



Prospecção de atividades toxicológicas e farmacológicas em cepas de cianobactérias da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica

Geanne Alexandra Alves Conserva⁽¹⁾, Célia L. Sant'Anna⁽¹⁾, Caio C. N. Cambui⁽²⁾, Rafael L. Brunetti⁽²⁾, Marisa Rangel⁽²⁾, Luce M. B. Torres⁽³⁾, Cláudia Marx Young⁽³⁾, Luciana Retz de Carvalho⁽¹⁾

⁽¹⁾Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, geanne_conserva@terra.com.br;

⁽²⁾Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantã; ⁽³⁾Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica

Resumo: Cianobactérias são organismos procariontes, fotossintetizantes, com grande importância ecológica, especialmente nos ciclos globais do carbono e nitrogênio. São capazes de produzir metabólitos com atividades biológicas, dentre os quais as cianotoxinas, as quais abrangem as microcistinas (hepatotoxinas), saxitoxinas e as anatoxinas (neurotoxinas). A triagem em desenvolvimento na Coleção de Cultura de Cianobactérias (Ficologia) prospecta não só as cianotoxinas conhecidas como também novas substâncias ativas tóxicas e com potencial efeito terapêutico. As linhagens estudadas foram: *Lyngbya* sp. CCIBt 3200, *Microcystis panniformis* CCIBt 3209, *Rhabdoderma* sp. CCIBt 3168, *Geitlerinema splendidum* CCIBt 3223, *G. amphibium* CCIBt 3231, Coccoide CCIBt 3244, *Phormidiaceae* CCIBt 3253 e *Nostoc* sp. CCIBt 3259. Da biomassa de cada cepa estudada, foram feitos extratos metanólico e em ácido acético, os quais foram empregados em todos os ensaios. A identificação de cianotoxinas conhecidas foram feita por Cromatografia Planar e a detecção de novas toxinas, por bioensaio em camundongo (OMS); a prospecção de substâncias com ação anticolinesterásica e antifúngica, por bioautografia. No extrato metanólico e em ácido acético da *M. panniformis* foi detectada a presença de microcistina; o extrato em ácido acético da *G. splendidum* apresentou toxicidade aguda, o extrato em ácido acético de *G. amphibium*, intensa ação anestésica, no bioensaio em camundongo. Os resultados para a presença de fungitóxicos foram negativos, porém os extratos metanólicos da *G. splendidum* e *G. amphibium* e os extratos em ácido acético da *Rhabdoderma* sp. e *Phormidiaceae* apresentaram resultados positivos para ação anticolinesterásica.

Palavras-Chave: Cianotoxinas, hepatotoxinas, neurotoxinas, anticolinesterásicos.

INTRODUÇÃO

As cianobactérias, são organismos procariontes e fotossintetizantes, são reconhecidas prolíficas e produtoras de metabólitos secundários. Grande parte desses metabólitos são peptídeos e depsipeptídeos que apresentam aminoácidos raros ou que formam híbridos pela incorporação de porções de policetídeos (DITTMANN *et al.*, 2001). Os resultados dessa diversidade de novas estruturas são potentes atividades biológicas: hepatotoxicidade, neurotoxicidade, citotoxicidade e propriedades anti-enzimática, anti-viral, bactericida, antitumoral, antifúngica (YAMAKI *et al.*, 2005; SETHUBATHI & PRABU, 2010).

Entretanto, as mais conhecidas dessas substâncias ativas são as toxinas, que foram agrupadas por sua ação em mamíferos, em hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (CARVALHO, 2008).

Cianobactérias tóxicas em reservatórios públicos de água podem causar problemas graves de saúde tanto para os seres humanos quanto para os animais. O desenvolvimento desses organismos decorre da contaminação e da degradação das águas nesses ambientes, que é motivo de preocupação para a sociedade (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os potenciais toxicológicos e farmacológicos de cepas selecionadas da Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt).

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas escolhidas para o desenvolvimento deste projeto foram: *Lyngbya* sp. CCIBt 3200 (pesqueiro, SP), *Microcystis panniformis* CCIBt 3209 (pesqueiro, SP) *Rhabdoderma* sp. CCIBt 3168 (Taquacetuba / Billins, SP), *Geitlerinema splendidum* CCIBt 3223 (Represa Guarapiranga, SP), *G. amphibium* CCIBt 3231 (Represa Billins, SP), Coccoide CCIBt 3244, *Phormidiaceae* CCIBt 3253 (Bromélia /Ibt) e *Nostoc* sp. CCIBt 3259 (IBt, SP).

