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

Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de
cianobactérias

Stella de Bortoli

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2011

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

Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de
cianobactérias

Stella de Bortoli

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2011

Stella de Bortoli

Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de
cianobactérias

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

Prof. Dra. Marli de Fátima Fiore

Prof. Dra. Celia Leite Sant'Anna

Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi

Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo, 05 de setembro de 2011.

Para meus pais Carlos e Mabel,
minha irmã e amiga Maritsa e
minha Nona Lyticia.

*“Education is an admirable thing,
but it is well to remember from time to time that
nothing that is worth knowing can be taught.”*

Oscar Wilde

Agradecimentos

A Deus pela vida, capacidade e discernimento.

À população Brasileira pagadora de impostos, responsável por financiar uma educação pública primorosa e de excelência. Ao Governo do Estado de São Paulo por manter a qualidade de ensino e acolher sem distinção estudantes de todo o Brasil e fora dele, promovendo o desenvolvimento intelectual na melhor Universidade do país.

Ao meu querido orientador Professor Ernani Pinto que me aceitou em seu grupo e sempre acreditou no meu trabalho e competência.

Aos colegas do grupo LTPNA. Paula, Fabyana, Sidnei, Vânia, Vanessa, Rafael, Sara, Mariah, Fabiana, Regiane, Ariane, Vinicius, Natalia, Bruna, Joseane, Fabiane, Barbara, Luana, Kazumi e Gustavo que me acolheram, ajudaram e muitas vezes me aturaram, tornando a convivência mais agradável principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Bernd Luckas e seus alunos da Friedrich Schiller Universität Jena, especialmente Steven, Thomas, Tina, Katrin e Karin.

À Professora Mónica Vasquez e seus alunos da Pontificia Universidad Católica de Chile, especialmente Nathalie, Álvaro, Dinka, Carla, Estrella, Kátia, Juanjo, Roi, Agathe e Ricardo.

Ao querido colega Dr. Felipe Dörr pelas várias análises, auxílios em vários momentos e exemplo de pesquisador.

Ao estimado colega e Professor Diogo Oliveira Silva por todas as análises, explicações e tempo dedicado ao meu trabalho.

À querida Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi por toda a disponibilidade, companheirismo, amizade e paciência. Um grande exemplo de pessoa e pesquisadora.

A queridíssima amiga Dra. Cristiane Cominetti que sempre esteve disponível para tudo. Trabalho, conversas, café e toda a estatística deste trabalho.

Ao prezado colega Dr. Ronaldo Carneiro pela experiência e apontamentos no meu trabalho.

Ao Professor Pio Colepicolo, ao Professor Massuo Kato e à Professora Bernadete Franco por tão prontamente disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos para a execução deste trabalho.

Aos Professores Marcelo Luiz Pompêo e Viviane Moschini Carlos pelo carinho, colaboração e parceria em todos estes anos.

Ao Professor Eduardo Purgatto por todas as explicações, auxílios científicos e exemplo.

Ao Professor Renato Molica por seus ensinamentos no início do desenvolvimento deste trabalho e também pelas primeiras cepas de cianobactérias do nosso laboratório.

A todos os Professores e colegas do programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Às secretárias do Departamento de Análises Clínicas Sueli, Edna, Ana e Dora.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas ótimas dependências.

A D. Luzia, D. Dalva e Helena pelos litros de café e grandes observações da vida em pequenas conversas.

Aos amigos que me adotaram Aderuza, Alessandro, Luciano. Obrigada por tudo, principalmente pela serenata naquela noite fria. Foi muito importante para mim, acreditem. Inesquecível.

Aos amigos de longe, de longa e nem tão longa data, que me amam como sou e me querem por perto. É recíproco. Angélica, Cristiane Savicki, Letícia, Fernanda Otero, Beatriz, Ana Cláudia, João Paulo, Marco Antônio, Andrea, obrigada por tudo, saudades, histórias, risadas, lágrimas, incentivos, preocupação e amor. Vocês sabem onde estão. Daniel Gil, obrigada por voltar!

À minha família, Nona, tias, tios, primos e primas que sempre torceram por mim.

A minha irmã e melhor amiga Maritsa, obrigada por tudo, desde sempre. Tem muito ainda por vir.

A Capes, CNPq e Fapesp pelo apoio financeiro.

RESUMO

Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias

A demanda crescente de água doce de boa qualidade são problemas atuais e mundiais, além do descaso com os dejetos lançados nos ambientes aquáticos que comprometem a qualidade dos recursos hídricos. Um dos parâmetros que atesta a potabilidade da água é a presença de cianobactérias e cianotoxinas. Cianobactérias são microrganismos procariontes aeróbicos fotoautótrofos que sintetizam as cianotoxinas. Estes compostos podem ser classificados de acordo com seus mecanismos de ação em hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos. Por sua diversidade, representam diferentes riscos não só ao ecossistema e a outros organismos dos ambientes aquáticos, como também aos seres humanos.

