2A cells in culture spontaneously produced 59.09 ± 1.57 nM MDA/mg protein. As for the N2A cells in culture with antioxidants VitC8 and VitC16, they spontaneously produced 89.80 ± 9.42 and 107.31 ± 17.29 nM MDA/mg protein, respectively, while the N2A cells in culture with antioxidants SOD/CAT spontaneously produced 102.47 ± 10.88 nM MDA/mg protein. All these values were considered the control value for N2A cells without STX. After 24h of incubation, as the STX concentrations increased, the MDA production in N2A cells also increased significantly (Fig. 2).

The production of MDA increased from 15 to 113% for 0.38-3.0nM of STX, respectively, when compared to controls (Tab.1). When N2A cells were pretreated with VitC8, this rate increased to 66-209%, and when N2A cells were pretreated with VitC16 the rates went from 36 to 181% for the same concentrations of STX (Tab.1).

When the N2A cells were pretreated with VitE and with SOD/CAT, the production rates of MDA decreased significantly for the lowest STX concentrations, when compared to the condition without antioxidants. For VitE, the production rate of MDA was of 3%, 31%, 95% and 120%, and for SOD/CAT it was of 3%, 47%, 75% and 160%, both for 0.38, 0.75, 1.5 and 3.0nM STX (Tab.1), respectively.

4. DISCUSSION

In a previous study (Perreault et al., 2011), the cytotoxic and genotoxic effects of STX in N2A cells had already been investigated. In this study it was evidenced that STX induces

indirect genotoxic effects in N2A cells when they are exposed in the same concentrations employed in this research. The results of the MTT assay demonstrate that the exposure of the N2A cells in different concentrations of STX causes a dose-dependent decrease on cellular viability, and a consequent reduction of the mitochondrial metabolic activity. These results clearly point mitochondria as a indirect target of STX. This evidence is an indicative that STX affects the integrity of these organelles and, therefore, the integrity of cellular respiration. The nervous system cells possess a high amount of mitochondria due to their great necessity of energy (Cooper and Hausman, 2007). Our results show that this mechanism is affected, what might be one of the reasons for the neurotoxic effect of STX. The EC50 of STX determined for N2A cells was an extremely low value, which led to the conclusion that this cell line of neuronal origin is susceptible to the neurotoxin in study. This evidence qualifies the N2A cell as adequate and representing for the study of mechanisms of action with low concentrations of STX.

Studies concerning the effects of the N2A cell line exposed to STX and the correlation to the induction to lipid peroxidation, in the absence and presence of antirust substances, have not yet been reported in the literature, but it is known that the brain and the nervous system are inclined to oxidative stress due to the lack of an adjusted antioxidant defense system (Halliwell, 2006).

The MDA levels, which increase as a consequence of the LPO for oxidative stress, were significantly more elevated in N2A cells exposed to STX than in controls without exposure. All the results prove that after 24h of incubation, STX induces the LPO of N2A cells. Endogenous and exogenous substances can produce ROS proceeding from LPO (Møller and Wallin, 1997). For this case, that STX acts as an exogenous source of oxidative stress, and the ROS were probably responsible for the LPO. When produced inside of the cells, ROS are capable to virtually react with all types of biomolecules (Møller and Wallin, 1997), and potential endogenous sources including mitochondria, cytochrome P450 metabolism, peroxisomes, and inflammatory cell activation (Inoue et al., 2003). Neurotoxins generally lead to

the formation of ROS in clinical categories of the nervous system (Halliwell, 1987).

Evaluating the sequence of events, it is possible to consider a correlation between the two processes evaluated for induced cytotoxicity by STX: N2A cells exposed to the low concentrations of STX were induced to mitochondrial injuries and peroxidation of the lipid membrane. Through the evaluation of the mechanism of neurodegeneration proposed by Halliwell (1999), we suggest two toxic mechanisms caused by STX in N2A cells: a first mechanism starts with the oxidative stress of the exposure to ROS (STX), inducing the LPO process and the formation of MDA. The main consequences of this LPO mechanism are base modifications, inhibition of protein synthesis, denaturation of DNA and formation of DNA adducts, which can induce to genotoxic, mutagenic and carcinogenic processes (Baudrimont et al., 1997; Matias et al., 1999; Halliwell, 2007). Thus, the presence of the cytotoxic MDA induces an abnormal protein overload, leading to the dysfunction of the proteasome. High levels of oxidative damage can result not just from oxidative stress, but also from the limitation of the cellular repair system (Halliwell, 2007). This dysfunction causes a deregulation of the cell protection system, leading to cellular death. In the second mechanism, the reactive species (STX) directly attacks the mitochondria, causing irreversible mitochondrial damages and also leading to cellular death (Halliwell, 2007).

Among the antioxidants tested, SOD catalyzes the dismutation of the superoxide free radical; it is present in the mitochondrial matrix (Mn-SOD), in cytosol (CuZn-SOD) and in the extracellular medium. The product resultant from the reaction catalyzed by SOD is the hydrogen peroxide that is removed from the medium by CAT, which transforms hydrogen peroxide in water and molecular oxygen (Fridovich, 1995; Valko et al., 2006). These enzymes are extremely important for the protection of the nervous system and the removal of peroxide; SOD is present in all parts of the animal nervous system (Fridovich, 1995). CAT is located, mainly, in peroxisome, however, other

organelles such as the mitochondria can contain some activity of CAT. VitE (α -tocopherol) is the greatest and most important hydrophobic antioxidant, present in all cellular membranes and, therefore, acts in the protection against LPO (Roy et al., 2002; Valko et al., 2006). Our results suggest that the administration of VitE in humans contaminated by STX can balance the effect of LPO. VitC (ascorbic acid) is an important and powerful hydrophilic antioxidant. Its preliminary antioxidants partners are VitE and carotenoids, which work together well as antioxidant enzymes (Valko et al., 2006).

The pre-treatment with VitE and SOD+CAT for the culture medium before the exposure to STX seemed efficient in the prevention against the LPO when compared to VitC. VitC was not efficient for the protection of N2A cells when they were exposed to the oxidative stress of STX, possibly due to the high relation of concentration with the reactive species. In specific conditions (in the presence of intracellular Cu, as [CuZnSOD] in mitochondrial membrane and in cytosol) the ascorbate can be oxidated, producing cytotoxic species (Halliwell, 2006). In this case, VitC performs the most potent toxic effects of STX in a synergic form, which means that a person contaminated by STX must prevent the consumption of foods and medicines with high concentrations of this vitamin. VitC is known as the hydrophilic antioxidant, and recent evidences suggest that VitE and VitC function together in a cyclical process (Kojo, 2004). VitC cooperates with VitE to regenerate α -tocopherol of the α -tocopherols radicals in the membranes and lipoproteins. A suggestion for future assays is the investigation of the interaction between VitC and VitE in the protective effect of the oxidative stress provoked by STX for different times of incubation.

5. CONCLUSION

The present data confirmed which N2A neuroblastoma cell line is suitable for toxicity evaluation of STX and demonstrated which main mechanisms triggering its toxic effects involve the indirect mitochondrial damage and the oxidative stress, leading

possibly to cell death through an apoptotic process or lipid peroxidation of cell membranes. When the cells were treated with VitE and SOD/CAT, the production rates of MDA decreased significantly on the lower concentrations of STX, when compared to the condition without antioxidants. The VitC antioxidant was shown not to be efficient to protect the N2A cell from the oxidative attack of STX.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for its financial support. S.P. Melegari would also like to thank for her fellowship in the Laboratory of Toxicology, University of Bordeaux 2 (France).

7. REFERENCES

Bartram, J., Carmichael, W.W., Chorus, I., Jones, G., Skulberg, O.M., 1999. Introduction, in: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London, pp. 12-24.

Baudrimont, I., Ahouandjivo, R., Creppy, E.E., 1997. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents. *Chem. Biol. Interact.* 104, 29-40.

Berger, C., Ba, N., Gugger, M., Bouvy, M., Rusconi, F., Couté, A., Troussellier, M., Bernard, C., 2006. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Guiers (Senegal, WestAfrica). *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 355-366.

Bouaïcha, N., 2001. Impact sanitaire des toxines de cyanobactéries en milieu d'eau douce. *Revue Francaise des Laboratoires.* 336, 39-46.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Cañete, E., Diogène, J. 2008. Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* 52, 541–550.

Carvalho Pinto-Silva, C.R., Ferreira, J.F., Costa, R.H.R., Belli Filho, P., Creppy, E.E., Matias, W.G., 2003. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon* 41, 93-97.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. 2007. *A célula: uma abordagem molecular*, third ed. Artmed, Porto Alegre, 716p.

Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., Chellappa, N.T., 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.* 66, 211-219.

Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 43–50.

Falconer, I.R., 2008. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins, in: Hudnell, H.K. (Ed.) *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer Press, North Carolina, pp. 607-612.

Fitzgerald, D.J., Cunliffe, D.A., Burch, M.D., 1998. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environ. Toxicol.* 14, 203-209.

Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97-112.

Halliwell, B., 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1, 358-364.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*, third ed. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97,1634-1658.

Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147-1150.

Hoeger, S.J., Shawb, G., Hitzfeldc, B.C., Dietrich, D.R., 2004. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon* 43, 639-649.

Humpage, A.R., Ledreux, A., Fanok, S., Bernard, C., Briand, J.F., Eaglesham, G., Papageorgiou, J., Nicholson, B., Steffensen, D., 2007. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1512-1519.

Ikawa, M., Wegener, K., Foxall, T.L., Sasner, J.J., 1982. Comparison of the toxins of the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae* with the Gonyaulaxtoxins. *Toxicon* 20, 747-752.

Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 10, 2495-2505.

Jellett, J.F., Stewart, J.E., Laycock, M.V., 1995. Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay. *Toxicol. In Vitro* 9, 57-65.

Kojo, S., 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 11, 1041-1064.

Kouadio, J.H., Danob, S.D., Moukha, S., Mobio, T.A., Creppy, E.E., 2007. Effects of combinations of Fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicon* 49, 306-317.

Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium

Cylindrospermopsis raciborskii, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359-1373.

Matias W.G., Traore, A., Bonini, M, Sanni, A., Creppy, E. E., 1999. Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. *Human & Experimental Toxicology* 18, 634-639.

Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.P.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harm. Algae* 4, 743–753.

Møller, P., Wallin, H., 1998. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mut. Res.* 410, 271–290.

Nair, U., Bartsch, H., Nair, J., 2007. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 43, 1109–1120.

Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N., Oshima, Y., 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689-1702.

Perreault, F., Matias, M.S., Melegari, S.P., Carvalho-Pinto Silva, C.R, Creppy, E.E., Popovic, R., Matias, W.G., 2011. Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1021–1026.

Roy S., Lado, B. H., Khanna, S., Sen, C.K. 2002. Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis. *FEBS Letters* 530, 17-23.

Smart, R.C., Hodgson, E. (Eds). *Molecular and Biochemical Toxicology*. John Wiley, New York, pp. 287-318.

Sivonen K, Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins, in: Chorus, I., Bartman, J. (Eds.) *Toxic cyanobacteria in water: A guide to*

their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London, pp. 55-124.

Tucci, A., Sant'anna, C.L., 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. Rev. Brasil. Bot. 26, 97-112.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Bio. Interactions 160, 1–40.

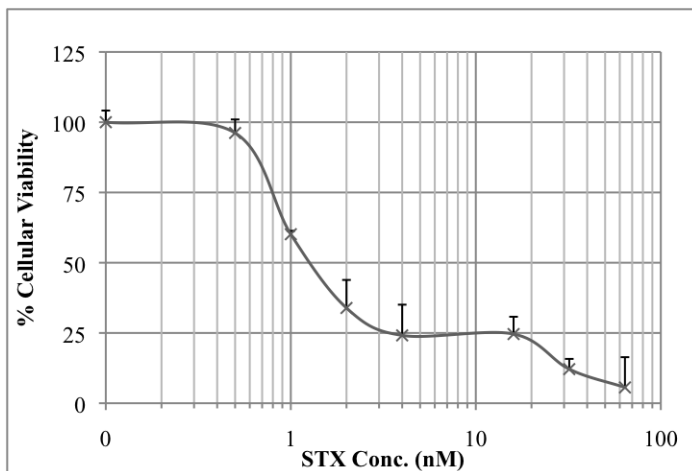


Figure 1: Dose-response profiles of STX in N2A cells by % cellular viability \pm SD v. STX concentration ($R^2=0.997$).

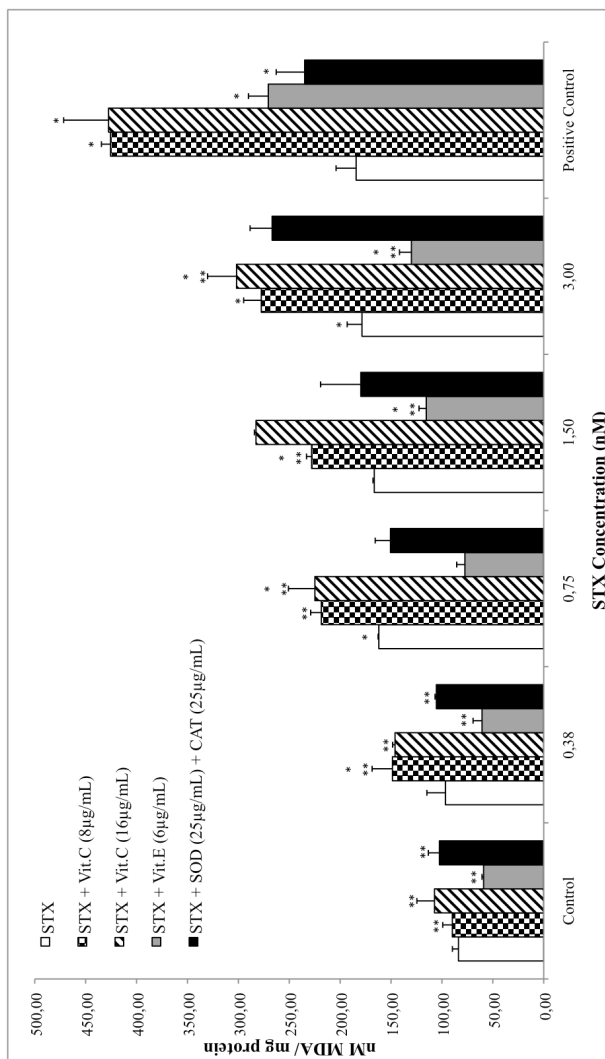


Figure 2: LPO levels induced by increasing STX concentrations in N2A cells, and with several antioxidants, as measured by quantification of MDA levels, after 24 h of incubation (* $p > 0.05$ in relation with the control and ** $p > 0.05$ in relation with the positive control).

Table 1: Lipid peroxidation measured by the increase of MDA production (%), when compared to controls.

STX (nM)	% Increase MDA production				
	Without antioxidants	Vit. E 6µg/mL	Vit. C		SOD+CAT 25µg/mL (each)
			8µg/mL	16µg/mL	
0.38	15	3	36	66	3
0.75	93	31	109	143	47
1.50	99	95	163	154	75
3.00	113	120	181	209	160
Positive control	120 ¹	358 ¹	298 ²	374 ¹	129 ¹

1. MTX 20µM, 2. OTA 10µM

**A10. ARTIGO 3: SUBMETIDO À REVISTA CIENTÍFICA
*TOXICOLOGY***

**MICRONUCLEI INDUCTION IN VERO CELLS AND
NEURO 2-A CELLS BY SAXITOXIN**

Silvia Pedroso Melegari¹, Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto¹,
Serge Moukha², Edmond Ekué Creppy² and William Gerson
Matias^{1*}

1- Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis – SC - Brasil.

2- Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2 - 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

* Corresponding Author. Address: Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC - Brasil - Tel.: +55 48 37217742 - Fax: +55 48 37219823. E-mail address: will@ens.ufsc.br (W.G. Matias).

Abstract: In the present study, Neuro-2A (N2A) and Vero cells were treated in a first stage with 8 concentrations of STX, in an interval of 0.5 to 64nM, to determine EC50 for the cells evaluated, and in as a second stage with specific concentrations (0.38-3.0nM) to evaluate the induction to the micronuclei formation with the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in 24 hours of exposition, being emphasized the treatment with STX to evaluate its genotoxicity in inducing damages to the mutagenic level. The EC50 for cells N2A was of 1.112nM, and for the Vero cells it was of 1.052nM. The results demonstrated a significant increase dose-dependent of micronucleated binucleated cells (BNMN) for cells N2A and Vero cells. Evidences had suggested despite the STX can inhibit the cellular division, and some morphologic criteria observed BNMN cells were that the micronucleus touches the nucleus main but does not

overlap it and presents the same intensity of coloration of the main nucleus, and had not been observed cases of cellular necrosis for formation of multinucleated cells. The MN had still presented so great of 1/3 to the 1/6 of the main nucleus, being able to be an indicative of aneugenic effect.

Keywords: saxitoxin, micronuclei, Neuro-2A cells, Vero cells.

1. INTRODUCTION

Saxitoxin (STX) is a neurotoxin classified in the Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins group and it was identified for the first time in fresh water proceeding from *Aphanizomenon flos-aquae* (Ikawa, 1982). Apart from this species, STX can be synthesized by other species of cyanobacteria such as *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya* and *Anabaena* (Sivonen & Jones, 1999, Bouaïcha, 2001, Hoeger et al., 2004). The fast action of STX, blocking sodium channels in nerve axons and causing loss of sensation and paralysis, confers this toxin highly neurotoxic and potentially lethal effect. The LD50 in mice is 8-10µg/kg i.p., 3.4µg/kg i.v. and 260µg/kg oral (Falconer, 2008).

