UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises toxicológicas

Estudos ecofisiológicos de *Sphaerospermopsis torques-reginae*
(Cyanobacteria): variações no crescimento, produção de pigmentos,
lipídeos e peptídeos

Luiz Gustavo Godoy Brigagão

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Pinto

SÃO PAULO
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises toxicológicas

Estudos ecofisiológicos de *Sphaerospermopsis torques-reginae*
(Cyanobacteria): variações no crescimento, produção de pigmentos,
lipídeos e peptídeos

Luiz Gustavo Godoy Brigagão

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Pinto

SÃO PAULO
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Brigagão, Luiz Gustavo Godoy
B854e Estudos ecofisiológicos de *Sphaerospermopsis torques-reginae*
(Cyanobacteria): variações no crescimento, produção de pigmentos,
lipídeos e peptídeos / Luiz Gustavo Godoy Brigagão. -- São
Paulo, 2014.
74p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Toxicologia ambiental 2. Análise toxicológica I. T. II. Pinto,
Ernani, orientador.

615.9 CDD

Luiz Gustavo Godoy Brigagão

Estudos ecofisiológicos de *Sphaerospermopsis torques-reginae*
(Cyanobacteria): variações no crescimento, produção de pigmentos,
lipídeos e peptídeos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.
(Marcel Proust)*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, capacidade e perseverança.

Aos meus pais, Saulo e Marialba, pelo amor, apoio e exemplo de vida e por acreditarem em mim.

A minha querida irmã Cláudia por todo carinho e apoio.

Aos meus avós e tios e primos que me deram apoio em todos os momentos.

Ao professor Ernani pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e pelo conhecimento científico transmitido.

Às agências de fomento CNPQ, CAPES e FAPESP.

Aos professores do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Ao CEFAP-ICB-USP e ao Fernando Almeida pela disponibilidade do equipamento e pelo auxílio com as análises de MALDI-TOF.

Aos meus amigos e colegas que ainda estão e que já passaram pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, Simone, Fabyana, Kazumi, Mariah, Felipe, Fabiane, Ariane, Raquel, Fernanda, Carlos, Bruna, Bárbara, Joseane, Natália, Vania, Ronaldo e Stella.

Aos meus amigos próximos, André, Gutto, Victor e Marcelo pela amizade e companhia.

Aos meus amigos de Minas Gerais por todo apoio ao longo deste trabalho.

RESUMO

BRIGAGÃO, L.G.G. **Estudos ecofisiológicos de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria): variações no crescimento, produção de pigmentos, lipídeos e peptídeos.** 2014. 74f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As cianobactérias são organismos que vivem dispersos em ecossistemas aquáticos e fazem parte do fitoplâncton. Quando em ambientes eutrofizados por excesso de nutrientes, crescem de maneira acelerada nas chamadas florações (do inglês *blooms*), e além de poluírem fisicamente as reservas de água, são capazes de produzir potentes toxinas. Outros metabólitos produzidos pelas cianobactérias tem despertado interesse por seu potencial para aplicação farmacêutica e biotecnológica, que abrangem moléculas como proteínas, peptídeos e lipídeos. Os avanços de técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas tem possibilitado estudos mais precisos e amplos de biomoléculas de interesse em organismos como cianobactérias. A espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* já foi registrada no Brasil, porém existem poucos estudos na literatura sobre metabólitos secundários produzidos por essa espécie, cuja produção de anatoxina-a(s) já foi registrada. A produção de anatoxina-a(s) é de difícil estudo, em razão da inexistência de padrão analítico para quantificá-la e das próprias características da molécula. Neste estudo foi avaliada a influência de fatores ambientais sobre o crescimento, formação de heterócitos e produção de pigmentos de uma linhagem de *S. torques-reginae*, isolada de um reservatório em Pernambuco, quando foi classificada como *Anabaena spiroides* e posteriormente reclassificada. Para isso foram utilizadas técnicas tradicionais de mensurações do crescimento e de extração dos compostos de interesse em cultivos com variações da fonte de nitrogênio e da intensidade luminosa. O perfil de ácidos graxos foi avaliado por técnica de GC-MS, avaliando a influência das variáveis luz e nitrogênio. Foram identificados ácidos graxos de interesse para a produção de biodiesel e também ácidos graxos essenciais como o 18:2 ω 6 e o 18:3 ω 3. Foi avaliado também o perfil de peptídeos por técnica de MALDI-TOF, focando em massas entre 2 e 20 kDa. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o aumento do conhecimento sobre as cianobactérias brasileiras e sobre a espécie *S. torques-reginae*, ainda pouco estudada, dando uma visão geral sobre a produção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: Cianobactéria, *Sphaerospermopsis*, Nitrogênio, Luz, Lipídeos, Peptídeos

ABSTRACT

BRIGAGÃO, L.G.G. **Estudos ecofisiológicos de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria): variações no crescimento, produção de pigmentos, lipídeos e peptídeos.** 2014. 74f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cyanobacteria are organisms that live dispersed in aquatic ecosystems and belong to phytoplankton. In environments eutrophized by excess of nutrients, they grow at an accelerated rate in so-called blooms, and in addition to physically pollute water supplies, they are able to produce potent toxins. Other metabolites produced by cyanobacteria has attracted attention for its potential to pharmaceutical and biotechnological applications, comprising molecules such as proteins, peptides and lipids. Advances in chromatographic and mass spectrometry techniques has enabled more accurate and extensive studies of biomolecules of interest in organisms like cyanobacteria. The specie *Sphaerospermopsis torques-reginae* has been recorded in Brazil, but there are few studies on secondary metabolites produced by this specie, whose production of anatoxin-a(s) has already been registered. The production of anatoxin-a (s) is difficult to study because of the lack of analytical standard to quantify it and because of the characteristics of the molecule. In this study, we evaluated the influence of environmental factors on growth, heterocysts differentiation and pigment production in a strain of *S. torques-reginae*. This strain was isolated from a water reservoir in Pernambuco, Brazil, when it was classified as *Anabaena spiroides* and subsequently reclassified. We used traditional techniques for growth measurements and extraction of compounds with interest from cultures in different conditions of nitrogen source and light intensity. The fatty acids profile was evaluated by GC-MS technique, assessing the influence of light and nitrogen variations. We identified fatty acids with interest for biodiesel production. Essential fatty acids such as 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 were also identified. We also evaluated the peptides profile by MALDI-TOF technique, focusing on mass range between 2 and 20 kDa. The results reached with this study contribute to increase the knowledge about the Brazilian cyanobacteria and about the species *S. torques-reginae*, still little studied, giving an overview on their metabolites production.

Keywords: Cyanobacteria, *Sphaerospermopsis*, Nitrogen, Light, Lipids, Peptides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Cianobactérias e metabólitos secundários	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Cianotoxinas.....	13
2.2 <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> (Anabaena)	16
2.3 Outros metabólitos de cianobactérias	19
2.3.1 Lipídeos em cianobactérias.....	19
2.3.2 Peptídeos em cianobactérias	23
2.4 Espectrometria de Massas em estudos de ativos de cianobactérias.....	25
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Escolha da linhagem de <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	30
4.2 Manutenção das linhagens	30
4.3 Avaliação dos efeitos do nitrogênio.....	31
4.4 Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa	33
4.5 Determinação do crescimento celular em hemocitômetro.....	33
4.6 Extração e análise de clorofila- <i>a</i> e pigmentos acessórios.....	34
4.7 Análise de lipídeos por GC-MS	35
4.7.1 Extração, análise e quantificação de ácidos graxos	36
4.8 Extração e análise por MALDI-TOF	38
4.9 Análise estatística	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Avaliação dos efeitos do Nitrogênio.....	40
5.1.1 Efeitos sobre o crescimento	40
5.1.2 Formação de heterócitos	42
5.1.3 Produção de clorofila- <i>a</i> e pigmentos acessórios	45
5.2 Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa	48
5.2.1 Efeitos sobre o crescimento	48
5.3 Análise de lipídeos por GC-MS.....	52
5.4 Análise por MALDI-TOF	57
6. CONCLUSÕES GERAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cianobactérias e metabólitos secundários

Em razão da importância da água para a vida e atividades do homem, a preocupação com sua qualidade tem sido alvo de interesse para saúde pública, tornando necessário o contínuo monitoramento e controle de seus poluentes (CARMICHAEL, 1992; CHORUS & BARTRAM, 1999). Os corpos d'água geralmente são destino de diversos tipos de poluentes químicos e biológicos, decorrentes do impacto humano no meio ambiente. Estes poluentes são provenientes do esgoto doméstico, que contém grande quantidade de matéria orgânica, da água de irrigação de áreas agrícolas fertilizadas e dos resíduos gerados pelas indústrias.

O acúmulo de resíduos de origem antropogênica resulta em um processo de eutrofização artificial dos corpos d'água, podendo levar à morte de animais e plantas aquáticas e à contaminação das fontes de abastecimento de água para a população. No processo de eutrofização ocorre o aumento dos níveis de nutrientes essenciais para o fitoplâncton, principalmente compostos de nitrogênio e fósforo (CHORUS & BARTRAM, 1999). Nos países tropicais, a exposição dos lagos, lagoas e rios eutrofizados às altas temperaturas e à intensa luz do sol, favorecem o crescimento acelerado e atípico de algas e cianobactérias, de forma a deixar a água com uma coloração verde e imprópria para o uso (PITOIS *et al.*, 2000; PFLUGMACHER, 2002).

Inicialmente classificadas como pertencente ao grupo das algas, as cianobactérias foram posteriormente reclassificadas como pertencentes ao domínio *Bacteria* devido à natureza bacteriana de suas células. Apresentam ampla variabilidade morfológica e podem ser naturalmente encontrados em diversos ecossistemas (CHORUS & BARTRAM, 1999). São capazes de se adaptar em habitats terrestres, aquáticos (água doce e salgada) e até mesmo em ambientes extremos, como geleiras e fossas termais. Desempenham um importante papel na oxigenação da atmosfera da Terra em razão da sua atividade fotossintética (WYNNE & BOLD, 1978), tendo um importante papel nos ciclos biogeoquímicos. Algumas cianobactérias possuem como vantagem adaptativa o controle de flutuabilidade na coluna d'água por apresentarem estruturas denominadas aerótopos. Também podem crescer em ambientes de alta turbidez e podem armazenar grande quantidade de nutrientes (CHORUS & BARTRAM, 1999). Constituem também importantes organismos fixadores de nitrogênio. As espécies fixadoras de nitrogênio atmosférico possuem vantagem adaptativa sobre os organismos não fixadores constituintes do fitoplâncton (DONZE *et al.*, 1972; SOMPONG *et al.*, 2005). Estas cianobactérias são caracterizadas por formarem células especializadas, denominadas heterócitos que se diferenciam quando há baixa concentração de compostos nitrogenados do meio (BERMAN-FRANK *et al.*, 2007). Os heterócitos tem a capacidade de fixar N₂ atmosférico, com a atuação da enzima nitrogenase. O nitrogênio fixado é passado para as células vegetativas na forma de compostos nitrogenados capazes de integrar o metabolismo destes organismos (CHORUS & BARTRAM, 1999). A ausência do pigmento acessório ficocianina nos heterócitos sugere que nestas células falta o fotosistema II (PSII) e por isso são

incapazes de produzir O₂, que tem conhecida capacidade de inibir a atividade da nitrogenase (DONZE *et al.*, 1972). Adicionalmente, para todas cianobactérias, o principal pigmento de captação da luz solar é a clorofila-a. O processo de fotossíntese é semelhante ao que ocorre em plantas e algas (CHORUS & BARTRAM, 1999). Como são organismos predominantemente fotoautotróficos, a luz é um dos principais fatores determinantes para o seu crescimento e metabolismo. Contudo podem se adaptar a altas variações de intensidade luminosa, mas crescem melhor em ambientes com alta concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo) (CHORUS & BARTRAM, 1999), parecendo ter vantagem sobre outros organismos do fitoplâncton, em ambientes eutrofizados. A proliferação exagerada de cianobactérias em ambientes eutróficos, conhecida como floração ou do inglês “*bloom*”, perturba o equilíbrio do ecossistema podendo ter maior impacto sobre o seu funcionamento, interferindo na relação entre os organismos, na biodiversidade e nas concentrações de oxigênio (CARMICHAEL, 1992; CODD *et al.*, 1999; SIVONEN & JONES, 1999; CODD, 2000).

