

# Algas Tóxicas – Controle das Toxinas em Águas de abastecimento(\*)

SAMUEL MURGEL BRANCO  
Biologista do Laboratório Central do DAE

## INTRODUÇÃO

O mais antigo caso que se conhece de intoxicação de animais relacionada com uma intensa proliferação de algas na água que bebiam, foi descrito, em fevereiro de 1878 por George Francis, de Adelaide, Austrália, em carta que a revista "Nature" publicou em 2 de maio do mesmo ano. (12) Tratava-se de uma alga azul (cianofíceas) denominada *Nodularia spumigera* que, em ocasiões de mais elevada temperatura reproduzia-se com grande intensidade no lago Alexandrina dando origem ao fenômeno conhecido como "floração das águas" e provocando a morte rápida do gado que as ingeria. O autor descrevia, ainda, os sintomas produzidos, que muito se assemelham aos que hoje observamos, bem como o tempo que levavam os animais para morrer: cavalos, oito a vinte e quatro horas; cães, quatro a cinco horas; porcos, três a quatro horas, carneiros uma a seis ou oito horas. O estudo das algas tóxicas, neste mesmo lago, foi repetido por Ivan Ophel, em 1940 a 1950 confirmando, de um modo geral, as observações feitas em 1878.

Durante os 81 anos que nos separam da comunicação de Francis, multiplicaram-se os casos de intoxicações produzidas por águas contendo cianofíceas deste e de outros gêneros, podendo ser citados, a título de exemplo, os sucedidos em Fergus Falls, Minnesota, em 1900; Winnipeg, Lake Michigan, 1914; Frazer Lake, Hastings County, Ontario, Canadá, em 1924; 5 casos em Minnesota de 1918 a 1934; Colorado (comunicado em 1939); Rio Missouri, em Montana (comunicado em 1934); Onderstepoort, Sul da África (comunicado em 1945) Lago Des Lacs, North Dakota (comunicado em 1947); Laguna Benedetti, Santa Fé, Argentina 1948. (12) Além destes, podem ser citados casos ocorridos em: Idaho, Iowa, South Dakota, Wisconsin, Alberta (EUA), Bermuda e Finlândia (13). Admite Olson que se não temos notícias muito mais frequentes de animais intoxicados por algas, é porque existe uma tendência natural dos veterinários e criadores de atribuir as perdas de gado a causas mais patentes e melhor conhecidas (12).

## CLASSIFICAÇÃO

Tôdas as algas de água doce evidenciadas como tóxicas pertencem ao grupo das *Myxophyceae*, comumente denominadas *cianofíceas*

(\*) Trabalho apresentado ao IV Seminário de Professores de Matérias Relacionadas com a Engenharia Sanitária, realizado em Porto Alegre, de 5 a 12 de Julho de 1959.

ou simplesmente "algas azuis", graças à presença, em suas células, de um pigmento de cor azul, *ficocianina*, do grupo das *ficobilinas*, associado à clorofila. Algas desse grupo, que é considerado o mais primitivo grupo de algas, são caracterizadas, entretanto, por uma coloração que pode variar do verde azulado ou azul, mesmo, até ao verde claro, amarelado, de acordo com a quantidade presente de ficocianina, ao contrário do que se poderia esperar

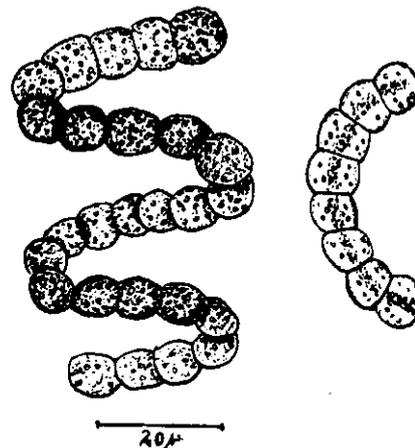


Fig. 1 — ANABAENA

em face das denominações correntes de "algas azuis" ou "verde-azuladas". São consideradas primitivas, em relação às outras algas, graças às seguintes características: a) ausência de núcleo típico, em suas células; b) ausência de *plastos*, isto é, de estruturas individualizadas para a localização da clorofila, encontrando-se, pois, os seus pigmentos, dissociados na matriz plasmática; c) ausência de qualquer forma de reprodução sexuada.