Data regarding the cytotoxic and genotoxic effects of STX are very scarce. Fitzgerald et al. (1999) verified that there is no evidence of human health effects directly caused by the consumption of water containing saxitoxins and/or producing cyanobacteria. Falconer and Humepage (2005) confirmed that there is no data on the secure concentration levels of STX-type neurotoxins in drinking water supply. Recent data published in the “International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms” (ISOC-HAB), organized by the Environmental Protection Agency of United States of America (US-EPA), reported that there are no data on sub chronic exposure, reproductive, teratogenic or carcinogenic effects of STX (Falconer, 2008).

The *in vitro* assay has demonstrated to be satisfactory as an alternative to *in vivo* assay and it has the advantages of being a fast and sensible assay, excluding ethical questions that emerge

from assays involving animal experimentation. The Neuro-2A bioassay of the neuroblastoma mouse cell line was described by Jellet et al. (1992) as a method to detect the STX.

The study of DNA damage at the chromosome level is an essential part of genetic toxicology because chromosomal mutation is an important event in carcinogenesis (Fenech, 2000), and the understanding of the origin of this damage in the DNA can contribute to evaluated which mechanisms act the genotoxic agents (clastogenic and aneugenic effects).

The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay is widely employed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of chemical products and to monitor human exposure to environmental carcinogens (Fenech, 2000, Lorge et al., 2006). This technique was found more favorable than the test of chromosome aberration, being recommended for spread use in genotoxicity tests (Miller et al., 1998, Zhong et al. 1991, Miller et al. 1997). The CBMN assay allows a parallel evaluation and can be complemented through the incorporation of cytotoxicity measurements (for example, tests of cellular viability and counting of cells in apoptosis and necrosis) to identify the main event caused by a particular xenobiotic agent (Fenech et al. 1999). All these morphologic features can be obtained in the same cells after appropriate treatment for each case. This assay was employed in this study to identify if the STX can induce genetic damage to the mutagenic level of the cell lines evaluated (Fenech et al. 1999).

In the present study, Neuro-2A (N2A) and Vero cells were treated in two stages. In the first stage, the treatment was done with a range of STX concentrations, in an interval of 0.5 to 64 nM, to determine the EC50 of the evaluated cells. In the second stage, the cells were treated with specific concentrations (0.38-3.0nM) to evaluate the induction to micronuclei (MN) formation through the CBMN assay after a 24-hour exposure, emphasizing the STX treatment to evaluate its genotoxicity when inducing damages in mutagenic levels.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell Lines and Culture Medium

All chemicals employed were provided by Sigma (Saint Quentin Falavier, France). The N2A cells from the mouse neuroblastoma cell line were obtained from the National Museum of Nature, Paris – France (European Collection of Cell Cultures catalog no. 89121404; Porton Down, UK). The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 50µg/mL streptomycin, and 50U/mL penicillin. The culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ (Humpage et al., 2007). The Vero cells (Adolpho Lutz Institute, Brazil), epithelial kidney cells extracted from an African green monkey, were grown in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 50µg/mL streptomycin, and 50U/mL penicillin. The cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. (Matias & Creppy appud Terasima & Ysukawa, 1998).

2.2. MTT Assay

Cell viability was determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. The STX certified reference materials were obtained from the Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada). The cells (10⁵ cells/mL) were seeded in 96-wells multitest plates with 5% CO₂ at 37°C for 24 h. Then, the culture medium was removed and the cells were exposed to the concentrations of STX, which were diluted in RPMI 1640 (ranging from 0.5 to 64nM - final concentration in the well). All concentrations of STX were diluted in cascade and evaluated in triplicates. In parallel, a negative control group (RPMI 1640 without STX) was tested along with a positive control group (RPMI 1640 with 0.05mM veratridine and 0.5mM ouabain for N2A cells and RPMI 1640 with 20 µM methotrexate for Vero cells – all final concentrations in the well). After intoxication, the cells were re-incubated for

24h. Then, the supernatant was discarded and 200 μ L of MTT solution (0.5 mg/mL in RPMI-1640) were added to each well and re-incubated for an additional 2h. The MTT solution was discarded and 200 μ L of DMSO were added to each well to dissolve the formazan crystals formed. After mixing, the plates were then read on a multitest plates reader (DYNATECH MR 4000, France) at 560 nm. The EC₅₀ (half minimal effective concentration) was derived from the data plotted by linear extrapolation from the viability values of the dose-response curve (Humpage et al, 2007).

2.3. CBMN Assay

After 24h of pre-cultivation of Vero and N2A cells on 24-well multitest plates (10⁵ cells/ml), cultures were treated with STX (0.38, 0.75, 1.50 and 3.00nM), with RPMI 1640 medium as negative control and Colchicin (COL / 0.3 μ M) as positive control for both cells tested for 24h in triplicates. Cytochalasin B (Cyt-B - 5 μ g/mL) was added to the cultures for an 18-hour incubation, and the cells were harvested. A mild hypotonic treatment with 0.075M KCl was then performed followed by immediate centrifugation at 5000g for 5min. The supernatant was discarded and the cells were fixed in 250 μ L methanol/acetic acid 3:1(v:v) for 20 minutes. After, they were dropped on glass slides and dried for 30min (adapted from Ouanes et al., 2003). The slides were stained with acridine orange/ethidium bromide for 15min. The slides were analyzed under 400x magnification using a fluorescent microscope (Nikon, Eclipse E 400). One thousand binucleated cells were assessed per slide.

2.4. Statistical Analysis

All the results were expressed as mean \pm SEM, and the correlation factor (R²) was calculated by the GraphPad Prism® Software, through a sigmoid of variable slope. The EC₅₀ was estimated for this equation by the GraphPad Prism® Software.

For the binucleated micronucleated cells (BNMN), the T-Student statistic test was employed to compare BNMN frequencies between treated and control groups. The frequencies

were also compared individually in each group tested. Significance of differences was set at $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Influence of STX on Cell Viability: MTT Assay and Determination of EC50

For determination of the EC50, a scale of eight concentrations of STX (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 and 64.0nM for both cells) was applied in three different experiments. After the exposure of the N2A and Vero cells to STX and analysis of the data, a curve of cell viability *v.* STX concentration was plotted for both cases. The results are shown in Figure 1.

A similar dose-dependent decrease of cell viability values is observed for both cases, with an increase in the concentration of STX. The results of the MTT test demonstrate that the exposure of N2A and Vero cells to different concentrations of STX leads to a dose-dependent reduction of the metabolic activity in mitochondria, and consequently, a reduction in cell viability.

In the N2A cells, the reduction goes from 96.2% of cell viability for the concentration of 0.5nM STX to 24.1% for 4.0nM of STX. In the highest dose of STX evaluated, the cell viability was 5.6%. In the Vero cells, the reduction goes from 87.6% of cell viability for the concentration of 0.5nM STX to 40.6% for 4.0nM of STX. In the highest dose of STX evaluated, the cell viability was 18.6%.

The EC50 of STX calculated was 1.112nM for N2A cells and 1.052nM for Vero cells. This result was essential for the second stage of the study, which consisted in the exposure of N2A and Vero cells to STX from the CBMN assay. Therefore, we adapted appropriate experiments with approaching values of EC50 to use in the MTT tests, such as 3.0, 1.5, 0.75 and 0.38nM of STX.

3.2. CBMN Assay

Concerning the CBMN assay in N2A and Vero cells, frequencies of BNMN, which are the numbers of BNMN per 1000 binucleated (BN) cells counted, are shown in Fig. 2. This assay was employed to identify the genotoxic effect of STX that may lead to genetic and mutagenic damages. During the BNMN counting, a high number of mononucleated cells was observed. Due to the elevated amount of these cells, these were included in the total counting of MN, considering that this condition is induced by STX. This effect was not observed with COL (positive control). The results demonstrate a significant dose-dependent increase of BNMN for N2A cells from 4.5 ± 1.3 (0.38nM) to 10.0 ± 2.2 at the highest concentration of STX (3.00nM), when compared to the negative control (1.0 ± 0.8). As for the Vero cells, the increase went from 17.5 ± 2.1 (0.38nM) to 27.5 ± 2.1 at the highest concentration of STX (3.00nM), when compared to the negative control (7.0 ± 0.8). Figure 3 shows the image of BN cell controls (Fig. 3A) and BNMN cells induced by the exposure to STX. In the same conditions, cell cultures treated with COL showed a significant increase of BNMN when compared to the negative control with medium culture (12.8 ± 3.5 for N2A cells and 28.3 ± 2.5 for Vero cells).

4. DISCUSSION

The genotoxic effects of STX for the induction to micronucleus formation have not been reported in scientific literature yet. In a previous study, (Perreault et al., 2011) the potential cytotoxic effect of STX, inducing N2A cells to cellular apoptosis, was demonstrated, along with its significant inductive effect in the disturbance of the system of cellular regulation. In another study (Melegari et al., 2010), it was demonstrated that STX can induce N2A cells to significant levels of oxidative stress.