As cianobactérias tem grande importância econômica por possuírem alto valor nutricional e medicinal na constituição de suplementos alimentares (PIÑERO ESTRADA *et al.*, 2001). Além disso, produzem uma ampla variedade de compostos bioativos que incluem 40% lipopeptídeos, 5,6% aminoácidos, 4,2% ácidos graxos, 4,2% macrolídeos e 9% amidas (BURJA *et al.*, 2001). Entre os metabólitos de cianobactérias observa-se uma interessante variedade de atividades biológicas que inclui compostos com diferentes efeitos como, por exemplo, antimicrobianos, imunossupressores, antitumorais, anti-câncer, antivirais, anti-HIV, fotoprotetores e ainda outros que incluem compostos com

atividade antimalárica, antimicótica e antialimentar (BURJA *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2002; WASE & WRIGHT, 2008; RASTOGI & SINHA, 2009). Por estas propriedades, as cianobactérias são consideradas fontes ricas em compostos relevantes para pesquisas biomédicas com ampla aplicação terapêutica e farmacêutica (TAN, 2007). A produção de biodiesel a partir de ácidos graxos extraídos de cianobactérias também vem sendo amplamente estudada para uso como fonte de energia alternativa e sustentável (LU, 2010; PARMAR *et al.*, 2011; WAHLEN *et al.*, 2011). Tem crescido também o investimento em estudos para a aplicação comercial destes compostos como produtos agroquímicos (PENG *et al.*, 2003). Muitas são as vertentes, entretanto ainda são necessários estudos para se obter maiores informações ecológicas sobre as implicações da aplicação destes metabólitos. Além disso, as condições físico-químicas e ambientais que controlam a produção destes metabólitos podem ser usadas para aperfeiçoar as abordagens biossintéticas para a obtenção de produtos comerciais. O aumento dos registros de ocorrências de intoxicações causadas por toxinas produzidas por cianobactérias tem levado a reavaliação dos padrões de qualidade e elaboração de novas leis que abrangem as principais cianotoxinas estabelecendo um limite máximo aceitável para a presença destas na água. Entretanto, apesar de vários trabalhos na literatura abordarem principalmente aspectos analíticos envolvendo cianotoxinas, pouco se conhece sobre as consequências a longo prazo da exposição a estes agentes tóxicos.

2. Revisão da Literatura

2.1 Cianotoxinas

As cianobactérias são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários dentre eles as cianotoxinas. Dentre os gêneros capazes de produzir toxinas estão os gêneros *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Hapalosiphon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* e *Sphaerospermopsis*; (CARMICHAEL, 2001; CODD *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2012).

As cianobactérias tem despertado interesse em razão do aumento da ocorrência, da ampla distribuição e de relatos de incidentes relacionados a toxinas produzidas como metabólitos secundários desses organismos (FALCONER, 1996; CHORUS & BARTRAM, 1999). As cianotoxinas pertencem a diferentes tipos de estruturas químicas e podem ser agrupadas de acordo com o alvo de suas ações tóxicas. Algumas são potentes neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas), outras são hepatotóxicas (microcistinas, nodularinas) ou citotóxicas (cilindrospermopsina) e outras ainda exercem efeito irritante local sobre a pele ou trato gastrointestinal (debromoaplisiatoxina, lingbiatoxina). Diferentes tipos de toxinas podem ser produzidos por um mesmo gênero de cianobactéria (CHORUS & BARTRAM, 1999; MOLICA *et al.*, 2005).

As cianotoxinas de ocorrência já registrada no Brasil são microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a(s) (AZEVEDO *et al.*, 1994; LAGOS *et al.*, 1999; BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2011). A toxina cilindrospermopsina foi primeiramente identificada em um filtro de carvão ativado de clínica de hemodiálise, em Caruaru-PE (AZEVEDO *et al.*, 2002) e mais recentemente em águas de abastecimento no nordeste, onde predominava *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2011). No evento conhecido como tragédia de Caruaru, mais de 70 mortes foram confirmadas por contato com microcistinas (JOCHIMSEN *et al.*, 1998). As principais cianotoxinas, seus mecanismos de ação e gêneros produtores estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Cianotoxinas classificadas por mecanismo de ação.

Cianotoxina	LD ₅₀ (i.p. rato) de toxina pura (µg.kg ⁻¹)	Gênero produtor da toxina	Mecanismo de toxicidade
Hepatotoxinas			
Microcistinas	50 -1000	<i>Microcystis, Planktothrix, Oscillatoria, Nostoc, Anabaena, Anabaenopsis, Hapalosiphon</i>	Inibem fosfatases protéicas (PP1 e PP2A)
Nodularina	50	<i>Nodularia spumigena</i>	
Neurotoxinas			
Anatoxina-a (alcalóide)	250	<i>Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Plankthotrix, Microcystis</i>	Liga-se irreversivelmente aos receptores nicotínicos de acetilcolina
Anatoxina-a(s) (alcalóide)	20	<i>Anabaena.</i> <i>Sphaerospermopsis</i>	Inibe a atividade da acetilcolinesterase
Saxitoxinas (alcalóides)	8-10	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya</i>	Liga-se e bloqueia canais de sódio em células nervosas
Citotoxinas			
Cilindrospermopsina (alcalóide)	2100 (24 h) 200 (5-6 dias)	<i>Cylindrospermopsis, Anabaena, Aphanizomenon, Umezaki, Raphidiopsis</i>	Inibe a síntese protéica; Causa dano citogenético no DNA
Lipopolissacarídeos	Desconhecido	Cianobactérias em geral	Irritante; causa inflamação em tecidos expostos

Fonte: Adaptado de FERRÃO-FILHO & KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011.

A importância fisiológica das cianotoxinas para cianobactérias ainda não foi elucidada. Inicialmente, pensadas como moléculas anti-herbívoria, a maioria tem se mostrado mais tóxicas para mamíferos terrestres

do que para biota aquática (CHORUS & BARTRAM, 1999). Existem evidências de que as cianotoxinas tenham papel importante na comunicação inter e intra-espécies podendo influenciar a composição de uma comunidade (KAPLAN *et al.*, 2012). As toxinas podem permanecer no interior das células ou serem liberadas para o meio pela morte ou lise celular (CARMICHAEL, 1992) conferindo potencial risco à saúde pública.

2.2 *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Anabaena)

O gênero *Sphaerospermopsis* foi citado pela primeira vez por Zapomelová (ZAPOMĚLOVÁ *et al.*, 2009) e pertence a ordem Nostocales. A principal característica deste gênero é a forma e posição dos acinetos, que são esféricos e se encontram em um ou em ambos os lados do heterócito (Fig. 1). Nele estão incluídas espécies com tricomas espiralados ou retos quando solitários, sempre com presença de aerótopos (WERNER *et al.*, 2012). Linhagens isoladas de corpos d'água brasileiros, inicialmente identificadas como *Anabaena spiroides* (MOLICA *et al.*, 2005), foram reclassificadas como *Sphaerospermopsis torques-reginae* por localização filogenética baseado em sequência de genes 16S rRNA e pelos acinetos de forma arredondada e situados em um ou ambos os lados do heterócito (WERNER *et al.*, 2012). Uma destas linhagens está sendo usada neste estudo.

Figura 1 – *Sphaerospermopsis torques-reginae*. Aspectos gerais dos filamentos mostrando a variação dos tricomas espiralados, o envelope mucilaginoso e o número e posição dos acinetos. Fonte: (WERNER *et al.*, 2012).

O nome *Anabaena* relembra hoje um complexo composto de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix* e *Sphaerospermopsis*, além de *Anabaena*. Na literatura encontramos relato da produção de anatoxina-a(s) em cepas descritas como *Anabaena flos-aquae* (MAHMOOD *et al.*, 1988), *A. lemmermannii*, *A. spiroides*; (MOLICA *et al.*, 2005)

e *A. oumiana* (DÖRR *et al.*, 2010A). A anatoxina-a(s) (figura 2B) é um organofosforado natural incomum, sem relação estrutural com a anatoxina-a (figura 1A) (outra neurotoxina produzida por cianobactérias) e o seu mecanismo de ação é inibir irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase (AChE) (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986). A atividade da anatoxina-a(s) é comparável à dos inseticidas organofosforados paraoxon, fisostigmina, piridostigmina e à do agente químico de guerra sarin (COOK *et al.*, 1988; PITA *et al.*, 2003). Pela elevada afinidade dos organofosforados pela AChE, esta enzima é frequentemente utilizada como biomarcador para a detecção desses produtos em ambientes aquáticos (BARROS *et al.*, 2004). Quando a AChE é inibida, o neurotransmissor acetilcolina deixa de ser hidrolisado na sinapse, a membrana então pode ser repolarizada e consequentemente o influxo nervoso é bloqueado. A anatoxina-a(s) é altamente tóxica para mamíferos. Quando extratos contendo a anatoxina-a(s) foram administrados por via intraperitoneal em camundongo, a morte do animal foi precedida de salivação, lacrimação, fasciculação, incontinência urinária e falência respiratória em 240 min (DL₅₀: 20 µg kg⁻¹ i.p. em rato) (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; ONODERA *et al.*, 1997). A anatoxina-a(s) tem sido reportada em casos de intoxicação de cachorros, pássaros e suínos no Canadá, e na intoxicação e óbito de pássaros selvagens na Dinamarca (MAHMOOD *et al.*, 1988; HENRIKSEN *et al.*, 1997).

Figura 2: Estruturas químicas da anatoxina-a **(A)**; e anatoxina-a(s) **(B)**. Fonte: (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Como citado, a cepa usada neste estudo foi isolada como *Anabaena spiroides* e confirmada como produtora de anatoxina-a(s) de florações ambientais de uma reserva de água em Tapacurá-PE, (MOLICA *et al.*, 2005) e foi reclassificadas recentemente como sendo da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (WERNER *et al.*, 2012). Contudo, não há ainda na literatura relatos da produção de metabólitos secundários em *S. torques-reginae*. Sendo assim, a descoberta e co-ocorrência de metabólitos secundários nestas linhagens são objetivos deste estudo. Aliando experimentos de laboratório que visem elucidar aspectos do crescimento em resposta a fatores ambientais e análises cromatográficas e espectrométricas, o potencial biotecnológico e farmacológico destas moléculas foi explorado neste trabalho.

2.3 Outros metabólitos de cianobactérias

2.3.1 Lipídeos em cianobactérias

As cianobactérias também podem conter uma quantidade significativa de lipídeos. Uma parte desses lipídeos são ácidos graxos poliinsaturados que

podem fazer parte da nutrição humana e animal devido a suas propriedades relacionadas a uma saúde melhor (RADMER & PARKER, 1994). Os ácidos graxos poliinsaturados mais considerados são ácido araquidônico (AA), ácido docosahexaenóico (DHA), ácido γ -linolênico (GLA) e ácido eicosa-pentaenóico (EPA). A forma mais comum de armazenamento de lipídeos em cianobactérias são os triglicerídeos, que podem constituir cerca de 80% do conteúdo total de lipídeos nesses organismos (TORNABENE *et al.*, 1983). A composição de ácidos graxos de um típico óleo obtido de cianobactérias é mostrada na tabela 2. É principalmente composto por uma mistura de ácidos graxos insaturados principalmente os ácidos palmitoleico (16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3). Ácidos graxos saturados também estão presentes, mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0) (SINGH *et al.*, 2002).

Tabela 2: Composição média de ácidos graxos de cianobacterias

Ácido graxo	Nº carbonos:Nº insaturações	Composição média (%)
Ác Mirístico	14:0	40
Ác. Palmítico	16:0	60
Ác Palmitoleico	16:1	50
Ác. hexadecadienoico	16:2	20
Ác. Esteárico	18:0	30
Ác. Oleico	18:1	40
Ác. Linoleico	18:2	40
Ác. Linolênico	18:3	40
Ác. Parinarico	18:4	30
Ác. gadoleico	20:1	10

Adaptado de (SINGH *et al.*, 2002)

Estes metabólitos também tem recebido uma atenção cada vez maior em estudos em razão da sua aplicação na obtenção de biodiesel (WAHLEN *et*

al., 2011; BOROWITZKA & MOHEIMANI, 2013), com estudos já envolvendo manipulação genética para aumentar produção de lipídeos (LIU *et al.*, 2011). Com a constante busca por fontes de energias renováveis e sustentáveis, cianobactérias e microalgas vem se consolidando neste cenário como fontes promissoras de biocombustíveis, sendo economicamente mais eficiente e implicando em um menor impacto ao meio ambiente, quando comparado ao uso plantas convencionais como cana-de-açúcar e soja (LI *et al.*, 2008). O cultivo de microalgas e cianobactérias também representa menor impacto sobre áreas terrestres de plantio, não representando concorrência ao plantio de alimentos, o que pode elevar o custo destes. O óleo de microalgas aparece então como uma fonte mais sustentável para obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais (CHISTI, 2008). Além disso, as cianobactérias também contêm açúcares e carboidratos que podem ser fermentados para produção de etanol (DEXTER & FU, 2009).