O gênero mais frequentemente citado como causador de efeitos tóxicos em águas, é o gênero *Microcystis* do qual se destacam as espécies *M. flos-aquae* e *M. aeruginosa*. Sabe-se, hoje, graças aos trabalhos de Drouet e Daily (5), que estas nada mais são do que duas formas ou duas fases distintas de uma só espécie do gênero mais antigo *Anacystis* e passaram a receber a classificação de *A. cianea*. Trata-se de cianofíceas unicelulares, cujas células, de forma esférica, com dimensões de 3 a 7  $\mu$  de diâmetro e caracterizadas pela presença de pseudo vacúolos gasosos, reu-

nem-se em colônias, onde se encontram mergulhadas em uma massa gelatinosa hialina que pode reunir dezenas, centenas ou milhares de indivíduos. Além desta, causam frequentemente toxidez, algas do gênero *Anabaena*, caracterizadas por filamentos formados de células aproximadamente esféricas, unidas como as contas de um colar, com *heterocistos* intercalares. Destas, a principal espécie tóxica é *A. flos-aquae*, cujas células têm 4 a 8  $\mu$  de diâmetro. Outros gêneros são ainda citados como tóxicos, embora menos frequentes: *Aphanizomenon*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Nodularia*. (5, 9, 13, 14).

#### EFEITOS DA TOXINA SÔBRE ANIMAIS

A grande maioria dos casos de envenenamento conhecidos até hoje, verificou-se com animais domésticos ou selvagens. Assim, por exemplo, no lago Alexandrina, citado por Francis, morreram carneiros, cavalos, cães e porcos; nos lagos Cordoba, Sakata e Tetonca, em Minnesota, morreu grande número de animais domésticos, principalmente vacas; o mesmo nos lagos rasos de Falls, Minnesota; no lago Oaks, Minnesota morreram 50 galinhas, 17 porcos e um carneiro; no lago Anne, também em Minnesota, nove cabeças de gado; no lago Hall, da mesma região, carneiros e galinhas; no lago Milan, 45 perús, 4 patos e 2 gansos e em outra ocasião vacas, porcos, cavalos e aves; no lago Frazer, Canadá, 20 cabeças de gado; na África do Sul, gado, ratos e aves aquáticas. No Transwaal muitos milhares de cabeças de gado; nas Bermudas, gado etc. (9). Olson cita, ainda (11) a morte de 150.000 patos no lago Great Salt, no Canadá. Em estudo realizado por esse autor, juntamente com E. Bossenmaier e outros, no lago White Water, Manitoba (3) são citadas inúmeras mortes de aves aquáticas e migratórias no verão de todos os anos, desde 1912 (pelo que se tem notícia), sendo que somente uma incursão realizada de 5 a 12 de agosto de 1949 revelou a presença de 50 a 60.000 aves mortas nesse lago.

Muitas têm sido, por outro lado, as experiências de intoxicação por estas algas, realizadas em laboratório, utilizando coelhos, cobaias, ratos, galinhas e peixes. Com relação à morte destes últimos, convém, entretanto, chamar a atenção para o seguinte: muitas vezes, peixes colocados em presença de quantidades grandes de algas, podem morrer por fenômenos não decorrentes de ação tóxica, mas sim de natureza mecânica, como entupimento das brânquias (frequentemente causado por certos gêneros de algas), ou ainda pela limitação do oxigênio produzido pelo acúmulo de algas na superfície ou putrefação das mesmas (13). Parece, por outro lado, que os peixes, em geral, são pouco sensíveis à ação da toxina produzida por algas. Por essa razão, frequentemente eles se tornam veículos da toxina para outros animais que deles se alimentam, tais como aves aquáticas e mamíferos. Palmer cita o caso de intoxicações causadas por peixes que se alimentavam de *Lyngbya majuscula* e *L. aestuarii*, cianofíceas marinhas tóxicas e aos quais ainda os casos, muito frequentes e aos quais ainda nos referiremos, de doenças graves produzidas pela ingestão de moluscos que se nu-

trem de *Gonyaulax* marinhos, e Olson (12) refere casos de intoxicação de animais que se alimentavam de peixes de água doce, bem como de aves que haviam morrido intoxicadas com algas, como por exemplo, a morte de gatos que se alimentaram dos patos mortos em uma dessas lagoas produtoras de algas tóxicas.

O envenenamento por algas caracteriza-se pelos seguintes sintomas gerais (1, 8, 9, 12, 13 etc.): Piloerecção, dispnéia, convulsões, paralisia dos membros posteriores, perda de equilíbrio, espasmos da respiração e morte. Além destes, alguns outros sintomas têm sido observados por alguns e não por outros, porém menos essenciais para a qualificação da natureza da ação tóxica.