Esse projeto visou o isolamento e cultivo de cepas de cianobactérias produtoras de toxinas para a investigação da biossíntese desses compostos. Com este intuito, foram realizadas coletas de água em três reservatórios no estado de São Paulo e um no Paraná. Cepas de cianobactérias foram isoladas, identificadas e analisadas quanto à produção de toxinas.

Uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 02) produtora de microcistinas (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW e desm-MC-LR e desm-MC-RR) foi escolhida para ser estudada frente diferentes condições de cultivo e ter o seu crescimento, produção de toxinas e expressão gênica estudados.

Foram utilizados os meios de cultura já referidos na literatura: ASM-1 (N:P=1, 10 e 20), MLA (N:P=10), Bold 3N (N:P=16) e BG-11 (N:P=10 e 100).

Para acompanhar o crescimento, dois métodos foram utilizados: contagem de células e espectrofotometria. As toxinas foram quantificadas por LC-MS - QTrap. A análise da expressão gênica foi realizada por reação de PCR em tempo real pelo método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$.

Foi observada diferença no crescimento da cepa estudada nos diferentes meios de cultivo empregados. A contagem das células permitiu a identificação das

fases logarítmica e total de crescimento. Durante a fase logarítmica, três experimentos demonstraram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Ao se avaliar o crescimento total, quatro experimentos foram menores ($p < 0,01$). As leituras das absorvâncias e a contagem de células demonstraram alta correlação. Para ambas as leituras em 680 nm e 750 nm o coeficiente de correlação (r) esteve entre 0,93 e 0,99.

A quantificação das microcistinas (MC) foi realizada por LC-MS - QTrap. Foram quantificadas as variantes MC-LR, MC-RR e MC-YR. Apesar da relação toxina/célula ser distinto para cada experimento, não representou grande variação naqueles realizados com meio ASM-1 (N:P 1; 10 e 20), meio MLA (N:P=10) e BG11(N:P=10). O experimento realizado em Bold3N (N:P=16,6) apresentou menor concentração de toxina/célula e as variantes MC-LR e MC-YR não foram detectadas. Por outro lado, o experimento realizado em BG-11 (N:P=100) apresentou a maior relação toxina por célula. Estes resultados sugerem que o excesso de nitrato seja um fator estressante para o desenvolvimento e crescimento da cepa de *M. aeruginosa* avaliada e ao mesmo tempo um fator estimulante para a produção das toxinas analisadas.

Os experimentos que avaliaram a expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene da ficocianina (controle endógeno) foram realizados em meio ASM-1 (N:P=10 e 100) e BG 11 (N:P= 10 e 100). Os parâmetros anteriores, como crescimento e produção de toxinas também foram avaliados. Novamente foram encontradas diferenças entre as fases de crescimento e produção de toxina, porém a expressão dos genes avaliados não demonstrou variação significativa entre os experimentos. Porém ambos os genes avaliados demonstraram menor expressão nos experimentos condizidos em (N:P=100).

Palavras chaves: Cianobactérias. Cianotoxinas. *Microcystis sp.* Biossíntese de microcistina. Expressão gênica de microcistinas.

ABSTRACT

Investigation on the cyanobacterial strains toxins biosynthesis

There is a great concern these days about potable and good quality water due to the increase of the population needs and also to the arising problems with contamination caused by anthropogenic sources. The presence of cyanobacteria and cyanotoxins are some parameters that attest water potability. Cyanobacteria are prokaryotic aerobic photoautotrophic microorganisms that may synthesize cyanotoxins. These compounds can be classified as hepatotoxic, neurotoxic and dermatotoxic according to their action mechanisms. Because of their diversity, they may represent different risks, not only to their ecosystem and other aquatic living organisms, but also to human beings.

The aim of this project was the isolation and cultivation of cyanotoxin-producing cyanobacteria for further investigation on the biosynthesis of these compounds. Water samples from three different reservoirs in São Paulo state and one in Paraná state were collected in order to isolate cyanobacteria strains and accomplish their identification and to evaluate the toxin production.

The *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 02) microcystin producer strain (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, desm-MC-LR and desm-MC-RR) was chosen to be grown in different cultivation conditions and later analyzed for its growth rate, toxin production and gene expression.

All culture media used in this research were chosen according to the literature: ASM-1 (N:P=1, 10 and 20), MLA (N:P=10), Bold 3N (N:P=16) and BG-11 (N:P=10 and 100). To evaluate growth rate, two techniques were used: cell counting and absorbance determination in two different wavelengths (680 nm and 750 nm). Toxins were quantified by LC-MS in a hybrid triple-quadrupole instrument (Qtrap). Gene expression was assessed by real time PCR, using the $\Delta\Delta C_t$ relative quantification method.

Cell counting allowed total growth and logarithmic phase identification. During the last, three experiments showed statistical difference from control group

($p < 0,05$). Four experiments resulted in a lower total growth rate ($p < 0,05$). A high correlation between cell counting and absorbance levels was found for both wavelengths tested. Correlation coefficients (r) were from 0,93 to 0,99.