Os ácidos graxos também constituem importantes marcadores quimiotaxonômicos para classificação de procariotos. Cohen *et al.* propuseram que o perfil de ácidos graxos permitem dividir as cianobactérias em cinco grupos (COHEN *et al.*, 1995) de acordo com a produção de determinados ácidos graxos poli-insaturados. Para sobreviver em ambientes extremos, as cianobactérias desenvolveram sistemas regulatórios específicos e os lipídeos tem um papel vital na tolerância a muitos estresses fisiológicos. É importante também o seu papel na manutenção da integridade da membrana. Esta integridade é a principal forma de resistência à dessecação (CROWE & CROWE, 1992). Foi observado que um aumento de insaturações de ácidos graxos na membrana aumenta a tolerância a estresse salino em

Synechococcus (TASAKA *et al.*, 1996). As cianobactérias também respondem a variações de temperatura no ambiente modificando o conteúdo de insaturações nos lipídeos da sua membrana. A presença de ácidos graxos insaturados aumenta a fluidez da membrana, cujo aumento pode ser utilizado pra compensar a diminuição da fluidez em baixas temperaturas (MURATA & NISHIDA, 1987). O aumento na quantidade de insaturações nos lipídeos da membrana também pode estar ligada a tolerância à foto-inibição. Altas intensidades luminosas causam danos ao aparato fotossintético pela destruição da proteína D1 do fotossistema II (PSII). O aumento das insaturações na membrana foi correlacionado com uma recuperação mais rápida do PSII, permitindo maior tolerância ao estresse (GOMBOS *et al.*, 1997).

Entretanto, apesar do conhecimento do potencial de aplicação desses metabólitos, são necessários muitos estudos envolvendo não só as biomoléculas produzidas em si, como também torna-se necessário conhecer os fatores que interferem na produção, relacionados tanto ao organismo quanto ao meio. Os principais fatores ligados ao meio, que podem influenciar a produção e rendimento de metabólitos secundários são temperatura, intensidade luminosa e disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Dessa maneira, o estudo desses fatores é fundamental para se alcançar uma produção ótima dos metabólitos de interesse, sem causar limitação de crescimento celular (KAEBERNICK *et al.*, 2001).

2.3.2 Peptídeos em cianobactérias

Cianobactérias podem produzir um elevado número de oligopeptídeos que são presumidamente sintetizados por vias biossintéticas da enzima peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS). Em estudo envolvendo amplificação de genes em 146 cepas axênicas da Pasteur Culture Collection (PCC, Institut Pasteur), representando 35 diferentes gêneros, foi encontrado o gene para a enzima NRPS na maioria das cepas, principalmente em filamentosas (CHRISTIANSEN *et al.*, 2001). Muitos destes peptídeos são biologicamente ativos, e muitos ainda desconhecidos. A grande diversidade de moléculas já descritas desperta grande interesse para estudos sobre aplicações biotecnológicas destes metabólitos bem como conhecer as funções destas moléculas no próprio organismo. Algumas moléculas são descritas como cianopeptídeos (*CNPPTs*) com atividades de inibição de vários sistemas enzimáticos. Cerca de 600 destas moléculas foram descritas até 2006 (WELKER *et al.*, 2006a). Os estudos envolvendo cianopeptídeos são cada vez mais frequentes em razão do seu potencial para uso biotecnológico e farmacêutico. A Tabela 3 apresenta uma relação de *CNPPTs* de cianobactérias já descritos, as espécies identificadas como produtoras e as possíveis ações ou potencial farmacológico destes.

Tabela 3 – Peptídeos de cianobactérias já descritos na literatura.

Peptídeos	Espécie	Ações farmacológicas ou tóxicas
ANBPPT ¹ A	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Inibidor de proteases (tripsina, quimotripsina, trombina, plasmina, elastase, leucina, aminopeptidase e papaína) e proteínas fosfatases 1 e 2 ^a
ANBPPT ¹ B	<i>A. flos-aquae</i> , <i>Microcystis sp.</i> , <i>Oscillatoria agardhii</i>	Atividade de relaxamento dose-dependente da constrição do endotélio da artéria aorta induzido por norepinefrina, inibidor de protease.
ANBPPT ¹ E	<i>O. agardhii</i>	Atividade inibidora de protease carboxipeptidase A
ANBPPT ¹ F	<i>A. flos-aquae</i> , <i>Microcystis sp.</i> , <i>Planktothrix sp.</i> , <i>O. agardhii</i>	Inibidor de proteína fosfatase PP1 e PP2
ANBPPT ¹ G e ANBPPT ¹ H	<i>O. agardhii</i>	Atividade inibidora de protease carboxipeptidase A
ANBPPT ¹ I e ANBPPT ¹ J	<i>A. flos-aquae</i>	Atividade inibidora de protease carboxipeptidase A
ANBPPT ¹ T	<i>O. agardhii</i>	Atividade inibidora de protease carboxipeptidase A
AERUG ² 298-A	<i>M. aeruginosa</i>	Inibidor de proteases
AERUG ² 98-A e AERUG ² B	<i>M. aeruginosa</i>	Inibidor de proteases incluindo trombina
AERUG ² 205 A e AERUG ² B	<i>O. agardhii</i>	Inibidor de tripsina
Laxaphycinas A e E	<i>O. agardhii</i>	Atividade antifúngica
Majusculamida C	<i>M. aeruginosa</i>	Atividade anticâncer e inseticida
Microcystilide A	<i>M. aeruginosa</i>	Promotor da diferenciação celular
Micropeptina A e B	<i>M. aeruginosa</i>	Inibidor de proteases
Micropeptina 90	<i>M. aeruginosa</i>	Inibidor de proteases
Microviridina B e C	<i>M. aeruginosa</i>	Inibidor de proteases
Oscillapeptin	<i>O. agardhii</i>	Inibidor de proteases

Descrição: ¹ Anabaenopeptina. ² Aeruginosina. Adaptado de SAMPAIO et al., 2011.

Quanto a produção de cianopetídeos em linhagens brasileiras, recentemente, foi confirmada a produção de duas novas microgininas em duas linhagens de *M. aeruginosa* brasileiras (CARNEIRO *et al.*, 2012). Para aeruginosinas, *Microcystis aeruginosa*, *Sphaerocavum brasiliensis* e *Nostoc commune* aparecem como produtoras destas moléculas (SILVA-STENICO *et al.*, 2011). Anteriormente haviam sido identificadas duas possíveis aeruginosinas em *Radiocystis feernandoi* (LOMBARDO *et al.*, 2006) e anabaenopetinas em um evento de floração no Rio Grande do Sul (CARVALHO *et al.*, 2008). Apesar do conhecimento da existência dessas moléculas, e também de nos últimos anos os genes envolvidos na sua produção estarem sendo elucidados, ainda são pouco conhecidos os fatores ambientais que influenciam sua produção (BAKER *et al.*, 2013). Como citado anteriormente, luz e nutrientes são fatores controladores de crescimento em cianobactérias e podem ser um importante ponto de partida para o conhecimento da produção destas moléculas em linhagens brasileiras.

2.4 Espectrometria de Massas em estudos de ativos de cianobactérias

O uso de técnicas de espectrometria de massas tem crescido rapidamente nos últimos anos, devido principalmente ao surgimento de novos e mais modernos instrumentos. Com os avanços das técnicas, permitindo o acoplamento direto a técnicas cromatográficas, a espectrometria de massas tem atualmente um notável papel em estudos e trabalhos analíticos tendo amplo uso principalmente em estudos na área de proteômica, metabolômica, descobrimento de novas drogas, além de inúmeras aplicações rotineiras no

campo forense, de monitoramento de poluentes e de controle físico-químico de processos (PETROVIĆ *et al.*, 2005; RUBAKHIN *et al.*, 2005; DETTMER *et al.*, 2007; MAURER, 2007). O princípio dos métodos de espectrometria de massas envolve a produção de íons em fase gasosa a partir da amostra, em uma fonte de ionização. Em seguida, no analisador de cargas, ocorre separação desses íons baseado na sua razão massa-carga. Nesta etapa pode haver fragmentação dos íons e esses fragmentos serem analisados em um segundo analisador. A abundância desses íons é medida então por um detector que converte os íons em sinais elétricos (HOFFMANN, 1996).

A necessidade de monitorar os reservatórios de água potável para a presença de cianotoxinas é um fator de crítica importância para a saúde pública. A aplicação de técnicas de espectrometria de massas para este fim tem crescido rapidamente devido a necessidade de métodos sensíveis, específicos e capazes de detectar vários tipos de molécula em uma amostra. Técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), com fonte de ionização do tipo eletrospray (ESI) vem sendo aplicadas como poderosas técnicas para análise de cianotoxinas, em nível de traços, desde o fim da década de 80 até hoje (QUILLIAM *et al.*, 1989; PLEASANCE *et al.*, 1992; HORMAZÁBAL *et al.*, 2000). Mais recente, também começaram a serem empregadas técnicas de MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time-of-Flight Mass Analyzers) para análise de cianotoxinas (WELKER *et al.*, 2002).

MALDI, ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz, foi introduzida em 1988 (KARAS & HILLENKAMP, 1988) e tem se tornado uma poderosa ferramenta de ampla aplicação para a produção de íons intactos em

fase gasosa de uma variedade de compostos não-voláteis e termicamente instáveis como proteínas, oligonucleotídeos, polímeros e outros diversos compostos (HOFFMANN, 1996). O MALDI se destaca por ser uma técnica de fácil preparo da amostra e dispensa sistemas de separação cromatográficos tornando o tempo de análise bem menor. As matrizes típicas do MALDI são geralmente ácidos orgânicos, aromáticos, e de baixo peso molecular como o ácido α -ciano- 4- hidroxicinâmico (HCCA, 189.17 Da) e o ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DHB, 154.15 Da). MALDI é considerada uma técnica de ionização pulsada que produz íons em feixes. Isto o torna uma técnica adequada para ser acoplada com analisadores de massas do tipo TOF (time of flight) que envolvem a separação de íons de acordo com a massa medindo seu tempo de voo. Além disso, os analisadores TOF possuem como característica a capacidade de analisar íons de um com uma ampla faixa de massas e, portanto, são apropriados para detectar os íons de alta massa gerados pelo MALDI. A importância da técnica de MALDI-TOF foi reconhecida em 2002 quando o cientista Koichi Tanaka ganhou o Prêmio Nobel em Química por desenvolver o método de ionização/dessorção para análises de espectrometria de massas em macromoléculas biológicas utilizando MALDI-TOF (TANAKA, 2003). Desde então tem crescido muito o número de trabalhos empregando esta técnica em estudos proteômicos e metabolômicos permitindo também a identificação de novas moléculas (ERHARD *et al.*, 1997; DURHAM, 2002; WELKER *et al.*, 2006b). Outra aplicação importante das técnicas de MALDI-TOF está no seu uso para identificação de micro-organismos. Esta aplicação já tem sido empregada para bactérias (VAN BAAR, 2000; KEYS *et al.*, 2004). O perfil metabólico mostrado pelo espectro de massas, e característico para

determinada espécie constitui seu *fingerprinting* metabólico. A criação de um banco de dados com estes perfis de espectros de massas de MALDI-TOF característicos para cada espécie permite uma identificação rápida e precisa de espécies. Esta aplicação é bastante útil para identificação de bactérias patogênicas e tem grande potencial de aplicação e extensão dentro do campo da microbiologia, podendo ser uma ferramenta útil para identificação e diferenciação de espécies de cianobactérias. Neste trabalho foram avaliados o perfil de ácidos graxos com identificação e o perfil geral de peptídeos de alta massa molecular comparando diferentes condições de cultivo com variações na fonte de nitrogênio e na intensidade luminosa, sendo possível observar algumas diferenças que são discutidas junto dos resultados ao final do texto.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o crescimento e produção de metabólitos por *Sphaerospermopsis torques-reginae* frente a variações de condições de cultivo (fonte de nitrogênio e intensidade luminosa).