#### EFEITOS DA TOXINA SÔBRE O HOMEM

São relativamente raros e constituem, ainda, objeto de muita polêmica, os casos de intoxicação do homem, produzida por águas provenientes de mananciais onde proliferam algas cianofíceas. É citado um caso, no Canadá, de uma criança que morreu instantaneamente, após ter bebido água de uma lagoa onde proliferavam dessas algas. A explicação para a pequena frequência de casos como esse, está em que as águas onde ocorre floração têm sempre aspecto repugnante, graças à cor verde e intensa que apresentam, bem como ao cheiro e gosto intensos causados pela putrefação desses organismos. São manciados, entretanto, alguns casos de gastroenterites produzidas por águas tratadas, provenientes de mananciais onde ocorria a floração. O caso clássico é o ocorrido em Charleston, West Virginia, em outubro e novembro de 1930, no qual cerca de 10.000 pessoas foram atingidas (9), sendo que essas águas eram tratadas por decantação, filtração e cloração normal, além de pré-cloração que foi utilizada nessa ocasião para reduzir a pesada poluição existente; sulfato de cobre para combate às algas; aeração para reposição de oxigênio dissolvido; carvão ativado, na fase de sedimentação para evitar odores desagradáveis, além de permanganato, amônia e supercloração para esse mesmo fim e sem sucesso. (Bartsch, (2)). Ingram e Prescott (9) referem, ainda, ocorrência de epidemias gastro intestinais relacionadas com algas em: Washington, Weston, Sisterville, Ashland, Louisville, Kentucky, Portsmouth, Ironton e Cincinnati. Neil (2) cita, também, um caso de epidemia de gastroenterite em um município de Ontário, no Canadá, abastecido com água apenas clorada, procedente de manancial onde proliferavam essas algas. Esse caso, como o de Charleston, tem sido discutido, alguns autores acreditando tratar-se de coincidência apenas. Palmer faz referência, também, à possibilidade de que a decomposição de grandes quantidades de cianofíceas nos filtros de areia produza, como consequência, a passagem dos produtos tóxicos para o sistema de distribuição, dando origem aos distúrbios gastro-intestinais (13).

Vários autores têm, ainda, defendido a hipótese de que estas algas sejam as causadoras de moléstias de origem desconhecida, como a chamada "febre do feno" (13), moléstia de Haff e outras. A moléstia de Haff ocorre na Europa e está relacionada com o consumo de

peixes ou do fígado destes. É interessante notar-se que todos os lagos que produzem peixes causadores da moléstia, são também produtores de floração com cianofíceas pertencentes aos gêneros considerados tóxicos. Olson admite a possibilidade de que a toxina adquirida pelo peixe, direta ou indiretamente da água, se concentre no fígado ou na carne. As algas desses lagos, quando injetadas em animais, produzem efeitos semelhantes aos que caracterizam a moléstia do Haff (12). Segundo a opinião de Olson e de outros, não existem razões para se acreditar que a substância produzida pelas algas, tóxica em pequeníssimas quantidades para todos os mamíferos e aves em que foi experimentada, não o seja também para o homem. Em favor desta opinião estão as recentes descobertas sobre as propriedades dessas toxinas, realizadas em princípios deste ano por Bishop e outros, nas quais ficou evidenciado que as enzimas do aparelho digestivo humano não têm ação hidrolisante sobre as mesmas, permanecendo intactas as suas propriedades tóxicas após contacto prolongado (1). É conhecida, além disso, e muito frequente, a ocorrência de intoxicação humana por algas marinhas, produzidas pela ingestão de moluscos que delas se alimentam. O veneno produzido por algas planctônicas marinhas, do gênero *Gonyaulax*, foi descrito como uma toxina dez vezes mais potente do que a estricnina. Essas algas microscópicas, quando em grande número, tornam a água do mar vermelha. São citados casos de intoxicação humana em: Quebec, Nova Escócia, New Brunswick, Vancouver Island, Califórnia, Alaska, Oregon, Maine, México, Ilhas Britânicas, Noruega, França, Bélgica e Nova Zelândia. (13) Sommer e Meyer afirmam que trezentos e cinquenta e seis casos de intoxicação e vinte e quatro mortes ocorreram no período de 1927 a 1941, motivados por essas algas. A fim de proteger o público, têm sido feitas leis de "quarentena de moluscos", em áreas infestadas (12).

Por outro lado, está atualmente comprovado (1, 8 e 15) que a toxidez das cianofíceas de água doce é devida a dois fatores: um, proveniente de uma endotoxina produzida pelas próprias células da alga e outro elaborado por bactérias que se desenvolvem juntamente e à custa das algas. Essas bactérias são conhecidas, de longa data, como produtoras do "botulismo" no homem caracterizado por uma intoxicação violenta e quase sempre fatal provocada pela ingestão de alimentos enlatados, mal conservados. Assim sendo, ainda que a toxina produzida pela própria alga (que é muito mais violenta que as das bactérias) não seja nociva ao homem, a botulínica o é, com toda a certeza.