Three microcystin variants (MC-LR, MR-RR e MC-YR) were quantified by LC-MS. The toxin content per cell was calculated and showed no statistic variation among those experiments performed on ASM-1 (N:P 1; 10 and 20), MLA (N:P=10) and BG-11 (N:P=10). The lowest toxin/cell concentration was found for Bold3N (N:P=16,6) medium, where MC-LR and MC-YR production was not detected. On the other hand, the experiment with BG-11 (N:P=100) medium showed the highest toxin/cell content. These results suggest that high levels of nitrate in the culture medium may be a stressing factor for the development and growth of the *M. aeruginosa* tested strain, as well as a disturbing factor for microcystin production.

Gene expression experiments regarding 16S and *mycB* genes using the phycocyanin gene as endogen control were performed on ASM-1 (N:P=10 and 100) and BG 11 (N:P= 10 and 100) media, along with the evaluation of growth rate and toxin production. Differences between growth rates and toxin production were once more observed, however gene expression did not show a significant variation among experiments.

Key words: Cyanobacteria. Cyanotoxins. *Microcystis* sp. Microcystin biosynthesis. Microcystin gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de espécies de cianobactérias presentes no Reservatório de Salto Grande (a) e Taquacetuba (b).	31
Figura 2. Principais toxinas produzidas por cianobactérias. Estruturas gerais das nodularinas e microcistinas. (desenhadas com auxílio do software ChemDraw [®] versão 11.0)	32
Figura 3: Esquema da estrutura molecular da microcistina. (desenhada com o auxílio do software ChemDraw [®] versão 11.0)	34
Figura 4. Reservatório de Salto Grande – Americana- SP.....	53
Figura 5. Cromatograma obtido por LC-MS para quatro padrões de microcistinas, conforme descrito no item 5.3.2.3. A fonte de electrospray foi operada no modo positivo monitorando-se os íons de m/z 520 (MC-RR, 5,1 min), 1045 (MC-YR, 8,7 min), 995 (MC-LR, 9,0 min) e 910 (MC-LA, 15,9 min).	54
Figura 6. Espectro de massas em MS/MS do íon de m/z 520 para padrão de MC-RR (5,1 min), obtido por <i>electrospray</i> no modo positivo em ion trap. A fragmentação característica do íon $(M+2H)^{2+}$ pode ser vista.	54
Figura 7. Espectro de massas em MS/MS do íon de m/z 995 para padrão de MC-LR (9,0 min), obtido por <i>electrospray</i> no modo positivo em ion trap. A fragmentação característica do íon $(M+H)^+$ pode ser vista.	54
Figura 8. Espectro de massas em MS/MS do íon de m/z 1045 para padrão de MC-YR (8,7 min), obtido por <i>electrospray</i> no modo positivo em ion trap. A fragmentação característica do íon $(M+H)^+$ pode ser vista.	55
Figura 9. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 1 (Barragem – setembro de 2006), no reservatório de Salto Grande, em Americana-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520, 5,0 min), MC-YR (m/z 1045, 8,7 min) e MC-LR (m/z 995, 9,0 min) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	55
Figura 10. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 2 (Fazenda Santa Lúcia – setembro de 2006), no reservatório de Salto Grande, em Americana-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520, 5,0 min), MC-YR (m/z 1045, 8,7 min) e MC-LR (m/z 995, 9,0 min) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	55
Figura 11. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 1 (Barragem – março de 2007), no reservatório de Salto Grande, em Americana-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520), MC-YR (m/z 1045) e MC-LR (m/z 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	56
Figura 12. Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a amostra referente ao ponto 2 – Fazenda Santa Lúcia, reservatório de Salto Grande Americana-SP em março de 2007.	57