Objetivos específicos:

- 1- Avaliar o crescimento e variação de pigmentos em uma linhagem de *S. torques-reginae* frente a variação de nitrogênio no meio e da intensidade luminosa.
- 2- Avaliar o perfil de ácidos graxos por GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry) em uma linhagem de *S. torques-reginae* frente a variação de nitrogênio e intensidade luminosa.
- 3- Avaliar o perfil de peptídeos pelo espectro de massas obtido por MALDI-TOF em uma linhagem de *S. torques-reginae*, frente a variação de nitrogênio no meio de cultivo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha da linhagem de *Sphaerospermopsis torques-reginae*

Neste trabalho está sendo utilizada uma linhagem produtoras de anatoxina-a(s) de *Anabaena spiroides* (ITEP24), a qual é mantida na coleção de culturas do Laboratório de Produtos Naturais e Toxinas de Algas da Universidade de São Paulo. Esta cepa foi isolada do reservatório Tapacurá – PE, Brasil, (MOLICA *et al.*, 2005) e cedida pelo professor Renato José Reis Molica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recentemente a cepa foi reclassificada como *Sphaerospermopsis torques-reginae* (WERNER *et al.*, 2012). A confirmação da produção de anatoxina-a(s) por esta linhagem é monitorada por ensaios de inibição de AChE *in vitro* e foi confirmada por LC-MS/MS (MOLICA *et al.*, 2005; DÖRR *et al.*, 2010a).

4.2 Manutenção das linhagens

O meio de cultura utilizado para a manutenção da linhagem *S. torques-reginae* é o meio ASM-1 descrito por (GORHAM *et al.*, 1964) e modificado (Tabela 4). A modificação é o acréscimo de molibdênio na forma $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em concentração 0,39 mg/L de cultura. Este micronutriente é considerado essencial na atividade da nitrogenase (REYNOLDS, 2006). As culturas são mantidas em frasco erlenmeyers de 50 mL, em meio esterilizado,

pH inicial 8,0, sem aeração, temperatura de 24 ± 1 °C sob intensidade luminosa de $22 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 10:14h escuro:claro.

Tabela 4. Composição do meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964).

Composição	Concentração (mg/L)	Composição	Concentração (mg/L)
Solução A		Solução C	
NaNO ₃	1700	H ₃ BO ₃	2,48
MgSO ₄ . 7H ₂ O	490	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,39
MgCl ₂ . 6H ₂ O	410	FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,08
CaCl ₂ . 2H ₂ O	290	ZnCl ₂	0,335
		CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,0019
		CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0014
Solução B		Solução D	
KH ₂ PO ₄	174	Na ₂ EDTA	7,44
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	356		

4.3 Avaliação dos efeitos do nitrogênio

Foram realizados experimentos para a avaliação do crescimento em diferentes condições de nitrogênio. Serão usadas as seguintes siglas para as condições avaliadas: NO₃⁻ – condição com nitrato (na forma de NaCl); S/N – condição sem nitrogênio; NH₄⁺ – condição com amônio (Na forma de NH₄Cl). A cepa ITEP 24 que foi inoculada em condições controle (NO₃⁻), sem nitrogênio (S/N) e amônio (NH₄⁺), todos adicionados com molibdênio, e colocadas para crescer em frascos Erlenmeyers de 2 L com 1,5 L de meio. Foi usado sistema

de aeração e cultivado sob intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e condições de temperatura e fotoperíodo mantidas iguais às condições de manutenção. A cepa foi inoculada para adaptação em 3 frascos erlenmeyers de 200 mL em meios de cultivo nas condições citadas. Foram então colocados pra crescer por aproximadamente 15 dias. Após esse período todo o volume dos frascos em crescimento foi inoculado novamente em 3 novos Erlenmeyers de 500 mL e após novos 15 dias foi inoculado em frasco de 1 L. Estas trocas de meio e reinício de culturas foram necessárias para garantir a adaptação das culturas, uma vez que modificamos tanto a composição do meio (variações do nitrogênio) e a intensidade luminosa que passou a ser $100 \mu\text{mol fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para o experimento. As células adaptadas foram inoculadas nas condições NO_3^- , S/N e NH_4^+ , com concentração inicial de 3×10^5 células por mL. Acompanhou-se o crescimento durante 18 dias e a cada 3 dias, alíquotas foram coletadas para avaliação do crescimento e produção clorofila-a e carotenoides totais. A porcentagem de heterócitos foi avaliada a cada 6 dias, onde 30 filamentos aleatórios foram observados em lâmina em microscópio óptico com aumento de 100x. Foram anotados os números totais de células vegetativas e heterócitos e feito o cálculo de representação em porcentagem do número de heterócitos frente ao número total de células contadas. No 18º dia de cultivo, o volume restante dos cultivos, aproximadamente 1L da cultura, foi centrifugado e as células precipitadas foram recolhidas e secas por liofilização para posterior análise de metabólitos secundários.

4.4 Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa

A linhagem ITEP24 foi avaliada para os efeitos da intensidade luminosa (IL) sobre o crescimento. Segundo a literatura, a IL ótima para linhagens de *Anabaena* fica em torno de $200 \mu\text{mol fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (LEE & RHEE, 1999). Como não sabemos a IL ótima para *Sphaerospermopsis* utilizamos este valor como ponto de partida. Foram avaliadas IL's acima e abaixo deste valor. Os procedimentos experimentais foram os mesmos descritos para avaliação dos efeitos do nitrogênio, mantendo nitrato como fonte de nitrogênio. Foram acompanhadas as variações no crescimento.

4.5 Determinação do crescimento celular em hemocitômetro

O crescimento celular foi acompanhado através da contagem de células, com o auxílio de microscópio óptico, em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, estimando-se o número de células/mL. Nos experimentos, a cada 72h foi retirada uma pequena alíquota de cultura e colocada em uma lâmina de observação microscópica, para que fosse estimado o diâmetro médio de 90 células, em imersão. Os comprimentos dos filamentos foram mensurados em hemocitometro e o número de células contado correspondeu ao somatório dos comprimentos dos filamentos, dividido pelo tamanho médio de uma célula (CARNEIRO *et al.*, 2009).

Para determinação da fase exponencial do crescimento, regressões exponenciais foram aplicadas a variação do número de células pelo tempo. A

duração da fase exponencial foi aquela onde a regressão apresentava aderência de dados de pelo menos 95% ou $R^2 \geq 0,95$ (CARNEIRO *et al.*, 2012). O crescimento foi avaliado como taxa intrínseca de crescimento, pela equação da regressão exponencial [1], de acordo com Reynolds (2006).

$$[1] N = N_0^{rn.t},$$

Onde N é o número de células no tempo t , N_0 é o número inicial de células e rn é a taxa intrínseca de crescimento.

4.6 Extração e análise de clorofila-a e pigmentos acessórios

As variações de clorofila-a (Chl-a) e carotenóides foram acompanhadas por análise em espectrofotômetro óptico (Thermo Fisher Scientific – FL – Estados Unidos) (Nusch, 1980; Lorenzen, 1967). As alíquotas coletadas foram filtradas em filtros de borosilicato (AP-20 – 13mm diâmetro – Millipore) para retenção das células. Os filtros contendo as células foram armazenados em eppendorfs âmbar em freezer -20 °C até o momento de serem analisados. A extração da Chl-a e dos carotenóides foi feita com adição de 3 mL de solução de etanol 90% sobre os filtros transferidos para um tubo de ensaio, até cobertura total do filtro. Em seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 78-80 °C por 5 minutos. Em seguida os tubos com as amostras foram cobertos com papel alumínio e mantidos em geladeira (4 °C) durante 18h. Após o tempo de extração, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi então separado para continuar a análise.

Em seguida são feitas no espectrofotômetro leituras a 665nm para avaliar clorofila e a 750nm para correção da turbidez. Após estas duas primeiras leituras as amostras foram acidificadas com 100 µL de HCl 0,1M para cada 1mL de amostra extraída e após 2 minutos de exposição foram feitas novas leituras a 665nm e 750nm. Para obter a estimativa de carotenoides foi realizada também leitura a 480 nm. Para os cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/L}) = (29,5 \times (A_{665} - A_{665ac}) \times v) / (V \cdot L)$$

A_{665} : absorbância a 665nm antes da acidificação - absorbância a 750nm antes da acidificação

A_{665ac} : absorbância a 665nm após a acidificação - absorbância a 750nm após a acidificação

v: volume de etanol usado para a extração

V: volume de água filtrado em L

L: largura da cubeta em cm

$$\text{Carotenóides (mg/L, aproximação)} = 10 A_{480} \cdot v / (V \cdot L)$$

A_{480} : absorção a 480nm – 3 x absorção a 750nm

v: volume de etanol usado para a extração

V: volume de água filtrado em L

L: largura da cubeta em cm

4.7 Análise de lipídeos por GC-MS

As culturas do final dos experimentos para avaliação do nitrogênio e IL (18 dias) foram centrifugadas a 7000 rpm (centrífuga 5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as

amostras concentradas foram liofilizadas (Liotop L101, Liobras, São Carlos, SP, Brasil).

30 mg de biomassa seca foram pesados em balança analítica (APX-60, Denver Instrument, Arvada, CO, EUA) e ressuspensos em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) e os lipídeos totais extraídos através de um método modificado de Bligh & Dyer (1959). Um mL de clorofórmio contendo 1 mM BHT e 2 mL de metanol (1:2, v/v) foram adicionados e a mistura foi vigorosamente agitada em vortex (Vortex-Genie® 2, Scientific industries, NY, EUA). 1 mL de clorofórmio e 1 mL de água ultrapura foram posteriormente adicionados e, após agitação, mais 1 mL de clorofórmio adicionado. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min e a fase orgânica (clorofórmio) transferida para um tubo de extração. A fase aquosa foi submetida a 2 novas etapas de extração com 1 mL de clorofórmio. O solvente foi evaporado sob nitrogênio. As análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.7.1 Extração, análise e quantificação de ácidos graxos

O óleo resultante da extração de lipídeos foi derivatizado e os ácidos graxos analisados como metil-ésteres (FAMES). A transesterificação foi promovida através da adição de 1,8 mL de uma solução metanólica de HCl 5%. Também foram adicionados 200 μ L de clorofórmio contendo ácido nonadecanoico, que não é produzido por cianobactérias, como padrão interno. O tubo foi mantido em banho aquecido a 100 °C por 15 min. 1 mL de hexano e 1 mL de água ultrapura foram adicionados à mistura arrefecida. O tubo foi

vigorosamente agitado por 1 min e as fases aquosa e orgânica separadas por centrifugação a 5000 rpm por 15 min. A fase orgânica foi transferida para um vial âmbar para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

As análises dos ácidos graxos foram realizadas em um GC-MS (5975C inert XL EI/CI MSD, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Os compostos foram separados em uma coluna capilar CP8824 (60 m × 250 µm × 0,25 µm; Agilent Technologies). A programação de temperatura do forno foi 50 °C a 130 °C a 20 °C/min, e em seguida de 130 °C para 220 °C a 5 °C/min, mantidos por 10 minutos, com um tempo total de corrida de 33 minutos.

O gás hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL/min. As injeções foram realizadas no modo split, com uma razão de 1:10, e o volume de injeção foi de 1 µL. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram mantidas em 220 e 240 °C, respectivamente. A ionização foi promovida por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, e a varredura (full scan) feita na faixa de 50-450 m/z. A temperatura da fonte de íons foi mantida a 280 °C.

A identificação dos compostos foi baseada no tempo de retenção e comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis nas bibliotecas NIST 08 e NIST 08s e injeções com padrão analítico comercial 21 (37 Component FAME Mix, Supelco). A quantificação relativa foi feita automaticamente pela integração dos picos cromatográficos obtidos.