#### VARIAÇÃO DA TOXIDEZ DAS ALGAS

Têm sido observada por quasi todos os pesquisadores que se ocuparam com esse assunto, uma variação, às vezes bastante grande, do efeito tóxico sobre animais (2, 6, 8, 9, 11, 12). Assim, têm sido observados casos em que algas retiradas de uma mesma cultura ou floração natural em 2 dias diferentes, se apresentam tóxicas no primeiro e não tóxicas no segundo dia. Além disso, enquanto que alguns testemunham que a ação letal da alga,

para camundongos, se verifica em 50 minutos ou 1 hora, outros, trabalhando com a mesma espécie afirmam que o efeito nunca se realiza em menos que 3 ou 4 horas. Isto tem dado

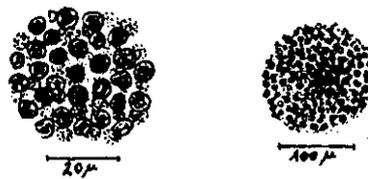


Fig. 2 — Colônias de MICROCYSTIS

origem a um grande número de teorias a respeito dessa toxina, além de criar muita confusão na bibliografia especializada. São as seguintes as principais hipóteses:

1. *Teoria do ciclo biológico*: essa teoria, sustentada por muitos, supõe que a toxina seja um produto do metabolismo das algas e que estas, em seu ciclo biológico, passam por fases de maior ou menor produção desses produtos. Essa hipótese tem sido confirmada por alguns trabalhos, entre os quais se destacam as recentes pesquisas de Hughes e outros (8) demonstrando que a produção da toxina varia com o número de dias de cultura, em ambiente constante.

2. *Teoria da alergia*: alguns autores, como Heise e outros, sustentaram a teoria de que presença de determinadas proteínas, nessas algas, poderia constituir a causa de reações histamínicas que, por conseguinte, variariam de um para outro indivíduo (6, 9).

3. *Teoria da influência do meio*: vários fatores ambientais têm sido apontados como causadores de variação dos efeitos tóxicos em condições diferentes ou em épocas diferentes do ano. Os principais desses fatores seriam: a temperatura, a destruição mecânica das células e destruição bacteriana ou putrefação.

a) *Efeitos da temperatura*: — Wieters (2) "observou que justamente no período do ano em que as algas atingem sua maior concentração nos lagos, isto é, no verão, elas são muito menos tóxicas. Tornam-se, entretanto, altamente tóxicas ainda que em menor quantidade, quando, no fim da estação quente, sobrevém uma queda brusca de temperatura". Esse fato tem apóio em algumas experiências que outros autores têm realizado, e que demonstram que o congelamento repentino das algas provoca liberação da toxina, por causar a desintegração parcial das células. Por outro lado, inúmeras são as experiências que demonstram o aumento da toxidez quando as algas são incubadas durante 25 a 30 horas a 27°C. (4, 6, 8, 10, 12, 16).

b) *Efeitos da destruição mecânica*: — tem sido comprovada a liberação de toxinas da célula pelo efeito de destruição mecânica, ultra-sons, centrifugação etc. (1, 8, 10, 16).

c) Vários autores têm demonstrado que a toxidez aumenta quando as células entram em decomposição, o que deu origem à idéia

de que as toxinas não são, realmente, produzidas pelas algas, mas sim pelas bactérias anaeróbias que produzem a sua putrefação ou, quando muito, pelas bactérias quando se desenvolvem em determinadas condições criadas pelas algas. Essa idéia foi o ponto de partida para a teoria que designaremos como "teoria botulínica".

4. *Teoria botulínica:* Êsses dois fatos, observados inúmeras vezes, de que a toxidez aumenta com putrefação (até certo ponto) e o de que a toxidez aumenta com a incubação a 27-35°C, aproximadamente, levaram muitos autores à convicção de que a toxina não era, realmente, produzida pela alga, mas sim pelas bactérias que promoviam a sua decomposição e que o papel da incubação era propiciar um ambiente adequado à proliferação bacteriana. Vários são os trabalhos, principalmente de procedência canadense, que apoiam esse ponto de vista (1, 3, 4, 6, 10, 12, 15, 16, 17). Parece ter sido Gillam, em 1925, quem primeiro sugeriu essa idéia. Duas observações, entre outras, poderiam trazer dificuldades a essa interpretação: a primeira, é a de que *somente determinadas espécies* de cianofíceas se apresentam como tóxicas: como explicar, pois, a preferência da bactéria botulínica por essas espécies? Há, como veremos adiante, algumas teorias que visam responder a essa objeção; a segunda é a de que tôdas as culturas de bactérias contaminantes, isoladas dessas algas e que se apresentaram tóxicas, causavam morte de ratos em nunca menos que 3 horas, enquanto que as algas ou o extrato das mesmas determinavam a morte, muitas vezes em 30 e até em 5 minutos (6). Por outro lado, entretanto, há muita semelhança (e também algumas diferenças (12)) entre os sintomas produzidos por uma e outra toxina.