Figura 13. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 1 (Alagado do Rio Areia – janeiro de 2007), no reservatório da Usina Hidrelétrica Gov. Bento Munhoz da Rocha Netto, em Cruz Machado-PR. A presença do pico característico para MC-LR (<i>m/z</i> 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.....	58
Figura 14. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 2 (Barragem do Rio Areia – janeiro de 2007), no reservatório da Usina Hidrelétrica Gov. Bento Munhoz da Rocha Netto, em Cruz Machado-PR. A presença do pico característico para MC-LR (<i>m/z</i> 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.....	58
Figura 15: Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra coletada no braço Taquacetuba (fevereiro de 2007), no reservatório Billings, em São Paulo-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (<i>m/z</i> 520), MC-YR (<i>m/z</i> 1045) e MC-LR (<i>m/z</i> 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	59
Figura 16: Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra coletada no braço Taquacetuba (fevereiro de 2007), no reservatório Billings, em São Paulo-SP. A presença do pico característico para saxitoxina (<i>m/z</i> 300) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.4.....	60
Figura 17: Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra coletada no braço Taquacetuba (julho de 2007), no reservatório Billings, em São Paulo-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (<i>m/z</i> 520), MC-YR (<i>m/z</i> 1045) e MC-LR (<i>m/z</i> 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	60
Figura 18: Cromatograma obtido por LC-MS para a cepa isolada LTPNA02. A presença dos picos característicos para MC-RR (<i>m/z</i> 520; pico 1), MC-YR (<i>m/z</i> 1045; pico 3) e MC-LR (<i>m/z</i> 995; pico 4) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	61
Figura 19: Cromatograma obtido por LC-MS para a cepa isolada LTPNA08. A presença dos picos característicos para MC-RR (<i>m/z</i> 520; pico 1), MC-YR (<i>m/z</i> 1045; pico 3) e MC-LR (<i>m/z</i> 995; pico 4) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	62
Figura 20: Cromatograma obtido por LC-MS para a cepa isolada LTPNA09. A presença dos picos característicos para MC-RR (<i>m/z</i> 520; pico 1), MC-YR (<i>m/z</i> 1045; pico 3) e MC-LR (<i>m/z</i> 995; pico 4) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.	62
Figura 21. Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para o padrão de saxitoxina. Tempos de retenção: 5 minutos.....	64
Figura 22. Espectro de massas do pico em 5 min, que corresponde a saxitoxina e é utilizado para confirmação nas amostras.....	65
Figura 23: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Itep A1, utilizando o método descrito em 5.3.2.4. Identificação de saxitoxina (pico1).	65

Figura 24: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Itep 18, utilizando o método descrito em 5.3.2.4. Identificação de saxitoxina (pico1).....	65
Figura 25: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Itep 28, utilizando o método descrito em 5.3.2.4. Identificação de saxitoxina (pico1).....	66
Figura 26: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Jucazinho.	66
Figura 27: Crescimento em número de células por mL da cepa LTPNA02.	89
Figura 28. Crescimento da cepa LTPNA 02 por absorvância em 680 e 750 nm.	89
Figura 29.Comparação entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento.	90
Figura 30: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	93
Figura 31: Crescimento da cepa em em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	93
Figura 32: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento. (680nm e 750nm r=0.996).	94
Figura 33: Quantificação das microcistinas em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	94
Figura 34: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	95
Figura 35: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=1. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	96
Figura 36: Crescimento da cepa em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=1 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	96
Figura 37: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento. (680 nm r=0,94 e 750 nm r=0,92).....	97
Figura 38: Quantificação das microcistinas em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=1 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	97
Figura 39: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=1 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	98
Figura 40: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=20. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	99
Figura 41: Crescimento da cepa em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=20 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	99
Figura 42: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento. (680nm e 750nm r=0,98).	100

Figura 43: Quantificação das microcistinas em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=20 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	100
Figura 44: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=20 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	101
Figura 45: Crescimento da cepa em células/mL em meio MLA [NO ₃ :PO ₄]=10,4. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	102
Figura 46: Crescimento da cepa em meio MLA [NO ₃ :PO ₄]=10,4 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	102
Figura 47: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680nm e 750nm r=0,99).	103
Figura 48: Quantificação das microcistinas em meio MLA [NO ₃ :PO ₄]=10,4 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	103
Figura 49: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio MLA [NO ₃ :PO ₄]=10,4 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	104
Figura 50: Crescimento da cepa em células/mL em meio Bold 3N [NO ₃ :PO ₄]=16,6. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	105
Figura 51: Crescimento da cepa em valores de absorvância em meio Bold 3N [NO ₃ :PO ₄]=16,6. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	105
Figura 52: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680nm e 750nm r=0,97).	106
Figura 53: Quantificação das microcistinas em meio Bold 3N [NO ₃ :PO ₄]=16,6 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	106
Figura 54: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio Bold 3N [NO ₃ :PO ₄]=16,6 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	107
Figura 55: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=100. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	108
Figura 56: Crescimento da cepa em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=100, em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	108
Figura 57: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680 nm e 750 nm r=0,93).	109
Figura 58: Quantificação das microcistinas em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=100 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	109
Figura 59: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=100 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	110