Produção de biomassa

Inóculos de cada linhagem foram cultivados no meio ASM-1 (STANIER *et al.*, 1971) esterilizados, sob as seguintes condições: temperatura de 23 ± 1 °C, irradiância $40\text{-}50 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 14-10h claro-escuro (AZEVEDO & SANT'ANNA, 2003). Após o desenvolvimento das cepas, as células foram separadas por centrifugação e congeladas a -20 °C.

Preparo das amostras

As biomassas congeladas foram liofilizadas e divididas em duas porções; ambas foram submetidas a extração assistida por ultrassom: a primeira, com metanol 100% e a segunda, com ácido acético 0,1 M (4 x 10 sec., 50 W). Os extratos foram centrifugados (1.750 x g, 50 min) e os sobrenadantes foram evaporados, sob pressão reduzida (FASTNER *et al.*, 1998).

Prospecção de cianotoxinas conhecidas por Cromatografia Planar.

1 mg de cada um dos extratos de cada cepa foram aplicados a três placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF₂₅₄, (E.Merck). Duas das placas foram desenvolvidas com a fase móvel clorofórmio/metanol/água - 64:36:8, v/v/v e a terceira, com o sistema de solventes butanol/ácido acético/água 5:4:1 (v/v/v). Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram secas, observadas sob luz UV (comprimento de onda 254 e 366 nm) e derivatizadas sendo a primeira com tetrametil benzidina, para a detecção de microcistinas, de acordo com PELANDER *et al.* (2000); a segunda, com peróxido de hidrogênio, para a detecção de saxitoxinas, segundo BUCKLEY *et al.*, (1976) e a terceira, com ninidrina, como descrito no MERCK (1971), para detecção do β -metilaminoalanina (BMAA).

Prospecção de antifúngicos e anticolinesterásicos

10 mg de cada um dos extratos de cada cepa, foram submetidas a duas placas cromatográficas e desenvolvidas nas mesmas condições estabelecidas para a pesquisa de cianotoxinas. Uma das placas foi submetida à bioautografia para detecção de substâncias portadoras de atividade anticolinesterásica, segundo RHEE *et al.* (2001) e a outra, para pesquisa de substâncias com atividade antifúngica, de acordo com HOMANS & FUCHS (1970).

Prospecção de novas cianotoxinas.

Quantidades equivalentes a 20 mg de células cianobacterianas liofilizadas, foram administradas, por via intraperitoneal, em camundongos machos “Swiss-Webster”, pesando de 19 a 21 g (n=3) (HARADA, 1999). Os animais foram observados por uma semana; os sintomas de intoxicação e tempo de sobrevida foram anotados, e os animais mortos foram submetidos a exames “post- mortem”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção de cianotoxinas conhecidas por Cromatografia Planar.

Seis cepas (CCIBt 3209, CCIBt 3200, CCIBt 3244, CCIBt 3259, CCIBt 3223 e CCIBt 3231) são produtoras da neurotoxina β -metilaminoalanina (Figura 1a) (COX *et al.*, 2005). A cepa CCIBt 3209 apresentou resultado positivo para a presença de microcistinas (Figura 1b). Nenhuma outra toxina conhecida foi detectada.

Prospecção de metabólitos secundários com atividade antifúngica e anticolinesterásica

Os extratos metanólico de CCIBt 3223 e 3231 e os em ácido acético 0,1M de CCIBt 3168 e 3253 apresentaram resultados positivos, na detecção de anticolinesterásicos (Figura 2).

Prospecção de novas cianotoxinas.

Esses estudos foram realizados nas cepas que apresentaram resultados negativos para a detecção das cianotoxinas de efeito agudo, já conhecidas. As observações feitas durante esses ensaios estão compiladas na Tabela 1. Os órgãos dos animais que receberam a cepa CCIBt 3232 foram submetidos a estudos histológicos, que evidenciaram congestão nos pulmões, dutos das regiões distal e cortical dos rins com paredes destruídas e núcleos picnóticos no lúmen e fígado hemorrágico. A análise destes dados mostra que a cepa *G. splendidum* CCIBt 3223 sintetiza uma toxina de efeito agudo ainda desconhecida, porém causadora de sinais de intoxicação e lesões post-mortem semelhantes aos apresentados por *G. amphibium* CCIBt 3213, sendo os pulmões, os órgãos alvo da intoxicação (DOGO, 2011). A cepa *G. amphibium* CCIBt 3231 não apresentou efeito letal agudo, porém causou o mesmo tipo de lesão pulmonar observado para as outras espécies de *Geitlerinemas* estudadas.