Similar studies employing other neurotoxins can be found in the literature. The genotoxic potential of tetrodotoxin in brown mouse bone cells were evaluated by Guzmán et al. (2007)

and evidences were not found to prove its genotoxic potential. The genotoxic potential of the domoic and ocadaic acids on Caco cells was evaluated by Carvalho Pinto-Silva et al. (2006). Both toxins were considered mutagenic, inducing micronuclei formation; however, the domoic acid only presented clastogenic effects.

The genotoxic activity of the cylindrospermopsin (CYN) was evaluated in WIL2-NS lymphoblasts by Humepage et al. (2000). CYN is a potent inhibitor of protein synthesis produced by a number of cyanobacterial species, the most common being *Cylindrospermopsis raciborskii*. Its results suggest that CYN acts to induce cytogenetic damage via two mechanisms, one at DNA level to induce strand breaks (clastogenic), the other at kinetochore/spindle level to induce loss of whole chromosomes (aneugenic).

COL, employed as positive control in this study, is characteristic for the induction to aneugenic damages (Kirchner and Zeller, 2010) and it was chosen to evaluate the inclination of in vitro MN induction, specifically aneugenic.

In relation to the morphologic criteria (Fenech, 2000) of the analysed samples, an increased presence of micronucleus (MNs) cells was verified in the samples exposed to STX, when compared to the control. This evidence suggests that STX can inhibit cellular division. However, the majority of the MN found was in BN cells, this result being an indicative of the mutagenic potential of STX. Cases of cellular necrosis through the formation of multinucleated cells were not observed (Fenech, 2000). A significant increase was observed in BN cells regarding the number of MN with 1/3 the size of the main nucleus in relation to the smaller MNs (Fig. 3B). Other morphologic characteristics of the MN found were identified: they touch but do not overlap the main nucleus and present the same staining intensity (Fenech, 2000).

Hashimoto et al. (2010) had accomplished a study as an attempt to develop a fast technique that discriminates aneugen from clastogen damages, considering the size (large or small) of the MN in in vitro MN assays. Nine aneugen substances were

chosen along with six clastogen substances, comparing the *in situ* hybridization through fluorescence (FISH) and the ratio of the size-classified MN counting in relation to the total MN counting. The size-classified counting revealed that all 9 aneugens evaluated increased both frequency and proportion of the large-size MN when compared to the control vehicle, while the clastogens increased the frequency, but no increase in the proportion was observed. With the FISH method, all the aneugens induced centromere-positive micronuclei but the clastogens did not. Based on these results, it was considered that the frequency of large-size MN in the *in vitro* MN assay is an alerting index for aneugenic effects and that its proportion is a simple and reliable index, which is as effective as the FISH analysis for discrimination of aneugens from clastogens. Although FISH methods were not employed for the characterization of aneugen and clastogen effects in this study, based in the results of Hashimoto et al. (2010) and considering the frequency of large MN, it was possible to establish an indicative that the effects induced by STX are aneugenic.

Our results allow the conclusion that, in the conditions tested, STX induced a significant increase of BNMN frequency in both N2A and Vero cells; therefore, the exhibition of these cells presented a dose-dependent correlation with the increase of the concentration of STX. The increase of micronucleus frequency with the variation of the concentration of STX evidences that STX induces a potential genotoxic effect in N2A and Vero cells.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for its financial support. S.P. Melegari would also like to thank for her fellowship in the Laboratory of Toxicology, University of Bordeaux 2 (France).

6. REFERENCES

- Bouaïcha, N., 2001. Impact sanitaire des toxines de cyanobactéries en milieu d'eau douce. Revue Francaise des Laboratoires. 336, 39-46.
- Carvalho Pinto-Silva, C. R., Moukha, S., Matias, W. G., Creppy, E. (2006) Comparative Study of Domoic Acid and Okadaic Acid Induced - Chromosomal Abnormalities in the CACO-2 Cell Line. Int. J. Environ. Res. Public Health 3, 4-10.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. Int. J. Environ. Res. Public Health 2, 43-50.
- Falconer, I.R., 2008. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins, in: Hudnell, H.K. (Ed.) Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Springer Press, North Carolina, pp. 607-612.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. Mutagenesis 14, 605-612.
- Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. Mut. Res. 455, 81-95.
- Fitzgerald, D.J., Cunliffe, D.A., Burch, M.D., 1998. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking-water in South Australia. Environ. Toxicol. 14, 203-209.
- Guzmán, A., Henestrosa, F.A.R., Marín A. P., Ho, A., Borroto, J. I. G., Carasa, I., Pritchard, L. 2007. Evaluation of the genotoxic potential of the natural neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) in a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. Mut. Res. 634, 14-24
- Hashimoto, K., Nakajima, Y., Matsumura, S., Chatani, F. 2010. An *in vitro* micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. Toxicology in Vitro 24, 208-216.

Hoeger, S.J., Shawb, G., Hitzfeldc, B.C., Dietrich, D.R. 2004. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon* 43, 639–649.

Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I. R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mut. Res.* 472, 155–161.

Humpage, A.R., Ledreux, A., Fanok, S., Bernard, C., Briand, J.F., Eaglesham, G., Papageorgiou, J., Nicholson, B., Steffensen, D., 2007. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1512–1519.

Ikawa, M., Wegener, K., Foxall, T.L., Sasner, J.J., 1982. Comparison of the toxins of the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae* with the Gonyaulaxtoxins. *Toxicon* 20, 747-752.

Matias, W.G., Creppy, E.E. 1998. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in vero cells. *Environ. Toxicol. Water Quality* 13, 83-88.

Melegari, S.P., Carvalho-Pinto Silva, C.R., Moukha, S., Creppy, E.E., Matias, W.G., 2010b. Lipid peroxidation induction by saxitoxin in neuro-2a cells: the protective effect of vitamins c and e, superoxide dismutase and catalase. *Toxicology* (submitted)

Miller, B., Potter-Locher, F. Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D., Madle, S. 1998. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test, *Mutat. Res.* 410, 81–116.

Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V., Lorge, E. 1997. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, *Mutat. Res.* 392, 45–59.

Perreault, F., Matias, M.S., Melegari, S.P., Carvalho-Pinto Silva, C.R, Creppy, E.E., Popovic, R., Matias, W.G., 2011. Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin

ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1021–1026.

Smart, R.C., Hodgson, E. (Eds) (2008) *Molecular and Biochemical Toxicology*. John Wiley, New York, pp. 287-318.

Sivonen K, Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins, in: Chorus, I., Bartman, J. (Eds.) *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN Spon, London, pp. 55-124.

Tucci, A., Sant'anna, C.L., 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Brasil. Bot.* 26, 97-112.

Zhong, B., Gu, Z., Whong, W., Wallace, W.E., Ong, T. 1991. Comparative study of micronucleus assay and chromosomal aberration analysis in V79 cells exposed to ethylene oxide, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis* 11, 227–233.

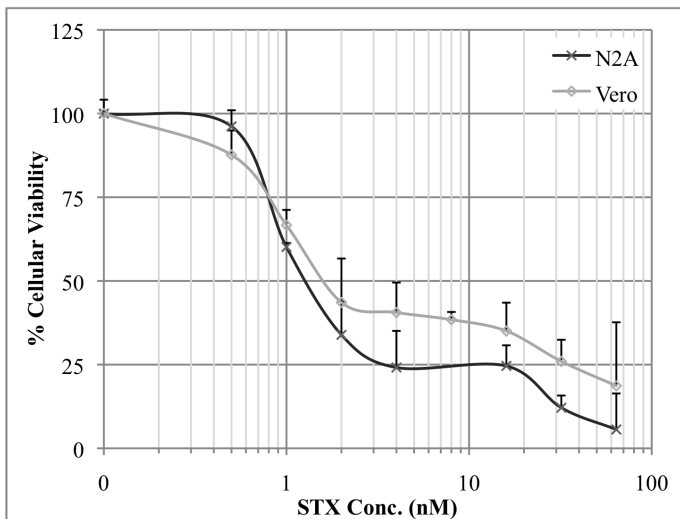


Fig. 1: Dose-response profiles of STX in N2A and Vero cells for cellular viability (%) \pm SD v. STX concentration ($R^2=0.997$ to N2A cells and $R^2=0.9635$ Vero cells).