Figura 60: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	111
Figura 61: Crescimento da cepa em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=10 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	111
Figura 62: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680 nm r=0,97 e 750 nm r=0,95).	112
Figura 63: Quantificação das microcistinas em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	112
Figura 64: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio BG 11 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	113
Figura 65: Comparação do crescimento em células/mL entre os experimentos E1-E7.	116
Figura 66: Comparação do crescimento em células/mL entre os experimentos conduzidos em ASM-1, em diferentes proporções de [NO ₃ :PO ₄]. (E1=10; E2=1; E3=20)	116
Figura 67: Comparação do crescimento em células/mL entre os experimentos conduzidos na mesma proporção de [NO ₃ :PO ₄ = 10]. (E1 em ASM-1, E4 em MLA e E7 em BG-11)	117
Figura 68: Comparação da produção de microcistinas intracelular entre os experimentos E1 (NO ₃ :PO ₄ = 10), E2 (NO ₃ :PO ₄ = 1) e E3 (NO ₃ :PO ₄ = 20), em meio ASM-1. Erros padrões podem ser observados (n=3). (* p<0,05).	118
Figura 69: Comparação da produção de microcistinas intracelular entre os experimentos E1 (ASM-1), E4 (MLA) e E7 (BG11), todos na mesma concentração de [NO ₃ :PO ₄ =10]. Erros padrões são observados (n=3). (*p=0,05).	119
Figura 70: Comparação da produção de microcistinas intracelular entre os experimentos controle E1 (NO ₃ :PO ₄ = 10) verso experimentos em BG-11: E6 (NO ₃ :PO ₄ = 100) e E7 (NO ₃ :PO ₄ = 10). Erros padrões podem ser observados (n=3). (* p<0,05)	120
Figura 71: Comparação entre os experimentos E1-E7 da produção intracelular de microcistinas totais (Q _{MC-Totais}). Erros padrões podem ser observados (n=3). (a=p<0,05; b=p<0,005 e c<0,0005).	121
Figura 72: Representação esquemática da organização do gene cluster <i>mcy</i> . Adaptada de (TILLET <i>et al.</i> , 2000).	134
Figura 73: Esquema da execução dos experimentos de análise da expressão gênica	140
Figura 74: Eficiência da reação do gene <i>cpc</i> . Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	143
Figura 75: Eficiência da reação do gene 16S. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	144
Figura 76 : Eficiência da reação do gene <i>mcyB</i> . Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	144

Figura 77: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	145
Figura 78: Quantificação das microcistinas totais em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	145
Figura 79: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	146
Figura 80: Expressão dos genes 16S e <i>mcyB</i> em relação ao gene <i>cpc</i> em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=10.	146
Figura 81: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=100. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	147
Figura 82: Quantificação das microcistinas totais em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=100 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	148
Figura 83: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=100 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	148
Figura 84: Expressão dos genes 16S e <i>mcyB</i> em relação ao gene <i>cpc</i> em meio ASM-1 [NO ₃ :PO ₄]=100.	149
Figura 85: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	150
Figura 86: Quantificação das microcistinas totais em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	150
Figura 87: Relação de microcistinas por células (.....)	151
Figura 88: Expressão dos genes 16S e <i>mcyB</i> em relação ao gene <i>cpc</i> em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=10.	151
Figura 89: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=100. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	152
Figura 90: Quantificação das microcistinas totais em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=100 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	153
Figura 91: Relação de microcistinas por células (Q _{MC-Total}) em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=100 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).	153
Figura 92: Expressão dos genes 16S e <i>mcyB</i> em relação ao gene <i>cpc</i> em meio BG-11 [NO ₃ :PO ₄]=100.	154
Figura 93: Comparação do crescimento em cél/mL entre os experimentos E1 a E4.	156
Figura 94: Comparação entre os experimentos E1-E4 para o conteúdo intracelular de microcistinas totais (Q _{MC-Totais}). Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3) (a=p<0,05 e b=p<0,005).	158
Figura 95: Comparação da produção intracelular de microcistina entre os experimentos em meio ASM-1. E1 ([NO ₃ :PO ₄]=10) e E2 ([NO ₃ :PO ₄]=100). Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3). (a=p<0,05 e b=p<0,005).	158

Figura 96: Comparação da produção intracelular de microcistina entre os experimentos em meio BG-11 E3 ([NO ₃ :PO ₄]=10) e E4 ([NO ₃ :PO ₄]=100). Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3)	
Erros padrões podem ser observados (n=3). (a=p<0,005).	159
Figura 97: Comparação da expressão do <i>mcyB</i> em relação ao gene <i>cpc</i> em todos os experimentos.	160
Figura 98: Comparação da expressão do 16S em relação ao gene <i>cpc</i> em todos os experimentos	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade de algumas variantes de microcistina (CHORUS & BARTRAM, 1998; FUREY <i>et al.</i> , 2008).....	35
Tabela 2. Resultado dos experimentos de isolamento e análise de toxina.	63
Tabela 3: Resultados da análise de inibição da acetilcolinesterase.	64
Tabela 4. Resultado dos experimentos de análise de toxinas.	67
Tabela 5: Parâmetros de monitoramento de íons por detecção MRM.	84
Tabela 6: Proporção nitrato e fosfato nos meios de cultura utilizados.....	90
Tabela 7: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e respectiva concentração por litro de solução.....	91
Tabela 8: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e a concentração em Mol/L.....	92
Tabela 9: Comparação das taxas de crescimento entre os experimentos.	114
Tabela 10: Valores indicativos de diferença estatística (p) na comparação dos grupos (E2 – E7) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem, relativo ao crescimento exponencial e total.	115
Tabela 11: Valores indicativos de diferença estatística (p) obtidos por meio de teste de ANOVA seguida de Tukey na comparação dos grupos (E2 – E7) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem.	122
Tabela 12: Sequência dos iniciadores e sondas.....	139
Tabela 13: Proporção nitrato e fosfato nos meios de cultura utilizados.	141
Tabela 14: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e respectiva concentração por litro de solução.....	141
Tabela 15: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e suas concentração molar.	142
Tabela 16: Relação das eficiências das reações de RT-PCR.	143
Tabela 17: Comparação das taxas de crescimento entre os experimentos.	155
Tabela 18: Valores indicativos de diferença estatística (p) na comparação dos grupos (E2 – E4) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem, relativo ao crescimento exponencial e total.	155
Tabela 19 Valores indicativos de diferença estatística (p) obtidos por meio de teste de ANOVA seguida de Tukey na comparação dos grupos (E2 – E4) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem relativos à produção de toxinas intracelular.	157