De 1950 a 1953, E. Bossenmaier, T. Olson e outros realizaram um metucioso estudo procurando determinar a causa da morte de centenas de milhares de aves aquáticas, especialmente, patos, que se verificava no lago "White water", Manitoba, Canadá (3). Estudos anteriores realizados por B. Cartwright em 1914, em 1949 por Cooch, em 1950 por Calls e Neufield, faziam suspeitar de toxinas botulínicas, embora os poucos trabalhos experimentais tenham constado de testes que terminaram com resultados não concludentes, inclusive as experiências de recuperação dos patos doentes por injeção de "mais de 4 cc dos tipos A, B e C de anti-toxina botulínica" (op. cit.) Bossenmaier, Olson et. al. experimentaram nova técnica: realizavam culturas com material extraído de intestino e outros órgãos dos animais moribundos. Nessa cultura, faziam teste de neutralização pela aplicação de antitoxina botulínica. Eram consideradas positivas as culturas que não se desenvolviam em presença da antitoxina específica. Além disso, os mesmos extratos de órgãos eram injetados em camundongos, a fim de testar a sua toxidez. Verificaram os autores que a grande maioria dos extratos letais a camundongos não desenvolvia bactérias sensíveis à antitoxina botulínica em meio de cultura, embora alguns raros casos o fizessem. Concluíram os autores que as duas coisas ocorriam simultaneamente: ação tóxica das próprias algas, além de toxinas botulínicas provenientes de

bactérias que se desenvolviam nas algas em putrefação.

No Canadá, grande número de pesquisas tem sido realizado, por vários cientistas, visando esclarecer essa questão. Assim, em 1953 Grant, Elwin e Hughes (6) concluíram pela existência de toxina da própria alga e que esta era produzida em maior quantidade quando as algas eram incubadas a 27°C. Em 1955 MacIvor e o mesmo Grant (10) trabalhando com algas coaguladas e depois incubadas a 35°C, como também com macerados, extratos, filtrados, etc., concluíram pela possibilidade de que a toxidez se deva à ação de bactérias sobre as células mortas. Concluíram ainda, em oposição a todos os autores anteriores, que a toxina não é solúvel em água e que não se difunde para o meio, permanecendo na parede celular ou limitada a alguma parte da célula. Em 1957 Thomson, Laing e Grant (16) conseguiram culturas de algas isentas de bactérias, as quais não se demonstraram tóxicas, culturas tóxicas de algas contaminadas e culturas de bactérias puras, também tóxicas, embora surgissem, frequentemente nos meios de cultura, mutantes não tóxicos. O fator tóxico era uma neurotoxina de ação lenta, causando morte em não menos que 3 horas. Concluem, entretanto que "é possível que outras linhagens de cultura destas mesmas algas sejam tóxicas em estado puro", devendo-se, entretanto, proceder com cuidado, nessas experiências, dada a dificuldade de se eliminar bactérias que vivam dentro das células da alga. Afirmam, ainda, que é possível, embora não tenham conseguido observar, que as células da alga tenham capacidade de transformar a toxina de ação lenta em toxina de ação rápida. Esses autores parece acreditarem, assim, em uma ação modificadora da toxina, exercida pelas algas, e explicam o aparecimento das bactérias tóxicas somente em certas espécies de algas pela produção, por estas, de metabolitos que constituem um meio favorável à reprodução das bactérias, pois constataram que essas bactérias não se desenvolvem em certos meios de cultura a não ser que aí se coloquem também as mesmas algas. Em 1958 Chapat e Grant realizaram novas pesquisas, com várias espécies de algas, inclusive clorofíceas, verificando que somente algumas cianofíceas (especialmente dos gêneros *Microcystis* (*Anacystis*) e *Anabaena* eram capazes de produzir toxidez. Thomson, em 1958, confirma as experiências anteriores, identificando uma das bactérias tóxicas contaminantes de uma cultura de *Anacystis*, como sendo pertencente ao gênero *Bacillus* e causando somente morte lenta, em camundongo (mais de 3 horas). Conseguiu, também, imunizar 70% dos camundongos pela injeção de doses sub-letais da toxina bacteriana (17).