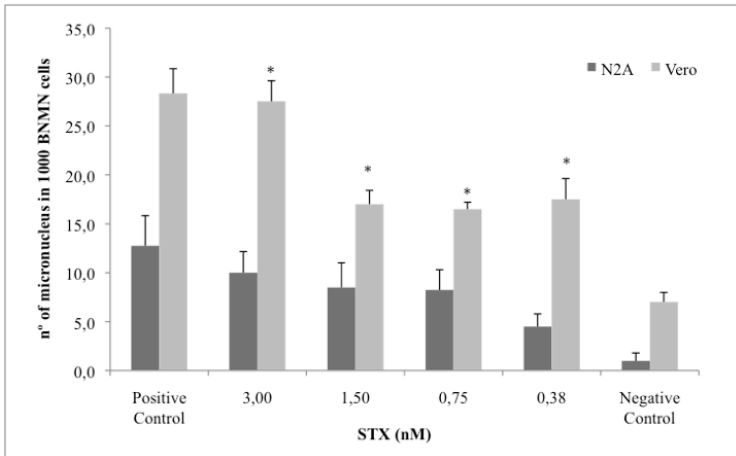


Fig. 2. Number of BNMN cells induced by STX (0.38, 0.75, 1.50, 3.00 nM) in N2A and Vero cells in 24h of exposition. Colchicin was employed as a positive control. Results are expressed as mean of three experiments values \pm standard deviation (n = 3).

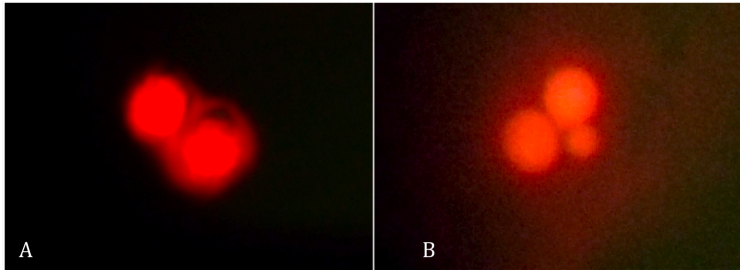


Fig. 3: Image of N2A cell stained (Magnification: 1000x) A: control BN cell; B: BNMN cell.

**A11. ARTIGO 4: SERÁ SUBMETIDO À REVISTA CIENTÍFICA
*SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT***

**ESTUDO DO USO DE QUITINA E CONCHA DE OSTRAS
COMO MATRIZES ADSORVENTES PARA REMOÇÃO
DE SAXITOXINA DE SOLUÇÃO AQUOSA**

Silvia P. Melegari, Cátia R. S. Carvalho Pinto, William G. Matias*

Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC - Brasil.

*Autor correspondente: Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC - Brasil - Tel.: +55 48 37217742 - Fax: +55 48 37219823.
E-mail address: will@ens.ufsc.br (W.G. Matias).

Resumo: Este estudo avaliou a capacidade de adsorção dos materiais de origem natural quitina e concha de ostra (OSP) na remoção da saxitoxina (STX) de soluções aquosa. Em tubos contendo o adsorvente, adicionou-se solução com concentrações conhecidas de STX em pH 5,0 e 7,0, à 25°C sob agitação orbital (200 RPM). Para as isotermas de adsorção foram avaliados em 48h, diferentes concentrações de STX (2-16 µg.L⁻¹). Para as cinéticas de adsorção foram avaliados diferentes tempos de contato (0-4320 min) concentrações de STX (10 µg.L⁻¹). As frações amostrais foram filtradas em membrana de 0,20µm e analisadas em HPLC, para a quantificação da STX remanescente em solução. Observou-se que a quitina e OSP exibiram boa capacidade de remoção da STX de soluções aquosa dentro dos limites de concentração estudados. A quitina e OSP demonstraram serem adsorventes baratos e com boa capacidade de remoção da STX de soluções aquosa (>50% em 1080min), dentro dos limites de concentração estudados. A taxa de remoção de STX pelos adsorventes diminui com o tempo de contato, possivelmente pela saturação dos sítios adsorventes, sugerindo

que a adsorção ocorra por mecanismos de troca iônica. Verificou-se que o equilíbrio de adsorção é influenciado pelo pH do meio, sendo desfavorecido em pH ácido. As características da quitina e OSP foram consistentes com o modelo de adsorção clássico da isoterma Linear e de Freundlich, com coeficientes de adsorção que variaram de 40,5-64,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a quitina, e de 46,6-52,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para OSP. Estudos cinéticos e termodinâmicos revelaram que o processo de adsorção é espontâneo e favorável, e tende a seguir cinéticas de pseudo-segunda ordem ($R^2=0.9015-0.9734$).

Palavras-chave: saxitoxina, quitina, concha de ostra, adsorção.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento excessivo de cianobactérias em reservatórios de água potável é um problema cada vez mais comum associado com a eutrofização existem diferentes alternativas de tratamento numa estação de tratamento de água (ETA) no que concerne à remoção destas cianobactérias e cianotoxinas (Chow et al. 1999). Quando ocorre a lise das células de cianobactérias por causas naturais ou por uso de algicidas, são liberadas as cianotoxinas, passando a haver essencialmente toxinas solúveis (Jones & Negri, 1997; Chow et al. 1999). Neste caso, precisam existir processos de tratamento que consigam assegurar a sua eficiente remoção. Existem processos capazes de removerem compostos orgânicos solúveis, tais como ozônio, carvão ativado, nanofiltração ou osmose inversa, biodegradação, entre outros, que vem sendo testados e otimizados (Chow et al., 1999; Sens et al., 2005; Amorim, 2007; Coral et al, 2011).

São grandes as evidências do bom desempenho para a utilização de elevadas dosagens de carvão ativado em pó, mas este processo se torna lento e caro devido às grandes quantidades de carvão que precisam ser empregadas (Keijola et al. 1988; Himberg et al. 1989). Diferentes alternativas de remoção de cianotoxinas já vêm sendo testadas por adsorção (Miller et al., 2001; Miller et al. 2005; Burns et al. 2009), porém dada à escassez de informação ainda existente, a utilização de filtros com materiais alternativos para a remoção de saxitoxina (STX) ainda é um assunto novo e pouco explorado. Outra tecnologia que

vem sendo muito utilizada na atualidade para a remoção de cianotoxinas da água são os nanotubos de carbono, que apresentam maior capacidade de adsorção em comparação ao carvão ativado e outros adsorventes convencionais, como p.e. argila mineral (Upadhyayula et al. 2009) porém esta tecnologia ainda não foi amplamente testada toxicologicamente.

Com objetivo de estudar a eficiência adsorptiva de materiais de baixo custo, este estudo avaliou a capacidade de adsorção dos materiais de origem natural concha de ostra e quitina na remoção de saxitoxina (STX) de soluções aquosas.

Conchas de moluscos bivalves, em especial as de ostras, consistem preferencialmente de aragonita, que é uma modificação mineral do carbonato de cálcio. O carbonato de cálcio (CaCO_3) apresenta-se em três modificações minerais, sendo que a calcita é um dos minerais mais comuns, sendo o constituinte principal de vastas formações de rochas sedimentares de calcário (Blessner & Rodrigues, 2008). A ocorrência de aragonita está vinculada a determinadas circunstâncias físico-químicas durante sua formação. O terceiro polimorfo, a vaterita, é um mineral bem mais escasso (Blessner e Rodrigues, 2008). A aragonita tem um arranjo atômico mais compacto do que a calcita, sendo o mineral formador das conchas, pérolas e corais. Estes carbonatos de cálcio biogênicos são importantes contribuintes na remoção de fosfatos (Park and Polprasert, 2008a; Park and Polprasert, 2008b) e metais pesados (Hsu, 2009; Blais et al. 2003) de águas, sendo que a aragonita oferece maior superfície ativa, e maiores sítios adsorventes ativos que a calcita. A capacidade de adsorção da aragonita é em torno de 20 vezes maior que a da calcita, baseado no nº de moles de fosfato adsorvido por grama de partícula (Millero et al., 2001).

A quitina é um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-dioxi-D-glicopiranosose, que são interligadas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A quitina é um material de fontes naturais renováveis, biodegradável, não-tóxico, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. As principais fontes para a obtenção de quitina em laboratório são os exoesqueletos de vários crustáceos, como caranguejos e camarões

(Azevedo et al. 2007; Dutta et al. 2002; Teng et al. 2001; Kumar, 2000; Peter, 1995; Rathke and Hudson, 1994). A quitina está fortemente associada com proteínas, material inorgânico, pigmentos e lipídios (Dutta et al. 2002; Kumar, 2000). Várias condições são usadas para remover essas impurezas e ainda não existe um processo padrão. Para isolar a quitina pode-se seguir as etapas de desproteínização, desmineralização e despigmentação (Azevedo et al. 2007).