LISTA DE ABREVIACÕES

ADDA - ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6dienóico
ATP – adenosina trifosfato
bp- pares de base
cDNA – DNA complementar
D-Asp - ácido aspártico
Desm MC - microcistina desmetilada
Dha - diidroalanina
Dhb - diidrobutirina
DIN – nitrogênio inorgânico dissolvido
DL – dose letal
D-MeAsp – ácido aspártico desmetilado
DNA – ácido desoxirribonucléico
DON – nitrogênio orgânico dissolvido
EDTA – ácido etileno diamina tetra acético
EROS – espécies reativas de oxigênio
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco
Kb – 10^3 pares de base
LC-MS- Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LTPNA – Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas
MC – microcistinas
Mdha - N-metildiidroalanina
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NRPS – (*Non ribosomal peptide synthetase*) ou Síntese de peptídeos não ribossomais
OATP – (*Organic anion-transporting polypeptides*) ou Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – reação de polimerase em cadeia
PDA – arranjo fotodiodo
PKS – (*Polyketide synthases*) ou síntese de policetídeos
PMN – polimorfonucleares
PP – proteínas fosfatases
 Q_{MC} – quociente de microcistinas
r - teste de correlação de Pearson
RFA – Radiação fotossintética ativa
RNA – ácido ribonucléico
RQ – quantificação relativa
RT-PCR – Reação de polimerase em cadeia em tempo real
UFC – unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO DA TESE	24
2. Introdução.....	26
2.1 O problema da eutrofização e o crescimento acelerado do fitoplâncton	26
2.2 Aspectos fisiológicos e bioquímicos das cianobactérias	27
2.3 Toxinas produzidas por cianobactérias: cianotoxinas	31
2.3.1 Microcistina: a toxina mais comum produzida por cianobactérias	32
2.3.2 Detecção e casos de exposição à microcistina.....	38
2.4. Legislação para o controle de Cianobactérias e monitoramento de cianotoxinas.....	39
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS.....	42
4.1 Objetivo geral	42
4.2 Objetivos específicos.....	42
5. CAPÍTULO I – Coletas de amostras ambientais, isolamento e determinação de toxinas em cepas de cianobactérias	43
5.1 Introdução.....	43
5.1.1 Isolamento e cultivo de cepas de cianobactérias	43
5.2 Objetivos	44
5.3 Material e Métodos	45
5.3.1. Material.....	45
5.3.2 Métodos	46
5.3.2.1 Coleta, identificação e separação de amostras.....	46
5.3.2.2 Concentração material coletado ou proveniente do aumento de biomassa.....	46
5.3.2.3 Extração para análise de microcistinas em LC-MS Ion Trap	46
5.3.2.4 Extração para análise de saxitoxina, anatoxina-a e cillindrospermopsina em LC-MS Ion Trap	47
5.3.2.5 Extração de anatoxina-a(S)	48

5.3.2.6 Determinação da atividade/inibição da acetilcolinesterase	49
5.3.2.7 Técnica de isolamento mecânico	50
5.3.2.8 Técnica de plaqueamento	51
5.3.2.9 Manutenção das cepas e aumento da biomassa	51
5.3.2.10 Meio de Cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964)	51
5.4 RESULTADOS.....	53
5.4.1 Coleta de amostras e análise de toxinas.....	53
5.4.1.1 Reservatório de Salto Grande em Americana – SP	53
5.4.1.2 Usina Hidrelétrica Gov. Bento Munhoz da Rocha Netto, Cruz Machado.....	57
5.4.1.3 Represa de Guarapiranga.....	58
5.4.1.4 Represa Billings - braço Taquacetuba	59
5.4.2 Isolamentos de cepas e análise de toxinas	61
5.4.3 Análises das cepas mantidas em cultivo no laboratório.....	64
5.5 DISCUSSÃO	68
6. CAPÍTULO II – Variação nas condições de cultivo e avaliação do crescimento e	
produção de toxina em uma cepa de <i>Microcystis aeruginosa</i>.	69
6.1 Introdução	69
6.1.1 Fatores que influenciam a produção de cianotoxinas	69
6.1.2 Nitrogênio e fósforo, os principais nutrientes das cianobactérias	71
6.1.3 Concentração de nitrogênio e fósforo no crescimento e produção de microcistinas	72
6.1.4 Por que as cianobactérias produzem microcistinas?	74
6.2 OBJETIVOS	76
6.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
6.3.1 MATERIAL.....	76
6.3.2 MÉTODOS.....	77
6.3.2.1 Variação nas condições de cultivo	77
6.3.2.2 Meio de cultura ASM - 1 (GORHAM et al., 1964)	78
6.3.2.3 Meio de Cultura MLA (BOLCH & BLACKBURN, 1996)	79
6.3.2.4 Meio de cultura BOLD 3N (NICHOLS & BOLD, 1965).....	81
6.3.2.5 Meio de cultura BG11 (RIPPKA et al., 1979; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003).....	82
6.3.2.6 Contagem de cianobactérias em câmara de Neubauer	83