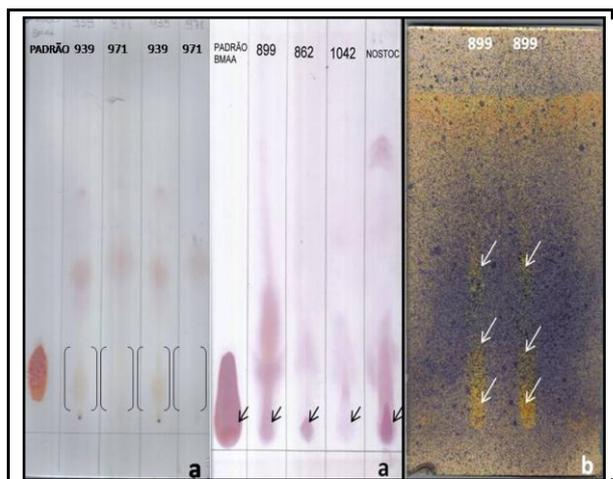


Figura 1 – 1a- Cromatograma de CCIBt 3223, 3231, 3209, 3244 e 3259; as setas apontam as manchas com Rf correspondente ao Rf do padrão do BMAA; 1b - Cromatograma do extrato em ácido acético da cepa CCIBt 3209; as setas apontam as manchas de microcistinas.

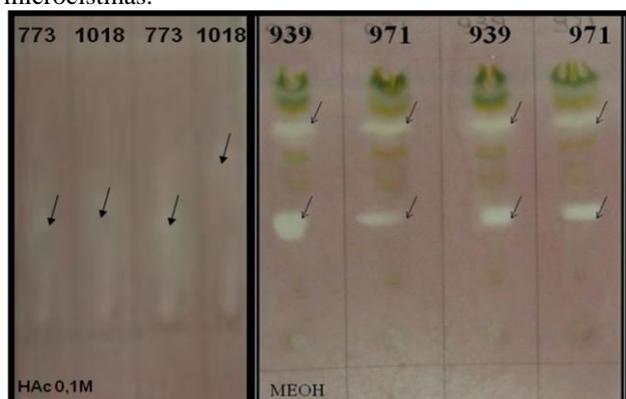


Figura 2 - Bioautografia em sílica de gel dos extratos metanolicos de CCIBt 3223 e 3231 e do extrato ácido acético 0,1M de CCIBt 3253 e 3168. As setas indicam os inibidores da acetilcolinesterase.

CONCLUSÕES

Das 08 cepas estudadas, 87,5% apresentaram efeitos deletérios para mamíferos, 12,5% apresentaram toxinas de efeito agudo, 75% apresentaram resultados positivos para BMAA causador de doenças neurodegenerativas crônicas

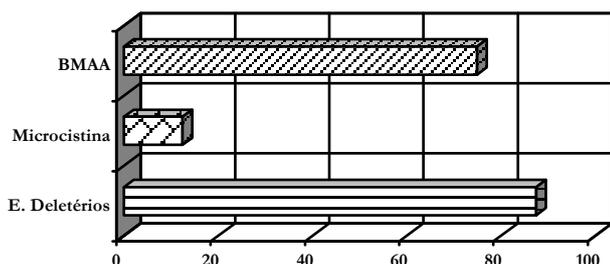


Figura 3. Gráfico consta resultados em (%) para as atividades biológicas encontradas.

AGRADECIMENTO: CNPq / PIBIC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, S. M. F. O., CARMICHAEL, W. W., JOCHIMSEN, E. M., RINEHART, K. L., LAU, S., SHAW G. R. & EAGLESHAM, G. K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology* 181/182: 441-446.
- AZEVEDO, M.T.P. & SANT'ANNA, C.L. 2003. *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* 109:79-92.
- BUCKLEY, L.J., IKAWA, M. & SASNER, J.J. 1976. Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(1): 107-110.
- CARVALHO, L.R., HARAGUCHI, M. & GÓRNIK, S.L. 2008. Intoxicação produzida por algas de água doce. In: H.S. Spinoza, S.L. Górnika & J. Palermo-Neto (eds.). *Toxicologia aplicada á Medicina Veterinária*. 621-640.
- COX, P. A., BANACK, S. A., MURCH, S. J., RASMUSSEN, U., TIEN, G., BIDIGARE, R. R., METCAFF, J. S., MORRISON, L. F., CODD, G. A. & BERGMAN, B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(14): 5074-5078.
- DITTMANN, E., NEILAN, B.A. & BORNER, T. 2001. Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(40): 467- 473.
- DOGO C.R, BRUNI F. M, ELIAS F., RANGEL M., PANTOJA P.A., SANT'ANNA C.L., LIMA C., FERREIRA M.L., CARVALHO L.R., 2011. Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. *Toxicon*, DOI information: 10.1016/j.toxicon.2011.07.010.
- FASTNER, J., ERHARD, M. & VON DOHREN, H. 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5069-5076.
- HARADA, K.-I., KONDO, F. & LAWTON, L. 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus & J. Bartram (eds.). E & FN SPON, New York, 369-405.
- HOMANS, A. L. & FUCHS, A. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* 51: 327-329.