4.8 Extração e análise por MALDI-TOF

Para esta análise foram usadas amostras centrifugadas e liofilizadas ao final do experimento de avaliação do nitrogênio. Aproximadamente 1 mg de extrato seco de cada amostra foi pesado e ressuspenso em 1 mL de solução solvente TA30 (30:70 [v/v] acetonitrila : 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água). Todas as amostras foram analisadas em matriz saturada de ácido α -ciano- 4- hidroxicinâmico (HCCA) solubilizado em solução TA30. 1 μ L de amostra diluída foi misturado com 1 μ L da solução saturada de HCCA e 0,5 μ L da mistura foi aplicado em placa (MTP 384 target plate polished steel T F, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Após depósito das amostras, a placa foi deixada em capela para secar a temperatura ambiente. A matriz HCCA é utilizada preferencialmente para ionizar peptídeos e proteínas de baixa massa molecular. Como calibrante foi usada uma solução de peptídeos. A placa foi colocada para análise em sistema MALDI-TOF/TOF (Autoflex Speed, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com laser de nitrogênio 337 nm do tipo smartbeamTM-II com frequência de 1 kHz. Os íons foram acelerados com voltagem de 19,47 kV e foi usado um delay (delayed-extraction) eletrônico de 200 ns para melhorar a resolução. Os espectros foram obtidos na faixa com relações massa/carga de 2 kDa a 20 kDa sob configurações especificamente otimizadas do instrumento. Para o Autoflex Speed, a placa é colocada na fonte, por um suporte móvel que permite alterações na localização do ponto da amostra a ser analisado pelo laser. O instrumento também é equipado com uma câmera para observar esta área alvo na superfície da placa. Cada espectro foi resultado do disparo do laser em 6 diferentes áreas de cada amostra analisada resultando em um espectro médio para cada. Os espectros

foram analisados com auxílio do programa FlexAnalysis (Bruker, Bremen, Alemanha). Foi obtida a lista de massas para cada amostra e os picos de massas encontrados foram sobrepostos para serem avaliados quanto às diferenças no perfil geral de íons observados em cada condição avaliada. Os íons presentes especificamente para determinada condição foram agrupados e apresentados.

4.9 Análise estatística

Para construção dos gráficos foi utilizado pacote estatístico do programa SigmaPlot® 10.0 e Minitab® 16.1.0. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio de pacote estatístico do programa Minitab® 16.1.0. Para testar a normalidade de distribuição dos dados, foram usados os testes de Kolmogorov-Smirnov e para testes de homocedasticidade foi utilizado teste de Levene. Quando os dados foram classificados como não paramétricos, foi realizada comparação de 2 ou mais médias pelo teste Kruskal-Wallis (KW). Para os dados considerados paramétricos, foram utilizados testes de análise de variância (ANOVA) seguidos de teste de Tukey para comparação múltipla de médias. O nível descritivo (P valor) foi utilizado como principal parâmetro avaliado nos resultados testes para interpretação dos resultados obtidos.

5. Resultados e discussão

5.1 Avaliação dos efeitos do Nitrogênio

5.1.1 Efeitos sobre o crescimento

As curvas de crescimento para as condições de nitrogênio estão apresentadas na figura 3.

Figura 3 – Curvas de crescimento de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP 24) exposta à diferentes fontes e ausência de nitrogênio no meio de cultura. NO₃⁻, condição de nitrato (manutenção); S/N, sem nitrogênio; NH₄⁺, condição de amônia. (n=3)

As células cultivadas na condição NO₃⁻ cresceram exponencialmente até o 15º dia de cultivo ($R^2=0,9803$), com taxa de crescimento de $0,2884 \pm 0,02.\text{dia}^{-1}$.

1. Na condição S/N, também foi observado crescimento exponencial até o 15º

dia ($R^2=0,9693$) com taxa de crescimento de $0,1394 \pm 0,02.\text{dia}^{-1}$. Estes dados indicam inibição do crescimento na condição S/N em relação a NO_3^- ($p=0,000$). Após o 12º dia de crescimento, a diminuição do número de células evidencia entrada em fase de senescência, nesta condição. Não foi possível observar um período de crescimento exponencial para a condição NH_4^+ (Figura 3). Apesar do inóculo inicial para adaptação na condição NH_4^+ ter crescido até o dia do inóculo para início da curva de crescimento, após inoculado e iniciadas as contagens, as células nesta condição não conseguiram se desenvolver além do 6º dia, quando morreram e foi encerrada a contagem para a condição NH_4^+ . Não foi observada morte celular durante a fase de adaptação na condição NH_4^+ . Neste período elas cresceram por pelo menos 15 dias, quando foi feito novo inóculo a partir destas células adaptadas. Este fato sugere que os efeitos do nitrogênio na forma de amônio podem ser mais negativos sobre o crescimento do organismo após um tempo maior de exposição a esta fonte. Quando as células inoculadas são provenientes de um meio adaptado com nitrato, os efeitos negativos não foram tão imediatos.

Levando em conta valores sugeridos para IL ótima para *Anabaena* (LEE & RHEE, 1999), a IL utilizada foi de $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, de modo a não limitar as culturas por luz. A condição com amônia foi escolhida, pois o íon amônio é mais solúvel, portanto menos volátil que o nitrogênio (REYNOLDS, 2006). Além disto, alguns estudos relatam o amônio como forma preferencial de obtenção de nitrogênio para alguns grupos fitoplanctônicos, em particular em espécies diazotróficas (REYNOLDS, 2006) e também porque tipicamente pode estar presente em superfícies de águas despoluídas, embora raramente em excesso (TUNDISI *et al.*, 2008). As cianobactérias são capazes de

assimilarem diversos tipos de compostos contendo nitrogênio como amônio, nitrato, ureia e N_2 . No entanto a forma de utilização pela célula é o amônio, no qual as outras formas são transformadas por reações catalizadas por enzimas. Quando crescidas em presença de amônio no meio, este exerce uma regulação negativa sobre a expressão dos genes que codificam permeases e enzimas para assimilação de fontes alternativas de nitrogênio (LUQUE *et al.*, 1994; HERRERO *et al.*, 2001). Este fato pode explicar a dificuldade de crescimento na condição NH_4^+ do experimento, já que após consumir o amônio do meio, o organismo pode estar inviável para assimilação de outras formas alternativas de nitrogênio.

5.1.2 Formação de heterócitos

Os resultados das estimativas das porcentagens de heterócitos em relação a células totais em cada dia avaliado estão representados na forma de gráficos nas figuras 4 e 5 para as condições NO_3^- e S/N respectivamente.

Figura 4 – Variação da porcentagem de heterócitos em relação a células totais de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP 24) contado de 30 filamentos aleatórios, em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio. A marcação central ligada por uma linha representa a média (n=3)

Figura 5 – Variação da porcentagem de heterócitos em relação a células totais de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP 24) contado de 30 filamentos aleatórios, em meio sem nitrogênio. A marcação central ligada por uma linha representa a média (n=3)

Na condição NO_3^- , os valores médios de porcentagens de heterócitos mais baixo e mais alto foram de 0,41% (dia zero) e 0,867% (dia 6) respectivamente (Figura 4). Na condição sem nitrogênio os mesmos valores mínimo e máximo medidos foram de 4,15% (dia zero) e 6,81% (dia 18) respectivamente (Figura 5). Em ambas as condições é possível ver uma tendência de aumento na formação de heterócitos ao longo do tempo a partir do inóculo no tempo zero, mostrando a capacidade de adaptação do organismo a necessidade de nitrogênio. Este resultado é esperado, pois já foi demonstrado que na fase inicial de um crescimento exponencial rápido a taxa de heterócitos normalmente diminui, e tende a aumentar com o tempo até entrar em fase de senescência (FOGG, 1944), onde esse aumento pode ser em razão do consumo do nitrogênio presente no meio, e a necessidade de recorrer ao nitrogênio atmosférico para compensar esse consumo.

Em todos os tempos avaliados, os valores de porcentagem de heterócitos são significativamente maiores ($P=0,000$) nos cultivos da condição sem nitrogênio. É esperado que heterócitos sejam mais abundantes em cultivos que estão ativamente fixando nitrogênio, e que os cultivos que contem fontes de nitrogênio tenham poucos heterócitos (NEILSON *et al.*, 1971). Esta diferença significativa justifica a boa adaptação da linhagem na condição de ausência de nitrogênio. A maior diferenciação de heterócitos, apesar de poder levar a redução da taxa de crescimento, permite que a cianobactéria sobreviva mais tempo nessas condições. Visualmente, os cultivos estavam com coloração verde intensa, e as células se mostraram saudáveis observadas em microscópio óptico, sendo comparável a condição controle.

Os cultivos na condição NH_4^+ apresentaram inibição da formação de heterócitos nos tempos onde foi possível analisar, antes da perda do cultivo. A inibição da formação de heterócitos observada neste grupo demonstra o efeito inibitório sobre outras vias de assimilação de nitrogênio provocado pela exposição das células ao amônio, como exposto no item 4.1.1.

5.1.3 Produção de clorofila-a e pigmentos acessórios

A variação da concentração por célula de clorofila-a e carotenoides (fg.cel^{-1}) está representada na forma de gráficos na figura 6.

B

C

Figura 6 - Variação da cota celular de pigmentos fotossintéticos, clorofila-a e carotenoides em *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP24) exposta a diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura. **A.** condição com nitrato (NO_3^-); **B.** condição sem nitrogênio (S/N). **C.** condição com amônio (NH_4^+). (n=3)

Para as condições NO_3^- e S/N observou-se o estímulo da síntese simultânea de clorofila-a e carotenóides totais até o tempo 6, sendo o estímulo maior para a condição S/N ($p < 0,01$; Fig. 6A e B). Para ambas as condições, após o tempo 12 observa-se aumento na produção de carotenoides totais enquanto a concentração de clorofila diminui. Na condição NH_4^+ , observa-se um expressivo aumento inicial na produção de carotenoides em relação à

clorofila-a (Fig. 6C). A análise de pigmentos pode fornecer informações sobre o funcionamento do aparato fotossintético em determinadas condições (NELSON *et al.*, 2008). Sempre que observamos o aumento na concentração de carotenoides em relação à clorofila-a, há indícios de limitação por luz ou por algum outro estresse. Os mecanismos de efeitos do nitrogênio sobre estes parâmetros ainda não estão claros, mas o fato do aumento expressivo dos carotenoides sugere stress sobre as células em ambas as condições de mudança da fonte nitrogênio. O aumento de carotenoides pode significar um gasto energético e explicar a diminuição do crescimento na condição S/N.

5.2 Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa

5.2.1 Efeitos sobre o crescimento

As curvas de crescimento para as diferentes condições de intensidades luminosas, 50, 150 e 250 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (IL-50, IL-150 e IL-250 respectivamente) estão representadas nas figuras 7.

Figura 7 – Curvas de crescimento de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP 24) cultivada sob diferentes intensidades luminosas: 50, 150 e 250 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. (n=3)

A cepa ITEP 24 (Fig. 7), cultivada nas condições IL-50 e IL-150 cresceu exponencialmente até o 18º dia de cultivo ($R^2=0,9619$ e $R^2=0,9554$), com taxa de crescimento de $0,113 \pm 0,02.\text{dia}^{-1}$ e $0,1354 \pm 0,02.\text{dia}^{-1}$ respectivamente. Na condição IL-250, também foi observado crescimento exponencial até o 15º dia ($R^2=0,9522$) com taxa de crescimento de $0,1596 \pm 0,02.\text{dia}^{-1}$. Após o 15º dia houve queda do número de células indicando entrada em fase de morte celular.

A menor taxa de crescimento foi observada para a cepa crescida na intensidade 50 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No entanto esta taxa foi considerada estatisticamente menor que a crescida na intensidade 250 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, que foi a maior observada. Na intensidade de 150 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ as taxas de crescimento apresentaram valores intermediários e estatisticamente iguais as outras (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado de comparação das médias dos valores de taxas de crescimento de *S. torques-reginae* (Itep24) cultivada em diferentes intensidades luminosas (50, 150 e 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$).