Por outro lado, ainda no Canadá e em 1958, um novo estudo de Hughes, Gorham e Zehnder, (8) vem modificar bastante os conceitos que se fazia da ação tóxica, bem como solucionar grande parte das dúvidas e contradições existentes entre os dados obtidos pelos vários autores. Trabalhando com culturas de algas do gênero *Microcystis aeruginosa* (*Anacystis cianea*) de uma linhagem que chamaram NRC-1, conseguiram demonstrar a existência de duas toxinas: uma de ação rápida, a que chamam FDF (Fast-death factor)

e que é produzida pela própria alga; e outra de ação lenta, SDF (Slow-death factor) produzida pelas bactérias contaminantes. A hipótese de 2 toxinas já havia sido aventada, em 1951 e em 1953 por Olson (12). Resultados obtidos por Simpson e Gorham, nos Estados Unidos, em 1958, vieram confirmar essa teoria, demonstrando definitivamente que o FDF é uma endotoxina, produzida pela alga, enquanto que o SDF é produto da bactéria. (15) O fato de ser uma endotoxina vem explicar, também, o aumento da toxidez sempre que se destroem as células, por ação mecânica, ou congelamento etc.

#### IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DA TOXINA FDF.

Finalmente, em 1959, no Canadá, Bishop, Anet e Gorham revelaram um grande acontecimento para a "história das algas tóxicas": haviam conseguido identificar quimicamente a toxina de ação rápida, produzida pelas células da alga. Esse trabalho (1) bastante extenso e completo sob todos os aspectos, vem elucidar definitivamente as dúvidas e as incoerências ainda existentes. Assim, por exemplo, verificaram tratar-se de uma substância que se encontra, nas células, simultaneamente, sob duas formas distintas: uma ácida, insolúvel na água, portanto não difusível para o meio natural em que vivem as algas; outra, salina, muito solúvel em água e facilmente difusível ou dialisável através de membranas. Isto explica a razão porque alguns autores, como Louw e Mac Ivor-Grant (10) tenham concluído, contrariamente a quasi todos os outros pesquisadores, que a toxina não é solúvel em água; ou ainda as discrepâncias sobre a influência do pH na toxidez; ou, finalmente, sobre o grau e a variação de toxidez da alga, visto que, quando a toxina se encontra sob a forma salina, solúvel em água, a difusão para o meio se faz em muito maior escala enquanto que, quando predomina a forma ácida, a água adjacente não adquire a toxina, não produzindo efeitos sobre animais.

Antes do trabalho de Bishop et al, vários autores haviam tentado a identificação química da substância. Entre estes, podemos citar: Fitch et al; Wheeler et al; Louw; Shelubsky; Stewart et al (1,10) e Olson (12). De um modo geral, esses autores apontam as seguintes propriedades como características da toxina: solúvel em água (excepto Louw) e em alcoois; estável (dependendo para alguns, do pH e para outros do estado seco ou líquido) a 100°C e à autoclave; álcali-lábil. Mc Ivor e Grant (10) afirmam, pelo contrário, que os pH mais elevados aumentam a toxidez: mas somente experimentaram até 9 e Hughes et al (8) admitem, também, uma grande resistência do FDF aos alcalis: (NaOH 0,1N, a 100°C, durante uma hora); deram resultados negativos os testes feitos para as seguintes substâncias: alcaloides, (excepto para Louw) toxalbumina, toxina botulínica, cianetos amigdalina, acetil colina, metais, proteínas, carboidratos, nitratos, nitritos, pilocarpina, saponinas, glicosídeos cardíacos e alcalóides, além de testes antigênicos, também negativos; além disto, não é volátil, é adsorvido pelo carvão

do qual dificilmente se libera, mas não pelo ferro dializado; para Louw, parecia tratar-se de um alcaloide tóxico; para Olson, parecia tratar-se de mais de uma substância.

Bishop et al (1) conseguiram obter dois extratos tóxicos do FDF, a partir de algas congeladas: o primeiro, ácido, dissolvido em etanol a 50°; o segundo, sob a forma de um



Fig. 3 — Colônias de MICROCYSTIS

sal de sódio e muito solúvel em água. Estabeleceram uma unidade de toxidez MU, que corresponde à quantidade mínima de toxina que é necessária para produzir a morte de um camundongo branco de 20 gr. Estudaram o comportamento de ambos os extratos, em presença de a) resinas permutadoras de ions, verificando que a Amberlita IR-4B (forma OH) retém a toxina, enquanto que a resina para ácidos não a retém: explicam que a resina remove o cátion da forma salina, causando precipitação da forma ácida, insolúvel e, portanto, não detectável por lavagem em água. b) "Countercurrent distribution" — obtiveram a separação das duas formas, apenas: ácida e salina. c) Cromatografia em papel: conseguiram obter zonas em forma de manchas, que, recortadas, produziam ação tóxica, mas não obtiveram separação das componentes. Conseguiram reação positiva, destas manchas, com um reagente para peptídios, de Reindel e Hoppe — cloro: iodeto de potássio: toluidina e, assim, "revelar" o cromatograma. d) Cromatografia em coluna: empregaram celulose e celite sem resultado; carvão adsorveu completa e irreversivelmente toda a toxina. e) Enzimas proteolíticas: experimentaram as seguintes enzimas digestivas: pepsina, tripsina, papaína, quimotripsina, carbopeptidase, polidase, takadiastase e takadiastase-papaína. Nenhuma