6.3.2.7 Determinação espectrofotométrica (VALER & GLOCK, 1999).....	83
6.3.2.8 Preparo das amostras para análise de toxina	83
6.3.2.9 Quantificação de microcistinas por LC-MS Q trap	83
6.3.3 Cálculos	84
6.3.3.1 Cálculo da velocidade de crescimento (μ)	84
6.3.3.2 Cálculo das taxas de produção celular de toxina	86
6.3.3.3 Análise estatística dos dados	86
6.4 RESULTADOS.....	88
6.4.1 Determinação da curva de crescimento	88
6.4.2 Experimentos de variação.....	90
6.4.2.1 Experimento 1 – controle (E1)	93
6.4.2.2 Experimento 2 (E2).....	96
6.4.2.3 Experimento 3 (E3).....	99
6.4.2.4 Experimento 4 (E4).....	102
6.4.2.5 Experimento 5 (E5).....	105
6.4.2.6 Experimento 6 (E6).....	108
6.4.2.7 Experimento 7 (E7).....	111
6.4.3 Comparação entre os experimentos.....	114
6.4.3.1 Crescimento	114
6.4.3.2 Produção de microcistinas por célula	118
6.5 Discussão.....	125
7. CAPÍTULO III – Transcrição Gênica e Biossíntese das Microcistinas.....	130
7.1 Introdução.....	130
7.2 Objetivo.....	135
7.3 Material e Métodos	135
7.3.1 Material.....	135
7.3.2 Métodos.....	136
7.3.2.1 Variações condições de cultivo	136
7.3.2.2 Contagem de cianobactérias em câmara de Neubauer	137
7.3.2.3 Preparo das amostras para análise de toxinas.....	137
7.3.2.4 Quantificação de microcistinas por LC-MS Q Trap.....	137

7.3.2.5 Isolamento RNA.....	137
7.3.2.6 Síntese de cDNA	138
7.3.2.7 PCR em tempo real.....	138
7.3.2.8 Desenho dos iniciadores e sondas	138
7.3.2.9 Eficiência das reações	139
7.4 Resultados	141
7.4.1 Comparação meios de culturas.....	141
7.4.2 Determinação das eficiências das reações de RT-PCR	143
7.4.3 Experimento 1 – controle (E1)	145
7.4.4 Experimento 2 – (E2).....	147
7.4.5 Experimento 3 – (E3).....	150
7.4.6 Experimento 4 – (E4).....	152
7.4.7 Comparação entre os experimentos.....	155
7.4.7.1 Crescimento	155
7.4.7.2 Produção de microcistinas por células.....	157
7.4.7.3 Expressão gênica	160
7.5 Discussão.....	161
8. Conclusões.....	165
9. Referência Bibliográfica	166
ANEXO 1	174
Dados de validação de método analítico por LC-MS Qtrap	174
ANEXO 2 - Resultados estatísticos	180
ANEXO 3 - Intercâmbio na Friedrich-Schiller-University of Jena, Alemanha.....	197
ANEXO 4 - Intercâmbio na Pontificia Universidad Católica de Chile.....	233
ANEXO 5 – Disciplinas cursadas.....	255
ANEXO 6 - Produção científica.....	259
ANEXO 7 - Currículo Lattes	270

1. APRESENTAÇÃO DA TESE

Para ser possível iniciar os estudos da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias, primeiramente era necessário uma cepa do gênero *Microcystis* que fosse produtora de uma ou mais variantes de microcistinas. Portanto, foram realizadas coletas de amostras da natureza em diferentes reservatórios do Estado de São Paulo e Paraná, que já tinham histórico da presença de florações de cianobactérias e também suas cianotoxinas. Amostras de água foram coletadas em duas ocasiões no reservatório de Salto Grande na cidade de Americana, São Paulo; no braço de Taquacetuba, que faz parte do reservatório Billings, na cidade de São Paulo e na represa de Guarapiranga, também em São Paulo. No estado do Paraná foi realizada uma coleta no Reservatório da Usina Hidrelétrica Governador Bento Munhoz da Rocha Netto, na cidade de Cruz Machado.