<u>Condição</u>	<u>Média</u> <u>(taxa de crescimento)</u>	<u>Grupos</u> (obtidos por teste de Tukey)*	
Itep24-250	0,15863	A	
Itep24-150	0,1353	A	B
Itep24-50	0,11305		B

*Médias de grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

A quantidade de luz que uma cianobactéria requer para crescer é variável entre diferentes espécies e está associada com sua eficiência na utilização da luz (REYNOLDS, 2006). Não existem na literatura, trabalhos envolvendo comparações de crescimento em diferentes condições de luz para a espécie *Sphaerospermopsis*. Em estudos envolvendo cianobactéria do gênero *Anabaena* foi observado que em baixas intensidades de luz as taxas de crescimento são menores, tendo um máximo em uma faixa intermediária, onde as taxas são maiores, voltando a diminuir em intensidades mais altas até a saturação luminosa (LEE & RHEE, 1999). No trabalho citado, observou-se taxas ótimas de crescimento em torno de 100 $\mu\text{mol.f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Em valores um pouco maiores já começou a ser observada redução das taxas. Comparado aos valores encontrados para *Sphaerospermopsis torques-reginae* neste estudo, observa-se que houve uma tendência a aumentar as taxas de crescimento com o aumento da intensidade luminosa, não parecendo haver fotoinibição acentuada até o valor máximo testado de 250 $\mu\text{mol.f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. No entanto, nos cultivos nessa intensidade alta houve envelhecimento precoce, com início de morte celular após o 15º dia, o que pode ter sido provocado por efeitos deletérios do excesso de luz. É conhecido que a exposição a altos

níveis de irradiância na superfície da água leva um estado foto-oxidativo com redução da atividade da enzima superóxido dismutase, responsável por eliminar espécies reativas de oxigênio (IBELINGS & WINDER, 1994). No ambiente, a intensidade da luz solar na superfície da água normalmente atinge valores bem superiores aos estudados. Portanto, a sobrevivência de uma espécie depende da habilidade dela de encontrar uma profundidade ótima através da regulação de sua flutuabilidade em resposta a intensidades luminosas (KROMKAMP & WALSBY, 1992). A linhagem estudada mostrou ser capaz de manter seu crescimento em uma boa faixa de valores de intensidade luminosa. Somado a capacidade de regular a flutuabilidade por meio dos aerótopos presentes em suas células e da sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, estas características podem fazer com que este organismo apresente vantagens significativas sobre outras espécies em um ambiente de competição natural entre organismos. No entanto, melhores estudos envolvendo mais parâmetros ambientais são necessários para uma avaliação mais conclusiva sobre o comportamento desta linhagem. Estudos sugerem que os efeitos da luz sobre as taxas de crescimento podem ser compensados pela composição de nutrientes de organismos eucariotos fitoplanctônicos (RHEE & GOTHAN, 1981). Para entender melhor este mecanismo importante para o sucesso ecológico desta espécie são necessários estudos sobre sua composição metabólica nas condições de interesse.

5.3 Análise de lipídeos por GC-MS

A composição de ácidos graxos das amostras de *S. torques-reginae* avaliadas sob variações da fonte de nitrogênio e da intensidade luminosa está resumida na tabela 6.

Tabela 6. Composição média (n=3) de ácidos graxos obtida de extrato celular liofilizado de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP 24), após 18 dias de cultivo sob diferentes fontes de nitrogênio: nitrato (NO_3^-) e sem nitrogênio (SN); e sob diferentes intensidades luminosas: 50, 150 e 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ácidos Graxos	Fontes de Nitrogênio		Intensidades Luminosas		
	NO_3^-	SN	50	150	250
SAFA's	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
16:0	36,4	44,15	51,645	54,36	45,12
18:0	4,82	6,73	7,58	8,72	12,59
MUFA's					
16:1 ω 7	10,18	10,11	11,09	11,17	8,01
18:1 ω 9	1,89	1,22	0,72	2,55	2,21
18:1 ω 7	7,14	3,41	9,84	7,48	19,72
PUFA's					
18:2 ω 6	5,06	5,89	2,19	3,18	2,58
18:3 ω 3	34,53	28,5	16,96	12,55	4,52
% total SAFAs	41,22	50,89	59,22	63,08	57,71
% total MUFAs	19,21	14,73	21,64	21,20	29,94
% total PUFAs	39,59	34,39	19,15	15,72	12,36

SAFAs: ácidos graxos saturados; **MUFAs:** ácidos graxos monoinsaturados; **PUFAs:** ácidos graxos poli-insaturados.

Com relação às variações na fonte de nitrogênio, não houve avaliação da condição NH_4^+ , pois os cultivos morreram antes do final do experimento. Em ambas as condições avaliadas o perfil de ácidos graxos foi semelhante, tendo sido identificados os mesmos ácidos graxos para as condições NO_3^- e S/N e também apresentando maiores quantidades dos ácidos 16:0 (36,4% e 44,15%) e 18:3 (34,53% e 28,5%). Quanto a classificação pelo número de insaturações,

os maiores teores encontrados são de ácidos graxos saturados (SAFAs), contendo os ácidos 16:0 e 18:0. Os menores teores foram de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) com os ácidos 16:1 ω 7, 18:1 ω 9 e 18:1 ω 7; e teores intermediários de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), com os ácidos 18:2 ω 6 e 18:3 ω 3. Para o ácido graxo 16:0, foi observado aumento significativo ($P=0,002$) da sua produção em relação aos outros identificados na amostra quando cultivado em meio sem nitrogênio. Esse ácido graxo tem aplicação na indústria cosmética na formulação de cremes. Em contraposição, na mesma condição S/N, é possível observar uma tendência de diminuição da produção do ácido graxo poli-insaturado 18:3 ω 3, que é de grande interesse para alimentação e combate a doenças cardiovasculares. Embora não tenha sido observada diferença estatística com $P=0,056$, este valor de nível descritivo P encontrado no teste foi próximo ao valor de nível de significância adotado no teste para se rejeitar as hipóteses de igualdade entre as porcentagens comparadas. Também parece haver uma tendência de diminuição do ácido graxo monoinsaturado 18:1 ω 7 em relação aos outros sem ter sido encontrada diferença estatística. Neste caso o resultado do teste está sendo influenciado por um alto desvio padrão para este ácido no grupo controle (NO_3^-). Para os demais ácidos graxos não foi observada diferença significativa entre a condição com nitrato e a sem nitrogênio.

Com relação às diferentes intensidades luminosas, também foi observado um perfil semelhante no conteúdo de ácidos graxos. Os ácidos identificados foram os mesmos observados nas amostras das condições de nitrogênio. O ácido encontrado em maior quantidade em todas as condições foi o 16:0. O ácido poli-insaturado 18:3 ω 3 foi o segundo mais abundante nas

condições de 50 e 150 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, tendo sido observada redução significativa ($P=0,007$) em relação aos outros na condição de 250. Na condição de menor intensidade luminosa (50), foi observada diminuição significativa ($P=0,012$) da produção do ácido 18:1 ω 9 em relação aos demais. Esse ácido graxo é utilizado como emoliente em formulações hidratantes. Na condição de intensidade 250, foi observada uma tendência de aumento na produção dos ácidos 18:0 e 18:1 ω 7 em relação aos demais, bem como uma menor produção relativa do ácido 16:1 ω 7. Entretanto essas diferenças não puderam ser evidenciadas por teste estatístico devido ao elevado desvio padrão decorrente do reduzido número de replicatas.

Os resultados encontrados de perfil de ácidos graxos para a linhagem de *S. torques-reginae* neste estudo é semelhante ao perfil descrito para algumas outras espécies de cianobactérias e microalgas (BEN-AMOTZ *et al.*, 1985; ROMANO *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2006). Em um estudo envolvendo algumas espécies de microalgas e outras de cianobactérias, foi avaliado o perfil de ácidos graxos em diferentes condições com concentrações de nitrogênio variando da saturação à carência do nutriente. Foi observado que para as espécies estudadas de microalgas houve uma variação significativa do perfil de ácidos graxos enquanto que para as espécies de cianobactérias não houve variações consideráveis (PIORRECK *et al.*, 1984). Esses resultados sugerem que microalgas possam ser organismos mais adequados para se cultivar quando a finalidade é a manipulação do cultivo para obtenção específica de ácidos graxos desejados, sendo que espécies de cianobactérias já se mostraram mais resistentes a variações das condições de cultivo. Em outro estudo envolvendo o cultivo de *Spirulina platensis* frente a variações de luz,

nitrogênio e temperatura, também foi observado que o perfil lipídico não se altera significativamente com variações de nitrogênio. Do mesmo modo não foram observadas alterações em intensidades luminosas de 170 a 860 μmol fótons. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Foram observadas alterações apenas quando foram testadas temperaturas de 25 a 38 °C, com redução da relação de ácidos graxos insaturados por saturados de acordo com o aumento da temperatura (TEDESCO & DUERR, 1989).

Quando se fala em obtenção de ácidos graxos a partir de óleos vegetais para produção de biodiesel, um dos fatores que representam maior problema é a presença de grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Estes, quando em quantidades elevadas, podem resultar em uma combustão inadequada do combustível, uma vez que são suscetíveis a sofrer processo de polimerização oxidativa e formar goma durante o armazenamento e também em condições de altas temperaturas e pressão como a que precede a combustão (PETERSON *et al.*, 1983). No presente estudo, foi observada uma taxa considerada elevada de PUFAs para a linhagem ITEP 24 de *S. torques-reginae*. No entanto, é interessante observar que existe uma correlação negativa entre o aumento da intensidade luminosa e a concentração total de PUFAs. Então, quando cultivada sob intensidades luminosas mais elevadas a cepa estudada parece produzir um óleo mais adequado para a produção de biodiesel, com relação à quantidade de PUFAs. Este fato, aliado as maiores taxas e maiores velocidades de crescimento observadas para as condições de maiores intensidades testadas, é um importante ponto de partida para estudos sobre produção de biodiesel a partir da espécie estudada. No entanto outros fatores ainda precisam ser estudados, como o teor total de

lipídeos produzido, para que se possa calcular a taxa de produção e comparar com outras cianobactérias e microalgas já estudadas. Por outro lado, os PUFA's encontrados nas amostras analisadas se tratam de importantes ácidos graxos essenciais com valor para as indústrias farmacêuticas e de alimentos. Para avaliar fins alimentícios, vale lembrar que se trata de um organismo produtor de uma potente cianotoxina, a anatoxina-a(s).

Comparando os perfis encontrados nos estudos com nitrogênio com aqueles encontrados nos estudos de intensidade luminosa, foram observadas diferenças significantes. No estudo com nitrogênio a intensidade luminosa utilizada é de $100 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, valor intermediário entre as duas condições de valores mais baixos de intensidades luminosas do outro estudo. As demais variáveis como temperatura, volume de cultivo, aeração e ciclo claro-escuro foram as mesmas para ambos estudos. A diferença parece mais evidente na porcentagem total de PUFA's, que foi mais expressiva durante a avaliação das fontes de nitrogênio. Uma variável que pode justificar esta diferença é o diferente período sazonal em que foram realizados os experimentos. O de nitrogênio foi realizado durante mês de maio, enquanto que o de intensidade luminosa foi realizado no mês de novembro. Já foram observadas diferenças no conteúdo de ácidos graxos de microalgas em estudo realizado com microalgas do ambiente (LÉVEILLÉ *et al.*, 1997). É necessário um estudo mais detalhado para estudar possíveis alterações sazonais que possam ocorrer em cianobactérias quando cultivadas.

Mesmo que estudos sugiram que a manipulação do perfil de ácidos graxos em cianobactérias não pareça tão viável quanto em microalgas, é importante ressaltar que o número de estudos deste tipo em cianobactérias é

consideravelmente inferior do que para microalgas, que possuem estudos metabolômicos há mais tempo. Estudos como o mencionado acima, utilizando *Spirulina platensis*, mostram que pode haver variações de ácidos graxos em determinadas condições, como houve ao se variar a temperatura de cultivo. Conforme comentado anteriormente, os resultados encontrados para *S. torques-reginae* neste estudo, estão sofrendo efeito significativo de um alto desvio padrão devido ao número baixo de replicatas analisadas. Um aumento do número de amostras se faz adequado para melhor visualização das diferenças ou igualdades com redução dos valores de desvio padrão. No entanto, algumas variações parecem ter ocorrido com um grau de significância aceitável, evidenciando que com mais estudos relacionados a perfil lipídico de cianobactérias é possível explorar o potencial de manipulação do organismo, com a finalidade de otimizar o cultivo e a obtenção de determinado ácido graxo de interesse.

5.4 Análise por MALDI-TOF

As amostras congeladas e liofilizadas obtidas ao término do experimento de avaliação dos efeitos do nitrogênio foram ressuspendidas, extraídas com solução TA30, misturadas à solução concentrada da matriz HCCA e submetidas à análise no equipamento. Os espectros médios de MALDI-TOF obtidos estão apresentados na figura 8.

Figura 8. Espectros médio de íons de MALDI-TOF no modo positivo (faixa de m/z: 2 kDa a 20 kDa) de liofilizado celular de *Sphaerospermopsis torques-reginae* cultivados em meio ASM-1 com variações na fonte de nitrogênio: (A) amônio; (B) nitrato; e (C) meio sem nitrogênio. Matriz: HCCA.