- PELANDER, A., OJANPERÄ, I., LAHTI, K., NIINIVAARA, K. & VUORI, E. 2000. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Research* 34: 2643-2652.
- RHEE, K., MEENT, M. VAN DE, INKANINAN, K. AND VEERPORTE, R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A* 915: 217 - 223.
- SETHUBATHI, C.V.B. & PRABU, V.A. 2010. Antibacterial Activity of Cyanobacterial Species from Adirampattinam Coast, Southeast Coast of Palk Bay. *Current Research Journal of Biological Sciences* 2(1): 24-26.
- STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., COHEN-BAZIRE, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35: 171-205.
- YAMAKI, H., SITACHITTA, N., SANO, T. & KAYA, K. 2005. Two new chymotrypsin inhibitors isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-88. *Journal of Natural Products*. 68: 14-18.

Tabela 1: Compilação dos sinais de intoxicação, tempo decorrido até o óbito e alterações macroscópicas apresentadas pelos camundongos após administração i.p. dos extratos das cepas em estudo.

<i>Cepas</i>	<i>Sinais de intoxicação</i>	<i>Principais achados post-mortem*</i>
<i>Lyngbya sp. CCIBt 3200</i> Extrato ac. acético 0,1M	Andar cambaleante, dispnéia, prostração, arrepiados e olhos fechados.	Manchas brancas no fígado em n=2
<i>Lyngbya sp. CCIBt 3200</i> Extrato metanólico 100%	Coceira.	Presença de manchas brancas no fígado em n=2
<i>Cocóide CCIBt 3244</i> Extrato ac. acético 0,1M	Andar cambaleante, dispnéia.	Manchas brancas no fígado em n=2
<i>Cocóide CCIBt 3244</i> Extrato metanólico 100%	Dispnéia, dificuldades de locomoção.	Sem alterações macroscópicas aparentes
<i>Nostoc CCIBt 3259</i> Extrato ac. acético 0,1M	Andar cambaleante, redução da atividade motora, dispnéia.	Sem alterações macroscópicas aparentes
<i>Nostoc CCIBt 3259</i> Extrato metanólico 100%	Arrepiados	Sem alterações macroscópicas aparentes
<i>G. splendidum CCIBt 3223</i> Extrato ac. acético 0,1M	Dispnéia, andar cambaleante e prostração e óbito após 2 horas da administração	Sem alterações macroscópicas aparentes
<i>G. splendidum CCIBt 3223</i> Extrato metanólico	Contração abdominal, dificuldade de locomoção, agitação.	Focos hemorrágico no pulmão; manchas negras no fígado
<i>G. amphibium CCIBt 3231</i> Extrato ac. acético 0,1M	Dispnéia, sem reflexos, dificuldades de locomoção levando a parálisia	Fígado com coloração alterada (escura), pulmões com coloração alterada
<i>G. amphibium CCIBt 3231</i> Extrato metanólico	Dispnéia, arrepiados, contração abdominal.	Pulmão esquerdo com coloração alterada; pulmão direito com foco hemorrágico.
<i>Rabdoderma sp CCIBt 3168</i> Extrato ac. acético 0,1M	Pelo arrepiado, micção exagerada e posterior prostração	Sem alterações macroscópicas aparentes
<i>Rabdoderma sp CCIBt 3168</i> Extrato metanólico	Agitação, contração abdominal, pelo arrepiado, respiração ofegante.	Foco hemorrágico nos pulmões
<i>Phormidiaceae CCIBt 3253</i> Extrato ac. acético 0,1M	Forte contrações abdominais, paralisada do trem posterior; pelo arrepiado.	Foco hemorrágico nos pulmões (n=1)
<i>Phormidiaceae CCIBt 3253</i> Extrato metanólico	Forte contração abdominal, respiração ofegante, dificuldades de locomoção.	Alterações no fígado e nos rins; coágulo no estomago

*Os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia após 7 dias.