delas causou perda de toxidez. f) Ácidos — obtiveram, com ácido acético glacial + HCl 10N, perda total da toxidez em 70 horas. A cromatografia em papel revelou, então, a presença de aminoácidos livres, demonstrando portanto, hidrólise das ligações peptídicas g) Eletroforese — usando como tampão, uma solução de borato, 0,1 M (pH 9,1) e realizando a corrida em papel, cortavam, em seguida, este último, longitudinalmente; uma das metades era "revelada" no reagente de Reindel e Hoppe e a outra metade seccionada em trechos correspondentes às varias fases reveladas, os quais eram dissolvidos e as soluções resultantes injetadas em ratos, a fim de testar a toxidez de cada parcela separada eletroforéticamente. O resultado disto foi a separação de cinco componentes, peptídios, dos quais um somente se demonstrou tóxico. h) Estes cinco componentes foram dissolvidos e submetidos à hidrólise pelo HCl e depois à cromatografia, sendo os diversos setores obtidos submetidos à espectrofotometria, a qual revelou e permitiu identificar a série aminoácida de cada um deles. Verificou-se a presença de ácido aspártico, glutâmico, serina, valina, ornitina alanina e leucina em quasi todos eles: o peptídio tóxico é o único que contém leucina; além disto, o glutâmico, a alanina e a leucina aparecem, nele, repetidos, formando uma cadeia de 10 aminoácidos, provavelmente com estrutura cíclica.

#### CONSEQUÊNCIAS, DO PONTO DE VISTA DA SAÚDE PÚBLICA

Da análise de todos esses dados, podemos concluir o seguinte:

As algas citadas como tóxicas (pelo menos as da espécie *Microcystis aeruginosa* ou *Anacystis cianea*) são realmente produtoras de uma neurotoxina que se encontra sob duas formas, uma ácida e outra salina, no interior de suas células, toxina esta de ação rápida (FDF) e violenta: no estado puro, bastam cerca de 0,5 mg para produzir a morte de um animal de um quilo de peso, em espaço de uma hora! Além disto, existe a possibilidade da produção de uma outra toxina, SDF, esta de ação lenta (tempo de ação nunca menor que 3 horas) por intermédio de bactérias que se desenvolvem nos aglomerados de algas em decomposição. Ambas as formas podem ser nocivas à saúde pública, devendo ser evitado, por tôdas as maneiras, o acúmulo destas algas nos leitos filtrantes pois, aí, destruindo-se por ação mecânica ou decomposição, poderão liberar grandes quantidades de toxina que serão conduzidas pela água. (7).

O FDF é, hoje, conhecido quimicamente. Importam, para fins sanitários, as seguintes propriedades que o caracterizam:

1 — É um peptídio não hidrolisável por ação de enzimas digestivas proteolíticas — isto explica e convence da sua ação tóxica por via oral.

2 — Quando sob a forma de um sal (pode ocorrer sob forma ácida) é altamente solúvel em água, podendo permanecer nesta quando as algas são destruídas por efeito mecânico, vibrações de alta frequência, decom-

posição bacteriana ou pelo resfriamento rápido.

3 — É dialisável, através de membranas, para a água — aliás, este é o processo usado por Bishop e outros, para extração da toxina do macerado de algas. Assim sendo, a toxina pode passar da célula para o meio, não sendo retida por nenhum processo comum de filtração mecânica.

4 — Resiste muito ao calor, às grandes variações de pH (até 10) e aos processos comuns de tratamento, compreendendo: coagulação pelo sulfato de alumínio, filtração, cloração e carvão ativado quando empregado nas dosagens comuns.

5 — Por outro lado, essa substância é sensível aos pH maiores que 10.

6 — Apresenta grande afinidade pelas superfícies adsorventes, sendo retido e dificilmente liberado pelo carvão.