Apesar de vários íons em comum, é possível observar diferenças no perfil geral de íons nos espectros para as diferentes condições. Como dito anteriormente, as amostras da condição NH_4^+ foram perdidas durante o experimento por morte celular do organismo. Entretanto, um crescimento a parte foi realizado com a cepa ITEP 24 nas mesmas condições do experimento e uma pequena quantidade de biomassa foi obtida após 18 dias. Esta amostra também foi submetida a análise por MALDI-TOF com a finalidade de exploração adicional desta condição e portanto serão feitas ressalvas nas comparações feitas. Os principais íons que caracterizam as amostras analisadas estão listados na tabela 7 de acordo com sua ocorrência em cada condição.

Tabela 7. Relação massa-carga (m/z) de íons obtidos através de análise por MALDI-TOF de extratos de liofilizados celulares de *S. torques-reginae* após 18 dias de crescimento em diferentes condições de nitrogênio.

NO_3^-	SN	NH_4^+	NH_4^{**}	Todos
2722,3	4924,6	2635,5	4862,8	3464,0
3694,0	7050,3	2651,2	4905,0	3926,5
5329,9	7952,9	2664,6	5058,5	3992,6
5446,2	8703,2	3721,1	5398,4	4312,9
5472,0	9870,0	3943,6	6471,4	4353,0
5577,5		4004,8	6683,4	4380,6
5593,0		4219,3	8899,3	6234,5
5649,2		4799,8	8352,2	6441,0
6959,3		4907,2	10828,4	6935,4
7827,0		5683,8	10980,9	7549,3
8022,2		7598,5		7714,2
9873,2		7625,5		7865,3
15166,9		7673,6		7898,5
		8669,6		7997,5
		8691,5		8164,8
		9622,6		8206,5
		9877,1		8641,9
		10664,3		8778,0
		10683,7		8792,8
		10830,8		9835,2
		11404,3		
		11449,5		
		11510,7		
		11552,1		
		15267,2		
		15287,4		

NO_3^- : íons que aparecem apenas na condição com nitrato,
SN: íons que aparecem apenas na condição sem nitrogênio,
 NH_4^+ : íons que aparecem apenas na condição com amônio,
 NH_4^{} :** íons que não aparecem apenas na condição NH_4^+ ,
Todos: íons que aparecem em todas as condições.

20 íons com m/z variando de 3 a 10 kDa foram comuns a todas as amostras analisadas. Na condição de manutenção, com nitrato, além destes íons, foram observados mais 13 íons com maior destaque para m/z na faixa de dos 5 kDa. Para as amostras de crescimento em meio sem nitrogênio, não

foram observados estes mesmos 13 íons e outros 5 íons, ausentes na condição com nitrato, foram observados. Outros 10 íons foram comuns a estas duas condições (na tabela: NH_4^{+}). Para as amostras da condição NH_4^{+} , foi observada uma série de íons de uma faixa ampla de m/z destacando-se a grande quantidade de massas acima de 10 kDa, que aparecem com baixa frequência nas outras condições. Conforme mencionado acima, deve-se haver cautela ao se compara a amostra da condição NH_4^{+} com as demais. Esta amostra foi crescida após o término do experimento original, onde as cepas nesta condição morreram. Esta nova amostra veio de um novo inóculo não adaptado em meio com amônio, e sim de um meio nas condições de manutenção. Com isso foi avaliado o estresse após 18 dias de inóculo da cepa em um meio com amônio, sem contagem celular durante o crescimento. A biomassa obtida foi pequena e a pesagem foi prejudicada por eletricidade estática. Não foi possível então a pesagem exata, tendo sido ressuspensa uma quantidade não pesada e provavelmente maior de biomassa da amostra nesta condição. Durante o processo de ionização na placa de MALDI, uma concentração diferente de analitos em relação à concentração de matriz usada, pode favorecer a ionização de diferentes moléculas. Portanto as diferenças encontradas podem ser em razão destes fatores, principalmente a concentração de preparo da amostra.

O objetivo desta etapa do estudo é ter uma visão geral da produção de biomoléculas em diferentes condições de nitrogênio e também avaliar o método de MALDI-TOF para análises em cianobactérias. Não foi realizada identificação das substâncias referentes aos íons encontrados. Para isso é necessário fazer a fragmentação dos íons e elucidar as estruturas. Foi utilizada uma matriz que

ioniza preferencialmente peptídeos, o HCCA, pois tem-se interesse em explorar estas biomoléculas pouco estudadas e ainda desconhecidas para a espécie em estudo.

O perfil geral de metabólitos e moléculas de alto peso molecular obtido por MALDI-TOF é uma importante ferramenta utilizada para caracterização de microorganismos. A rapidez de análise e seu alto ganho tornam esta técnica bastante adequada para rápida identificação de microorganismos. A análise do conteúdo celular de microorganismos por métodos, como o utilizado neste trabalho, favorece a ionização de proteínas e peptídeos maior abundância, de alta basicidade e média hidrofobicidade na faixa de massas entre 4 kDa e 20 kDa, onde poucos metabólitos aparecem devido a baixa massa. Em um estudo com *E. coli*, foi demonstrado que os peptídeos encontrados nesta faixa de massa são em maior parte peptídeos ribossomais (RYZHOV & FENSELAU, 2001). Conhecer o tipo de metabólito que está sendo ionizado é desejável para uma identificação mais adequada do organismo. As proteínas e peptídeos ribossomais estão presentes em abundância nas células e fornecem uma visão direta para a sequência do DNA traduzida no interior celular, sendo usadas como biomarcadores para caracterizar as espécies. Dessa maneira podem ser preditas através de estudo e sequenciamento genético dos organismos e mais facilmente identificadas por meio da comparação do espectro obtido com um espectro teórico de um banco de dados. Para a cepa aqui estudada de *S. torques-reginae* foram observados muitos íons nesta faixa alta de massas. A maior parte das diferenças encontradas está na condição NH_4^+ , que conforme dito anteriormente sofreu mais variações. Metabólitos que não sofrem influência das condições bioquímicas do cultivo são adequados para se

estabelecer um *fingerprinting* pelos metabólitos de um organismo. Conforme já foi dito, este foi um teste inicial para uma visualização do perfil de metabólitos obtido por MALDI-TOF para a espécie estudada. Os resultados obtidos constituem um importante passo inicial para o início de um estudo mais profundo das proteínas e peptídeos produzidos por esta cepa e também para conhecer o seu comportamento frente às variações ambientais.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A busca por fontes alternativas de energia renovável e que causem poucos impactos sobre o meio ambiente vem crescendo e assim como as microalgas já vem sendo estudadas, tem crescido o interesse pela obtenção de biodiesel a partir dos óleos extraídos destes organismos. Estudos da composição dos ácidos graxos desses óleos são importantes para avaliar a sua qualidade para produção de biodiesel. A linhagem estudada mostrou conter ácidos graxos bons para a produção de biodiesel, no entanto contem também elevados níveis de ácidos graxos poli-insaturados que podem comprometer a estabilidade oxidativa do biodiesel. Em condições de maior intensidade luminosa, apresentou menores níveis de PUFA's e também apresentou uma possível alteração sazonal no conteúdo dos ácidos graxos. Os resultados aqui obtidos contribuem para o conhecimento do potencial da linhagem estudada. Mostram também que muitos estudos são necessários e que a exploração de fatores físico-químicos pode otimizar a obtenção dos metabólitos de maior interesse.

Com o avanço das técnicas de espectrometria de massas e dos equipamentos analíticos, tem aumentado o número de estudos metabolômicos com a busca por métodos mais rápidos e de maior rendimento, otimizando tempo e custos. Por apresentarem estas características, as técnicas de MALDI-TOF tem sido exploradas e suas aplicações ampliadas. A rápida caracterização de microorganismos por meio do seu *fingerprinting* metabólico é uma das principais aplicações atuais por ser capaz de avaliar metabólitos específicos em uma ampla faixa de massas. A análise do conteúdo celular da linhagem estudada mostrou uma grande variedade de metabólitos numa faixa de massas

entre 2 e 20 kDa. A maioria das moléculas apareceu nas diferentes condições de cultivo e podem constituir peptídeos característicos e esperados para esta espécie. A elucidação desses metabólitos aliada a estudos genômicos da espécie pode estabelecer o *fingerprinting* característico da espécie, possibilitando sua fácil identificação em amostras ambientais. Em suma, este trabalho está contribuindo para este conhecimento, mostrando o potencial de espécies de cianobactérias isoladas no Brasil, para obtenção de compostos ativos naturais e dos controladores de sua produção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, S. M. F. O., CARMICHAEL, W. W., JOCHIMSEN, E. M., RINEHART, K. L., LAU, S., SHAW, G. R. e EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v.181–182, n.0, p.441-446. 2002.

AZEVEDO, S. M. F. O., EVANS, W. R., CARMICHAEL, W. W. e NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v.6, n.3, p.261-265. 1994.

BAKER, L., SENDALL, B. C., GASSER, R. B., MENJIVAR, T., NEILAN, B. A. e JEX, A. R. Rapid, multiplex-tandem PCR assay for automated detection and differentiation of toxigenic cyanobacterial blooms. **Molecular and Cellular Probes**, v.27, n.5–6, p.208-214. 2013.

BARROS, L. P. C., MONSERRAT, J. M. e YUNES, J. S. Determination of optimized protocols for the extraction of anticholinesterasic compounds in environmental samples containing cyanobacteria species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, n.4, p.883-889. 2004.

BECKER, V., IHARA, P., YUNES, J. e HUSZAR, V. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v.22, n.3, p.235-241. 2010.

BEN-AMOTZ, A., TORNABENE, T. G. e THOMAS, W. H. CHEMICAL PROFILE OF SELECTED SPECIES OF MICROALGAE WITH EMPHASIS ON LIPIDS1. **Journal of Phycology**, v.21, n.1, p.72-81. 1985.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M., PICCIN-SANTOS, V., KUJBIDA, P. e DO NASCIMENTO MOURA, A. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. **Journal of Water Resource and Protection**, v.3, p.349-355. 2011.

BOROWITZKA, M. A. e MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v.18, n.1, p.13-25. 2013.

BURJA, A. M., BANAIGS, B., ABOU-MANSOUR, E., GRANT BURGESS, J. e WRIGHT, P. C. Marine cyanobacteria--a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, v.57, n.46, p.9347-9377. 2001.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v.72, n.6, p.445-459. 1992.

CARMICHAEL, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v.7, n.5, 2001/09/01, p.1393-1407. 2001.

CARNEIRO, R. L., DÖRR, F. A., DÖRR, F., BORTOLI, S., DELHERBE, N., VÁSQUEZ, M. e PINTO, E. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, p.n/a-n/a. 2012.

CARNEIRO, R. L., DOS SANTOS, M. E. V., PACHECO, A. B. F. e AZEVEDO, S. M. F. D. O. E. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, v.31, n.5, May 1, 2009, p.481-488. 2009.

CARVALHO, L. R. D., PIPOLE, F., WERNER, V. R., LAUGHINGHOUSE IV, H. D., CAMARGO, A. C. M. D., RANGEL, M., KONNO, K. e SANT' ANNA, C. L. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.761-769. 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.3, p.126-131. 2008.

CHORUS, I. e BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management** London: Spon Press 1999.

CHRISTIANSEN, G., DITTMANN, E., VIA ORDORIK, L., RIPPKA, R., HERDMAN, M. e BÖRNER, T. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. **Archives of Microbiology**, v.176, n.6, 2001/12/01, p.452-458. 2001.

CODD, G., BELL, S., KAYA, K., WARD, C., BEATTIE, K. e METCALF, J. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, v.34, n.4, p.405 - 415. 1999.

CODD, G. A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v.16, n.1, p.51-60. 2000.

CODD, G. A., MORRISON, L. F. e METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, n.3, p.264-272. 2005.

COHEN, Z., MARGHERI, M. C. e TOMASELLI, L. Chemotaxonomy of cyanobacteria. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1155-1158. 1995.

COOK, W. O., BEASLEY, V. R., DAHLEM, A. M., DELLINGER, J. A., HARLIN, K. S. e CARMICHAEL, W. W. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. **Toxicon**, v.26, n.8, p.750-753. 1988.

CROWE, J. H. e CROWE, L. M. Membrane Integrity in Anhydrobiotic Organisms: Toward a Mechanism for Stabilizing Dry Cells. In: Somero, G., Osmond, C., *et al* (Ed.). **Water and Life**: Springer Berlin Heidelberg, 1992, p.87-103.

DETTMER, K., ARONOV, P. A. e HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v.26, n.1, p.51-78. 2007.

DEXTER, J. e FU, P. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. **Energy & Environmental Science**, v.2, n.8, p.857-864. 2009.