As carapaças de crustáceos e as conchas de moluscos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos são considerados poluentes. Sua reutilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (Goosen, 1996; Azevedo et al., 2007). A reutilização dessas substâncias é muito relevante do ponto de vista ambiental e econômico, porque além de eliminar os resíduos da indústria pesqueira, o custo final de produção é reduzido em cerca de 60% (Mathur & Narang, 1990). Geralmente estes materiais são empregados em estudos de adsorção dos mais diversos metais pesados de soluções aquosas: Cu(II), Zn(II), Cr(VI), Cd(II), Pb(II) (Kitano et al. 1976; Solodovnik, 2006; Odoemlam et al., 2009).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais Adsorventes

A quitina foi produzida a partir de carapaças de camarão e foi fornecida pelo Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) da Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil, sob a coordenação do Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira. A quitina bruta foi previamente triturada e passada em peneiras de 18Mesh para apresentar partículas de tamanho $\leq 1,0\text{mm}$. O pó de ostra foi produzido a partir de cascas de ostras calcinadas (600°C) e trituradas. O pó de concha de ostra (OSP – MundoVerde®) empregado foi comercializado em casas de produtos naturais, e já apresentava partículas de tamanho $\leq 1,0\text{mm}$, não necessitando de preparação prévia. Os materiais adsorventes foram previamente seco em estufa a 105°C por 24

horas, foram colocados em tubos de centrífuga tipo “Falcon” nas respectivas massas avaliadas, e foram esterilizados em autoclave por 15 minutos à 121°C para eliminar a interferência por degradação microbiológica.

2.2. Ensaios de Adsorção

A cinética de adsorção foi realizada para 200mg do adsorvente com 10mL de uma solução de STX 10µg/L preparado nos pH 5,0 e 7,0. Os tempos de mistura avaliados nos ensaios em triplicata foram 0, 720, 1080, 1440, 2160, 2880, 3600, 4320 min, com amostragem de 0,5mL nos respectivos intervalos de tempo à 25°C.

O método usado para avaliar o processo de adsorção foi baseado em Miller et al. (2001) e Ohe (1996). Foram adicionados 10mL de solução contendo STX 2-16µg/L, nos pH 5,0 e 7,0, aos tubos contendo o adsorvente previamente pesado (200±5mg). Em seguida, os frascos foram colocados em um agitador orbital (Shaker) a 200rpm por 48h à 25°C. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas.

Ambas as frações amostrais foram filtradas em membrana de 0,20µm e coletadas num tubo de microcentrífuga. Na sequência, as frações foram analisadas em HPLC, para a quantificação da STX. Um grupo controle foi avaliado nas mesmas condições das amostras, na ausência dos adsorventes, contendo apenas 10mL das soluções de STX 10µg/L nos pH 5,0 e 7,0 em um tubo estéril, para avaliar a presença do efeito de degradação da toxina por vias químicas, enzimática ou microbiológicas.

2.3. Análise da saxitoxina

A STX certificada foi obtida no Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada). A derivatização e quantificação da STX foi adaptada da metodologia recomendada pela AOAC (2005). A STX foi derivatizada pré-coluna, em bancada, pelo método de oxidação com peróxido, que consistiu em adicionar e agitar 25µL de uma solução aquosa de H₂O₂ 10% (m:v) em 250µL de NaOH 1M em um tubo de microcentrífuga.

Adicionou-se então 100µL da solução contendo a STX, agitou-se e deixou-se reagir por 2 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 20µL de ácido acético concentrado e misturou, e esta solução está pronta para ser quantificada. A STX derivatizada foi quantificada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando o método de calibração externa. O padrão e as amostras derivatizados foram injetadas (50µL) em uma coluna C18 Supelco Discovery®(250x4,0 mm d.i., ø 5µm). O HPLC operou em condições de gradiente de eluente, empregando como eluente A uma solução tamponada de formiato de amônio 0,1M, pH 6,0 e eluente B acetonitrila grau HPLC. A corrida cromatográfica foi de 15 minutos, e o gradiente consistiu de: 0-1% de B nos primeiros 5 minutos, 1-4% de B nos próximos 3 minutos, 4% de B nos próximos 5 minutos, e 4-0% de B nos últimos 2 minutos, com 3 minutos de estabilização pós-corrida antes da próxima injeção. O fluxo do eluente foi de 1mL/min. O detector empregado foi o de fluorescência com excitação em 340nm e emissão em 390nm.

2.4. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média com o desvio padrão de três réplicas. A análise de regressão - fator de correlação (R^2) e equação da reta - foi realizada pelo software Origin®. Uma diferença de $p < 0.05$ foi considerada como aceitável para os dados das isotermas e cinéticas de adsorção.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da concentração e o tempo de contato

A STX aquosa foi removida da solução quando em contato com os adsorventes testados (Fig. 1) e os ensaios de adsorção da STX ao longo do tempo de mistura para os pH empregados para a quitina e OSP apresentaram uma significativa remoção (>50% remoção) em ambos os casos testados em 1080min (18h) de tempo de contato. No experimento controle, apenas com a STX sem adsorvente, não foi observado alteração da concentração da toxina ao longo dos tempos de contato do teste. Este fato

comprova a que houve reação de adsorção nos experimentos com a presença das matrizes adsorventes estudadas.

A taxa de remoção de STX pelos adsorventes diminui com o tempo de contato, possivelmente pela saturação dos sítios adsorventes. Esse comportamento sugere que a adsorção neste caso pode ocorrer por mecanismos de troca iônica. Essa saturação dos sítios adsorventes pode estar associada também à presença de fosfato em solução provenientes do tampão empregado, especialmente para o caso da OSP. A troca iônica entre os íons dos tampões e os adsorventes foi relatada por outros autores (Miller et al. 2001; Burns et al. 2008). O emprego do tampão para esses ensaios de adsorção foi importante para garantir a estabilidade do pH, uma vez que a presença desses adsorventes em solução aquosa (principalmente OSP – Blais et al., 2003) altera notavelmente o pH do meio para valores superiores à 6,0. Para o pH 7,0, após 2880min (48h) de tempo de contato foi observado que a concentração da STX em solução tendeu a estabilizar, provavelmente atingindo a capacidade de adsorção, no equilíbrio entre adsorvente e adsorvato. Esse equilíbrio de adsorção para ambos os adsorventes em pH 5 não foi observado após 4320 min (72h) de tempo de contato. O pH parece ser o provável interferente para que se atinja o equilíbrio neste caso, favorecendo mecanismo de dessorção (REF.) e ainda possível perda da massa dos adsorventes por mecanismos de solubilização dos mesmos em pH de caráter ácido (Sephtum et al. 2007)..

3.2 Considerações sobre Isotermas de Adsorção

Os dados obtidos no equilíbrio ($t = 4320\text{min}$) foram avaliados em três diferentes modelos de isotermas que podem descrever o mecanismo de adsorção neste estudo: o modelo linear (Eq. 1), o modelo de Langmuir (Eq. 2) e o modelo de Freundlich (Eq. 3), sendo a isoterma de Freundlich vêm sendo atualmente a mais adotada para a determinação da adsorção das cianotoxinas em sedimentos (Miller et al., 2001). A quantidade de STX adsorvida (μg) por kg de adsorvente foi quantificada a partir da concentração remanescente em solução, e o coeficiente de adsorção foi calculado a partir destas isotermas de adsorção

(Miller et al., 2001; Miller et al., 2005; Schwarzenbach et al., 2003).

$$Q_e = K_d C_e \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{K_{ads} Q_m} + \frac{C_e}{Q_m} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\log Q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Eq. 3})$$

onde Q_e é quantidade em μg de STX adsorvida por kg de adsorvente ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), C_e é concentração STX na solução no tempo de mistura ($\mu\text{g.L}^{-1}$), K_d é coeficiente de distribuição linear ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), Q_m é a capacidade máxima de adsorção ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), K_{ads} é a constante de equilíbrio de adsorção, K_F é coeficiente de adsorção Freundlich ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e n é medida de não-linearidade, relacionado com a densidade de adsorção.

As equações lineares foram obtidas das isotermas de adsorção da STX, com ajustes ao modelo Linear (Fig. 2) e ao modelo de Freundlich (Fig. 3) para os adsorventes testados à 25°C. Pelo ajuste a estes modelos, pode-se obter valores do coeficiente de distribuição (K_d) e da capacidade do sítio de adsorção (K_F) apresentados na Tab. 1. Os dados não se ajustaram com boa linearidade ao modelo da isoterma de adsorção de Langmuir. Propõe-se com esse comportamento que a superfície dos adsorventes não é homogênea e sítios de adsorção não possuem mesma energia para o adsorvente, o que seria equivalente a uma adsorção em monocamada, compatível com um processo de quimissorção descrita por esse modelo (Septum et al., 2007).

Para o adsorvente quitina, em ambos os pHs testados, os modelos Linear e de Freundlich apresentaram ajustes aceitáveis, com valores de R^2 que variaram de 0,958-0,992. Os elevados valores de K_d (48,14-50,17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e K_F (40,46-64,24 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) mostram uma alta afinidade química deste adsorvente pela STX. Na Tabela 1 são apresentados ainda os valores de n de 0,90-1,18, revelando que a adsorção da STX pela quitina pode ser considerada processo químico favorável e indicado, confirmando a heterogeneidade e adequada distribuição dos sítios energéticos de adsorção.