Esta última propriedade encerra a principal possibilidade de se tratar para fins de abastecimento público, uma água que contenha toxinas provenientes de algas tóxicas acumuladas em grande quantidade. Wheeler e Lackey, em 1942 (1,6) realizaram experiências nas quais demonstram que a toxina, é apenas parcialmente retirada da água, pelo carvão ativado, quando este é empregado em quantidades equivalentes às usadas em estações de tratamento de águas. Quantidades maiores de carvão poderão, segundo parecem indicar as recentes experiências de Bishop et al (1) retirar totalmente essa substância da água. Há um ano, no Spirit Lake, Iowa, USA, foram alimentados coelhos com águas que in-natura eram tóxicas, tratadas com carvão ativado, não sendo observados efeitos tóxicos (Neel e Rose) (2). Infelizmente não possuímos dados sobre a quantidade de carvão ativado empregado. Além disso, se a toxina não foi totalmente adsorvida, resta sempre a possibilidade de que a continuação da ingestão de água nessas condições por um tempo indefinido, viesse a causar, com o tempo, algum efeito fisiológico sobre o animal. A descoberta de um composto que reage com a toxina, dando uma coloração azul, empregada por Bishop etc. al para "revelar" os cromatogramas e eletroforogramas realizados abre, talvez, uma possibilidade de se realizar a dosagem dessa substância nas águas de abastecimento, in-natura e tratadas pelo carvão.

Em carta que recentemente tivemos em mãos, de G. Grant, um dos biólogos que mais têm pesquisado esse assunto no Canadá (7) lemos o seguinte: "Acredito não haver perigo (na utilização da água de um reservatório onde proliferam algas tóxicas) quando a água captada do reservatório é filtrada através de carvão ou processo semelhante. Entretanto, do ponto de vista da filtração, é preferível evitar o acúmulo dessas algas no leito filtrante, o que poderá produzir a liberação de grandes quantidades de substâncias tóxicas quando as células morrem e desprendem suas toxinas".

SUMMARY

Toxic Algae — Toxins control in water supply.

The A. presents a list of algal toxicity occurrences, for both animals or human beings and summarises the most important experiences and discoveries that led to the knowledge of toxic compound of algal origin.

He analyses the physical and chemical properties of the algal toxin, comments the public health aspects of some algae presence in potable waters and examines the possibility of treatment of such waters for public water supply.

Trabalhos citados:

- 1 — Bishop, C. T.; Anet, EFLJ; Gorham, P. R. — "Isolation and identification of the Fast-Death Factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1 — Can. Jour. of Bioch. and Phys. Vol. 37 — Canadá, 1959.
- 2 — Blumberg, E. — Resumo das respostas dadas pelos especialistas norte americanos a um inquérito realizado, sobre algas tóxicas, pelo D.A.E. — São Paulo, 1959.
- 3 — Bössenmaler, E. F.; Olson, T. A.; Rueger, M. E.; Marshall, W. H. — Some field and Laboratory aspects of duck sickness at Whitewater Lake, Manitoba — Trans. of the Nineteenth North Am. Wild life Conf. — USA, 1954.
- 4 — Chaput, N; Grant, G. A. — Toxic Algae III — Screening of a number of Species Defence Research Board — Canadá, 1958.
- 5 — Drouet, F; Daily, WA — Revision of the Cocoid Myxophyceae — Butl. Univ. Bot. Stud — USA 1956.
- 6 — Grant, GA; Hughes, EO — Development of toxicity in Blue-Green Algae — Canad. Jour. of Public Health — Vol. 44 — Canadá, 1953.
- 7 — Grant, GA; — Respostas ao inquérito do DAE sobre algas tóxicas — Canadá, 1959.
- 8 — Hughes, EO; Gorham, P. R.; Zehnder, A. — Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa* — Canad. Journ. of Microbiology, Vol. 4 — Canadá, 1958.
- 9 — Ingram, WN; Prescott, G. W. — Toxic Fresh-Water Algae — The Am. Midland Nat., Vol. 52 — USA, 1954.
- 10 — Mac Ivor; Grant, GA — Toxic Algae II — Preliminary Attempts to prepare toxic Extracts — Defence Research Board — Canada, 1955.
- 11 — Olson, TA — Studies of Algae Poisoning — The Flicker, Vol. 27 — USA, 1955.
- 12 — Olson, TA — Toxic Plankton — Mimeografado — USA, 1951.
- 13 — Palmer, CM — Algae in Water Supplies — 2 vols, Prépublication copy — USA, 1958.
- 14 — Pascher, A. — Die Süßwasserflora (chave sistemática) — Vol. 12 — Cyanophyceae — Alemanha, 1925.
- 15 — Simpson, B; Gorham, PR — Source of the Fast — Death — Factor produced by unialgal *Microcystis aeruginosa* NRC-1 — the Phycol. Soc. of Am., 1958.
- 16 — Thomson, W. K; Laing, A.; Grant, G. A. — Toxic Algae — Isolation of toxic bacterial contaminants — Defense Research Board — Canadá, 1957.
- 17 — Thomson, W. K; Toxic Algae V — Study of toxic bacterial contaminants — Defence Research Board — Canadá, 1958.