DONZE, M., HAVEMAN, J. e SCHIERECK, P. Absence of Photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.256, n.1, p.157-161. 1972.

DÖRR, F. A., PINTO, E., SOARES, R. M. e AZEVEDO, S. M. F. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v.56, n.7, p.1247-1256. 2010a.

DÖRR, F. A., RODRÍGUEZ, V., MOLICA, R., HENRIKSEN, P., KROCK, B. e PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v.55, n.1, p.92-99. 2010b.

DURHAM, U. Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight peptide mass fingerprinting. **Proteomics**, v.2, p.1735-1742. 2002.

ERHARD, M., VON DÖHREN, H. e JUNGBLUT, P. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v.15, n.9, p.906-909. 1997.

FALCONER, I. R. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. **Phycologia**, v.35, n.6S, p.6-11. 1996.

FERRÃO-FILHO, A.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine drugs**, v.9, n.12, p.2729-2772. 2011.

FOGG, G. E. GROWTH AND HETEROCYST PRODUCTION IN ANABAENA CYLINDRICA LEMM. **New Phytologist**, v.43, n.2, p.164-175. 1944.

GOMBOS, Z., KANERVO, E., TSVETKOVA, N., SAKAMOTO, T., ARO, E.-M. e MURATA, N. Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids. **Plant Physiology**, v.115, n.2, p.551-559. 1997.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T. e KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréd. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung Limnologie**, v.15, p.796-804. 1964.

HENRIKSEN, P., CARMICHAEL, W. W., AN, J. e MOESTRUP, Ø. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. **Toxicon**, v.35, n.6, p.901-913. 1997.

HERRERO, A., MURO-PASTOR, A. M. e FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.2, p.411-425. 2001.

HOFFMANN, E. **Mass spectrometry**: Wiley Online Library 1996.

IBELINGS, B. e WINDER, B. The effects of irradiance, temperature and desiccation on cyanobacterial photosynthesis: A possible explanation for the diurnal changes in surface waterblooms. In: Stal, L. e Caumette, P. (Ed.). **Microbial Mats**: Springer Berlin Heidelberg, v.35, p.311-318, 1994.

JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAEL, W. W., AN, J., CARDO, D. M., COOKSON, S. T., HOLMES, C. E. M., ANTUNES, M. B., DE MELO FILHO, D. A., LYRA, T. M., BARRETO, V. S. T., AZEVEDO, S. M. F. O. e JARVIS, W. R. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. **N Engl J Med**, v.338, n.13, March 26, 1998, p.873-878. 1998.

KAEBERNICK, MELANIE; NEILAN, BRETT A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, p.1-9, 2001.

KAPLAN, A., HAREL, M., KAPLAN-LEVY, R. N., HADAS, O., SUKENIK, A. e DITTMANN, E. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). **Frontiers in microbiology**, v.3. 2012.

KARAS, M. e HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v.60, n.20, 1988/10/01, p.2299-2301. 1988.

KEYS, C. J., DARE, D. J., SUTTON, H., WELLS, G., LUNT, M., MCKENNA, T., MCDOWALL, M. e SHAH, H. N. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, v.4, n.3, p.221-242. 2004.

KROMKAMP, J. e WALSBY, A. E. **Buoyancy regulation and vertical migration of Trichodesmium: a computer-model prediction**: Springer 1992.

LAGOS, N., ONODERA, H., ZAGATTO, P. A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S. M. F. Q. e OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v.37, n.10, p.1359-1373. 1999.

LEE, D.-Y. e RHEE, G. Y. KINETICS OF GROWTH AND DEATH IN ANABAENA FLOS-AQUAE (CYANOBACTERIA) UNDER LIGHT LIMITATION AND SUPERSATURATION. **Journal of Phycology**, v.35, n.4, p.700-709. 1999.

LÉVEILLÉ, J.-C., AMBLARD, C. e BOURDIER, G. Fatty acids as specific algal markers in a natural lacustrine phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v.19, n.4, April 1, 1997, p.469-490. 1997.

LI, Y., HORSMAN, M., WU, N., LAN, C. Q. e DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v.24, n.4, p.815-820. 2008.

LIU, X., SHENG, J. e CURTISS III, R. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n.17, April 26, 2011, p.6899-6904. 2011.

LOMBARDO, M., PINTO, F. C. R., VIEIRA, J. M. S., HONDA, R. Y., PIMENTA, A. M. C., BEMQUERER, M. P., CARVALHO, L. R. e KIYOTA, S. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis feernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteriae): A Brazilian toxic cyanobacterium. **Toxicon**, v.47, n.5, Apr, p.560-566. 2006.

LU, X. A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. **Biotechnology advances**, v.28, n.6, p.742-746. 2010.

LUQUE, I., FLORES, E. e HERRERO, A. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. **The EMBO journal**, v.13, n.12, p.2862. 1994.

MAHMOOD, N. A. e CARMICHAEL, W. W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**, v.24, n.5, p.425-434. 1986.

MAHMOOD, N. A., CARMICHAEL, W. W. e PFAHLER, D. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green-algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.4, Apr, p.500-503. 1988.

MAURER, H. Current role of liquid chromatography–mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, n.7, 2007/08/01, p.1315-1325. 2007.

MOLICA, R. J. R., OLIVEIRA, E. J. A., CARVALHO, P. V. V. C., COSTA, A. N. S. F., CUNHA, M. C. C., MELO, G. L. e 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, n.4, p.743-753. 2005.

MONSERRAT, J. M., YUNES, J. S. e BIANCHINI, A. Effects of *Anabaena spiroides* (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.20, n.6, p.1228-1235. 2001.

MURATA, N. e NISHIDA, I. Lipids of blue-green algae (cyanobacteria). **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise**, v.9. 1987.

NEILSON, A., RIPPKA, R. e KUNISAWA, R. Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. **Archiv für Mikrobiologie**, v.76, n.2, 1971/06/01, p.139-150. 1971.

NELSON, D. L., LEHNINGER, A. L. e COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry** New York: W.H. Freeman 2008.

ONODERA, H., OSHIMA, Y., HENRIKSEN, P. e YASUMOTO, T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish Lakes. **Toxicon**, v.35, n.11, p.1645-1648. 1997.

PARMAR, A., SINGH, N. K., PANDEY, A., GNANSOUNOU, E. e MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v.102, n.22, p.10163-10172. 2011.

PENG, J., SHEN, X., EL SAYED, K. A., DUNBAR, D. C., PERRY, T. L., WILKINS, S. P., HAMANN, M. T., BOBZIN, S., HUESING, J., CAMP, R., PRINSEN, M., KRUPA, D. e WIDEMAN, M. A. Marine Natural Products as Prototype Agrochemical Agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.8, 2003/04/01, p.2246-2252. 2003.

PETERSON, C. L., AULD, D. L. e KORUS, R. A. Winter rape oil fuel for diesel engines: Recovery and utilization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.8, 1983/08/01, p.1579-1587. 1983.

PETROVIĆ, M., HERNANDO, M. D., DÍAZ-CRUZ, M. S. e BARCELÓ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v.1067, n.1–2, p.1-14. 2005.

PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology**, v.17, n.4, p.407-413. 2002.

PIÑERO ESTRADA, J. E., BERMEJO BESCÓS, P. e VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Il Farmaco**, v.56, n.5–7, p.497-500. 2001.

PIORRECK, M., BAASCH, K.-H. e POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v.23, n.2, p.207-216. 1984.

PITA, R., ANADON, A. e MARTINEZ-LARRANAGA, M. R. Neurotoxins with anticholinesterase activity and their possible use as warfare agents. **Medicina Clinica**, v.121, n.13, Oct, p.511-517. 2003.

PITOIS, S., JACKSON, M. H. e WOOD, B. J. B. Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters. **International Journal of Environmental Health Research**, v.10, n.3, 2000/09/01, p.203-218. 2000.

PLEASANCE, S., QUILLIAM, M. A. e MARR, J. C. Ionspray mass spectrometry of marine toxins. IV. Determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussel tissue by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v.6, n.2, p.121-127. 1992.

QUILLIAM, M. A., THOMSON, B. A., SCOTT, G. J. e SIU, K. W. M. Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.3, n.5, p.145-150. 1989.

RADMER, R. e PARKER, B. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v.6, n.2, 1994/04/01, p.93-98. 1994.

RASTOGI, R. P. e SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.27, n.4, p.521-539. 2009.

REYNOLDS, C. Growth and replication of phytoplankton. In: Reynolds, C. (Ed.). **Ecology of Phytoplankton: Ecology Biodiversity and Conservation**. New York: Cambridge University Press, 2006, p.178-236.

RHEE, G.-Y. e GOTHAN, I. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. **Limnology and Oceanography**, v.26. 1981.

ROMANO, I., BELLITTI, M. R., NICOLAUS, B., LAMA, L., MANCA, M. C., PAGNOTTA, E. e GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v.54, n.3, p.289-294. 2000.

RUBAKHIN, S. S., JURCHEN, J. C., MONROE, E. B. e SWEEDLER, J. V. Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.12, p.823-837. 2005.

RYZHOV, V. e FENSELAU, C. Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. **Analytical Chemistry**, v.73, n.4, 2001/02/01, p.746-750. 2001.

SALAZAR, Vania Cristina Rodríguez. **Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s)**. 2011. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-11042011-102254/>>. Acesso em: 2013-08-23.

SILVA-STENICO, M. E., SILVA, C. S. P., LORENZI, A. S., SHISHIDO, T. K., ETCHEGARAY, A., LIRA, S. P., MORAES, L. A. B. e FIORE, M. F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, v.166, n.3, p.161-175. 2011.

SINGH, S. C., SINHA, R. P. e HADER, D. P. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. **Acta protozoologica**, v.41, n.4, p.297-308. 2002.

SIVONEN, K. e JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. e Bartram, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. London: E & FN Spon, 1999, p.41-110.

SOMPONG, U., HAWKINS, P. R., BESLEY, C. e PEERAPORNPIHAL, Y. The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. **FEMS Microbiology Ecology**, v.52, n.3, p.365-376. 2005.

TAN, L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**, v.68, n.7, p.954-979. 2007.

TANAKA, K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v.42, n.33, p.3860-3870. 2003.

TASAKA, Y., GOMBOS, Z., NISHIYAMA, Y., MOHANTY, P., OHBA, T., OHKI, K. e MURATA, N. Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. **The EMBO journal**, v.15, n.23, p.6416. 1996.

TEDESCO, M. e DUERR, E. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. **Journal of Applied Phycology**, v.1, n.3, 1989/11/01, p.201-209. 1989.

TORNABENE, T., HOLZER, G., LIEN, S. e BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, n.6, p.435-440. 1983.

TUNDISI, J., MATSUMURA-TUNDISI, T. e ABE, D. The ecological dynamics of Barra Bonita (Tietê River, SP, Brazil) reservoir: implications for its biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.1079-1098. 2008.

VAN BAAR, B. L. M. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p.193-219. 2000.

WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M. e SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v.102, n.3, p.2724-2730. 2011.

WASE, N. V. e WRIGHT, P. C. Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.3, n.8, p.903-929. 2008.

WELKER, M., FASTNER, J., ERHARD, M. e VON DÖHREN, H. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. **Environmental Toxicology**, v.17, n.4, p.367-374. 2002.

WELKER, M., MARSALEK, B., SEJNOHOVA, L. e VON DOHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in Microcystis (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, v.27, n.9, Sep, p.2090-2103. 2006a.

WELKER, M., MARŠÁLEK, B., ŠEJNOHOVÁ, L. e VON DÖHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in Microcystis (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, v.27, n.9, p.2090-2103. 2006b.

WERNER, V. R., LAUGHINGHOUSE IV, H. D., FIORE, M. F., SANT'ANNA, C. L., HOFF, C., DE SOUZA SANTOS, K. R., NEUHAUS, E. B., MOLICA, R. J. R., HONDA, R. Y. e ECHENIQUE, R. O. Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms. **Phycologia**, v.51, n.2, p.228-238. 2012.

WYNNE, M. e BOLD, H. Introduction to the algae structure and reproduction. **Introduction to the algae structure and reproduction**. 1978.

XU, H., MIAO, X. e WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.126, n.4, p.499-507. 2006.

ZAPOMĚLOVÁ, E., JEZBEROVÁ, J., HROUZEK, P., HISEM, D., ŘEHÁKOVÁ, K. e KOMÁRKOVÁ, J. Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). **Journal of Phycology**, v.45, n.6, p.1363-1373. 2009.