Para o adsorvente OSP, ambos os modelos Linear e de Freundlich apresentaram melhores ajustes na condição pH 7,0, com R² que variaram de 0,992-0,995. Os elevados valores de K_d (47,31-50,65 μg.kg⁻¹) e K_F (46,65-54,70 μg.kg⁻¹) refletem uma grande afinidade deste adsorvente pela STX. Os valores de n de 0,98-1,05 mostram que o processo de adsorção da STX a este adsorvente pode também ser considerado favorável. Para pH 5,0, os valores de R² variaram de 0.869-0.873. Neste caso, o ajuste aos modelos aplicados pode ter sido influenciado pela relação entre o pH do meio e a composição deste adsorvente. A constituição do OSP é na sua maioria carbonato de cálcio (~60% conforme Hsu, 2009), que possui sua solubilidade aumentada em pHs ácidos

De acordo com a isoterma da adsorção de Freundlich, as frações de cobertura de superfície (Q_e) estão relacionadas à concentração do equilíbrio do adsorbato. A isoterma de Freundlich descreve o equilíbrio em superfícies heterogêneas e, por esta razão, não assume uma capacidade de adsorção em monocamada (Fávere et al., 2010). Esta justificativa pode explicar os bons ajustes dos materiais empregados a esse modelo, pois esses adsorventes são de origem natural e é esperado que apresentem de fato superfícies heterogêneas. Para ambos os adsorventes testados, a condição pH 7,0 se demonstrou mais favorável (R² = 0,983-0,995). Essa evidencia pode ser justificada pelo comportamento observado no ensaio de tempo de contato, onde essa condição atingiu o equilíbrio de adsorção em 2880min (48h), desempenho não observado para a condição em pH 5,0 (R² = 0.869-0.873).

3.3. Considerações Cinéticas

As cinéticas de adsorção foram analisadas pelas equações de Lagergren de pseudo-primeira-ordem (Eq. 4) e pseudo-segunda-ordem (Eq. 5) (Hsu, 2009).

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\frac{t}{Q_t} = \left[\frac{1}{k_2 Q_e^2} \right] + \left(\frac{1}{Q_e} \right) t \quad (\text{Eq. 5})$$

onde Q_t é a quantidade de material adsorvido ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) no tempo t , Q_e é a quantidade de material adsorvido no equilíbrio, k_1 é a constante (min^{-1}) do modelo de pseudo primeira ordem, e k^2 é a constante ($\text{kg}.\mu\text{g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) do modelo de pseudo segunda ordem. Para o modelo de pseudo segunda ordem, o produto $k^2Q_e^2$ é a taxa de adsorção inicial, denominado h . Os valores de h ($\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) são apresentados na Tabela 2.

As Figuras 4 e 5 apresentam as cinéticas de adsorção experimentais para a quitina e OSP ajustadas aos modelos cinéticos de pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem, respectivamente. Na tabela 2 são listados os resultados dos parâmetros obtidos usando esses modelos. O modelo de pseudo primeira ordem não apresentou bom ajuste para a quitina e para OSP ($R^2=0.7010-0.8805$), não representando muito bem a cinética de adsorção como o modelo de pseudo segunda ordem, que se obteve melhor linearidade ($R^2=0.9015-0.9734$), confirmando a natureza de pseudo segunda ordem do processo. Esse resultado confirma os resultados de Hsu (2009) para OSP testado na adsorção de metais. A máxima taxa de adsorção inicial foi verificada para a condição pH 7,0, com valores de $49.3 \times 10^4 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para a quitina e $26.8 \times 10^4 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para o OSP. Ambos os adsorventes seguiram a ordem de máxima taxa de adsorção inicial: $\text{pH}7 > \text{pH}5$.

3.3. Considerações Termodinâmicas

A energia livre de Gibbs de adsorção (ΔG_{ads}) é relatada por Odoemelam et al. (2009) de acordo com a Eq. 6.

$$\Delta G_{\text{ads}} = -2.303 R T \log K \quad (\text{Eq. 6})$$

onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura. Usando os valores de K_F calculados pela isoterma de Freundlich, os valores de ΔG_{ads} de adsorção para a STX puderam ser calculados para os adsorventes testados em ambos os pH, e são apresentados na Tab. 2.

Os valores dos ΔG_{ads} negativos indicam que a adsorção de STX nos adsorventes foi espontânea e favorável nas condições experimentais, e indicam também que o mecanismo da adsorção

química é aplicável à adsorção de STX por ambos os adsorventes testados. Estes valores podem ainda ser melhorados favorecendo uma adsorção mais efetiva, realizando combinações destes com outros adsorventes eficientes para a adsorção da STX. p.e. argilas e/ou nanomateriais (Burns et al. 2008; Upadhyayula et al. 2009), ou ainda aumentando-se a temperatura do processo (Hsu, 2009).

4. CONCLUSÕES

A quitina e OSP demonstraram serem adsorventes baratos e com boa capacidade de remoção da STX de soluções aquosa (>50% em 1080min), dentro dos limites de concentração estudados, sendo uma alternativa viável para utilização em ETA, abastecida por água de mananciais que apresentam risco de contaminação por STX. A taxa de remoção de STX pelos adsorventes diminui com o tempo de contato, possivelmente pela saturação dos sítios adsorventes, sugerindo que a adsorção ocorra por mecanismos de troca iônica. Verificou-se que o equilíbrio de adsorção é influenciado pelo pH do meio, sendo desfavorecido em pH ácido. As características da quitina e OSP foram consistentes com o modelo de adsorção clássico da isoterma Linear e de Freundlich, com coeficientes de adsorção que variaram de 40,5-64,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a quitina, e de 46,6-52,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para OSP. Estudos cinéticos e termodinâmicos revelaram que o processo de adsorção é espontâneo e favorável, e tende a seguir cinéticas de pseudo-segunda ordem ($R^2=0.9015-0.9734$).

Agradecimentos: Agradecimentos ao Prof. Dr. Mauro Cesar Marghetti Laranjeira (QUIMTECH – UFSC) pelas amostras de quitina empregadas nos ensaios de adsorção. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior - CAPES e a Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS

Amorim FF. Remoção dos contaminantes orgânicos β -estradiol e saxitoxinas (STX, NEO-STX e dc-STX) por meio de nanofiltração: avaliação em escala de bancada. Dissertação (Mestrado) - ENC/FT/UnB. Brasília. 2007: 133pp.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Official Method 2005.06: Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish – pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. First action 2005.

Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia-Fook MV, Costa ACFM. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. REMAP 2007: 2: 27-34.

Blais J.-F., Shen S., Meunier N., Tyagi R. D. Comparison of natural adsorbents for metal removal from acidic effluent. Environmental Technology 2003: 24: 205-15.

Bessler KE, Rodrigues LC. Os polímeros de carbonato de cálcio – uma síntese fácil de aragonita. Quim. Nova 2008: 31: 178-80.

Burns JM, Hall S, Ferry JL. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in fresh and saline waters. Water Res. 2008: 43: 1899-04.

Chow CWK, Drikas M, House J, Burch MD, Velzeboer RMA. The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Water Res. 1999: 33: 3253-62.

Coral LA, Proença, LAO, Bassetti F J, Lapolli FR. Nanofiltration membranes applied to the removal of saxitoxin and congeners. Desalination and Water Treatment 2011: 27: 8–17.

Dutta PK, Ravikumar MNV, Dutta J. Chitin and chitosan for versatile applications. J. Macromol. Sci.: Pol. Reviews 2002: 42 : 307-54

Fávere VT, Riella HG, Rosa S. Cloreto de n-(2-hidroxil) propil-3-trimetil amônio quitosana como adsorbente de corantes reativos em solução aquosa. Quim. Nova 2010: 15, 1-6.

Goosen MEA. Applications of chitin and chitosan, Technomic Publishing Company, Lancaster. 1996: 336pp.

Himberg K, Keijola AM, Hiisvirta L, Pyysalo H, Sivonen K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. Water Res. 1989: 23: 979-84.

Hsu T-C. Experimental assessment of adsorption of Cu²⁺ and Ni²⁺ from aqueous solution by oyster shell powder. J. Haz. Mat. 2009: 171: 995-1000.

Jones GJ, Negri AP. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. Water Res. 1997: 31: 525-33.

Keijola AM, Himberg K, Esala AL, Sivonen K, Hiisvirta L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot scale experiments. Toxic Assess Int J 1988: 3: 643-56.

Kitano Y, Kanamori N, Yoshioka S. Adsorption of zinc and copper ions on calcite and aragonite and its influence on the transformation of aragonite to calcite. Geochemical J. 1976:10: 175-79.

Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. Reactive Func. Polymers. 2000: 46: 1-27.

Mathur NK, Narang K. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. *J. Chem. Educ.* 1990: 67, 11.

Miller MJ, Critchley MM, Hutson J, Fallowfield HJ. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Water Res.* 2001: 35: 1461-68.

Miller MJ, Hutson J, Fallowfield HJ. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins as a function of soil properties. *J. Water Health* 2005: 3: 339-47.

Millero F, Huang F, Zhu X, Liu X, Zhang J. Adsorption and desorption of phosphate on calcite and aragonite in seawater. *Aquatic Geochemistry* 2001: 7: 33-56.

Odoemelam SA, Eddy NO. Studies on the use of oyster, snail and periwinkle shells as adsorbents for the removal of Pb²⁺ from aqueous solution. *e-J.Chem.* 2009: 6: 213-22.

Ohe T. Antigenotoxic activities of chitin and chitosan as assayed by sister chromatid exchange. *The Science of the Total Environment* 1996: 181: 1-5.

Orr PT, Jones GJ, Hamilton GR. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide - implications for compliance with the Australian drinking water guidelines, *Water Res.* 2004:38:4455-61.

Park WH, Polprasert C. Phosphorus adsorption characteristics of oyster shells and alum sludge and their application for nutrient control in constructed wetland system. *J. Environm. Sci. Health A* 2008a: 43: 511-17.

Park WH, Polprasert C. Roles of oyster shells in an integrated constructed wetland system designed for P removal. *Ecol. Engineering*, 2008b: 34: 50-6.

Peter MG. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J Macromol Sci: Pure Appl. Chem.* 1995: 4: 629-40.

Rathke TD, Hudson SM. Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Formers. *J Macromol Sci: Pol. Reviews* 1994 :34: 375-437

Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. *Environmental Organic Chemistry*, 2 Edição, USA, 2003. 275 – 330 pp.

Sens ML, Melo Filho LC, Mondardo RI, Proença LAO. Ozonização: uma alternativa para o tratamento de água com cianobactérias. *Rev. Ciên. Tecnol.* 2005:13: 47-54.

Solodovnik T. Application of chitin containing sorbents fortreatment of water solutions. In: Loureiro JM, Kartel MT (eds.), *Combined and Hybrid Adsorbents*, Springer-London, (2006) 275-280 pp.

(Solodovnik, 2006 #991)Teng, L. W.; Khor, E.; Tan, T. K.; Lim, L. Y.; Tan, S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*, v.332, p.305-316, 2001.

Upadhyayula VKK, Deng S, Mitchell MC, Smith GB. Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. *Sci Total Environm* 2009: 408: 1-13.

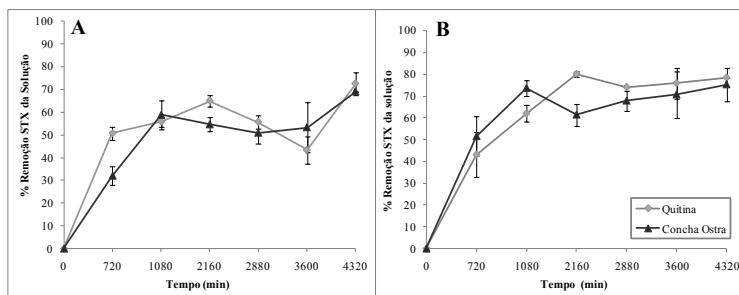


Fig. 1: Processo de remoção da STX da solução aquosa por adsorção à quitina e pó de concha em diferentes tempos de contato, à temperatura constante (25°C), em (A) pH 5,0 e (B) pH 7,0.

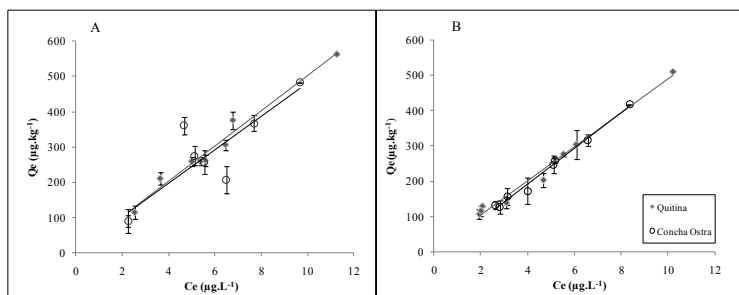


Fig. 2: Isotermas de adsorção linear para STX em quitina e em pó de concha de ostra à 25°C em (A) pH 5,0 ($p < 0.05$), e (B) pH 7,0 ($p < 0.05$)

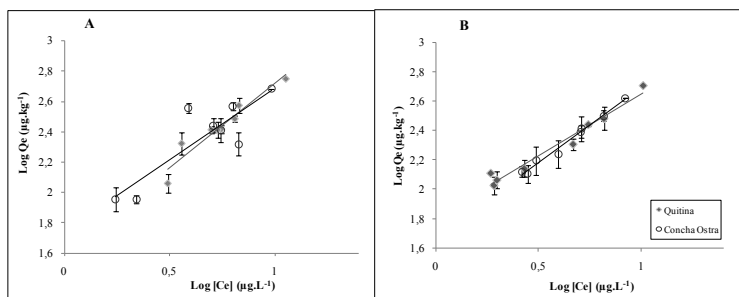


Fig. 3: Isotermas de adsorção de Freundlich para STX em quitina e em pó de concha de ostra à 25°C em (A) pH 5,0 ($p < 0.05$), e (B) pH 7,0 ($p < 0.05$).

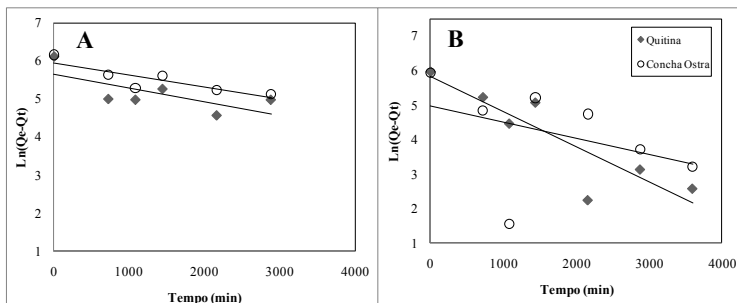


Fig. 4: Gráficos da equação de Lagergren de pseudo primeira-ordem de adsorção da STX em (A) pH 5,0 ($p < 0.05$) e (B) pH 7,0 ($p < 0.05$) nos diferentes adsorventes testados à 25°C.

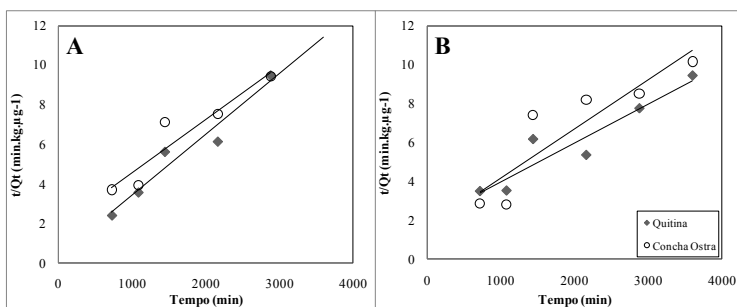


Fig. 5: Gráficos da equação de Lagergren de pseudo segunda-ordem de adsorção da STX em (A) pH 5,0 e (B) pH 7,0 nos diferentes adsorventes testados à 25°C.

Tab. 1: Parâmetros obtidos pelas isotermas de adsorção da STX nas diferentes condições analisadas.

<i>Adsorventes</i>	<i>pH</i>	<i>Modelo Linear</i>		<i>Modelo de Freundlich</i>		
		$K_d(\mu\text{g.kg}^{-1})$	R^2	n	$K_F(\mu\text{g.kg}^{-1})$	R^2
Quitina	5.0	50.17	0.987	0.90	40.46	0.958
	7.0	48.14	0.992	1.18	64.24	0.983
Concha Ostra	5.0	47.31	0.873	1.05	54,70	0.869
	7.0	50.65	0.995	0.98	46.65	0.992

Tab. 2: Parâmetros cinéticos para a adsorção da STX à quitina e à OSP, em pHs 5,0 e 7,0, à 25°C.

<i>Adsorventes</i>	<i>pH</i>	<i>Pseudo-1ª. ordem</i>		<i>Pseudo-2ª. ordem</i>			
		$k_1(\text{min}^{-1})$	R^2	$Q_e(\mu\text{g.kg}^{-1})$	$h(\mu\text{g.kg}^{-1}\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{kg.mg}^{-1}\text{min}^{-1})$	R^2
Quitina	5.0	3.55×10^{-4}	0.7015	326.80	3.96×10^4	0.25×10^{-6}	0.9734
	7.0	10.2×10^{-4}	0.8830	500.00	49.4×10^4	2.03×10^{-6}	0.9433
Concha Ostra	5.0	3.22×10^{-4}	0.8700	370.37	$25,8 \times 10^4$	2.22×10^{-6}	0.9428
	7.0	6.96×10^{-4}	0.8805	400.00	26.8×10^4	3.72×10^{-6}	0.9015

Tab. 3: Valores de ΔG_{ads} para a STX para os adsorventes testados nos pH 5,0 e 7,0.

<i>Adsorventes</i>	<i>pH</i>	$\Delta G_{\text{ads}}(\text{kJ.mol}^{-1})$
Quitina	5.0	-9,182
	7.0	-10,324
Concha Ostra	5.0	-9,843
	7.0	-9,530