Após o processamento do material coletado, foram realizadas análises para a certificação da presença de cianobactérias e também para a detecção de toxinas nestas amostras. A partir deste ponto foram iniciados os processos de isolamento de cepas de cianobactérias sempre acompanhados das análises de toxinas.

Assim que houve o isolamento da primeira cepa produtora de microcistinas, começaram os experimentos de variações nas condições nutricionais de cultivo para se avaliar as possíveis diferenças no comportamento do crescimento e produção das microcistinas.

Somente depois de conhecermos as condições de cultivo que demonstravam alterações na produção de microcistinas, foi dado início à última etapa. Essa consistiu em aliar os dados de crescimento, produção de toxina e expressão gênica. Para isso foram realizados experimentos nas condições de variação nutricional que se mostraram mais significativas para alguma diferença na produção de toxina na etapa anterior, e então observado novamente o crescimento, produção de toxina e também a expressão de diferentes genes

envolvidos nos processos do metabolismo celular e na formação do complexo enzimático responsável pela síntese das microcistinas.

Visando uma melhor organização do conteúdo e etapas que compõem esta tese, optou-se por dividi-la em três capítulos, apresentados com revisão da literatura, objetivo do capítulo, materiais e métodos, resultados e discussão relativos ao assunto abordado.

O primeiro capítulo apresenta os passos para a obtenção das cepas isoladas, desde a coleta das amostras da natureza, seu processamento e análises, processos de isolamento das cepas e detecção das toxinas produzidas.

No segundo capítulo são abordados os ensaios de variação nas condições de cultivo da cepa isolada na etapa anterior, com a análise do crescimento e produção das variantes da microcistina.

No terceiro e último capítulo estão os resultados das análises que contemplam a junção de todas as etapas anteriores, onde a mesma cepa de *Microcystis* sp é estudada não só o seu crescimento e análise de toxinas, mas também na avaliação da expressão de alguns de seus genes relevantes na produção das microcistinas.

2. INTRODUÇÃO

2.1 O problema da eutrofização e o crescimento acelerado do fitoplâncton

Um dos problemas que atualmente desafiam as instituições responsáveis pelo fornecimento de água para a população é a chamada floração, que se caracteriza por um crescimento acelerado de algas e cianobactérias. Estes episódios estão intimamente relacionados com a eutrofização artificial de ambientes aquáticos. A eutrofização é um dos estados da sucessão natural dos ecossistemas de lagos, represas ou grandes porções de água, que ocorre ao passar dos anos. Esse processo é o enriquecimento do ambiente aquático com nutrientes, principalmente compostos contendo nitrogênio na forma de nitrato, fósforo na forma de fosfatos ou ambos. A atividade humana pode acelerar este cenário. Naturalmente levariam séculos para um ambiente oligotrófico (baixas concentrações de nutrientes) se tornar hipertrófico (altas concentrações de nutrientes). Porém, com a intervenção antropogênica, esse processo é acelerado e essa transição pode ser observada em poucas décadas (BIANCHI *et al.*, 2000). Portanto, à medida que o tempo passa os nutrientes inorgânicos e substâncias orgânicas gerados pelo homem, principalmente na forma de efluentes domésticos, industriais, cargas difusas urbanas e agrícolas, além de outros contaminantes se acumulam dentro da bacia hidrográfica. Consequentemente há o desenvolvimento cada vez maior das populações de fitoplâncton, observando-se com frequência o aparecimento de florações algais e de cianobactérias, ou “*blooms*” em inglês (WETZEL, 1993). Normalmente, as florações possuem dominância de algumas espécies de cianobactérias em água doce.

Além do aumento da biomassa fitoplanctônica e a possível toxicidade de algumas espécies, o desequilíbrio ecológico entre os organismos que compõem a comunidade do ecossistema pode causar uma variedade de outros problemas relacionados à eutrofização. Entre eles, o aumento da biomassa de outros organismos, como algas perifíticas e também macrófitas, com a variação da

composição das espécies. Ocorre, portanto a diminuição da zona eufótica, conseqüente menor penetração da irradiância e transparência da água, alterações de odor e sabor, resultado do aumento da produção de substâncias tais como a geosmina e o metil-isoborneol, produzidas pelas microalgas, acarretando problemas e aumentos de custos no tratamento da água (SMITH *et al.*, 1999).

Sob condições eutróficas, a concentração do oxigênio dissolvido na água aumenta consideravelmente durante o dia devido à intensa atividade fotossintética da população autotrófica. Durante a noite essa concentração diminui drasticamente pelo aumento na taxa da respiração celular realizada pelos mesmos organismos fotossintetizantes e também pelos microorganismos que se alimentam desta população. Quando a concentração de oxigênio dissolvido diminui e atinge níveis críticos, peixes e outros animais aquáticos não resistem e morrem. Em situações extremas, condições extremamente pobres em oxigênio, há o desenvolvimento de grupos de bactérias anaeróbicas e essas regiões são chamadas de zonas mortas (HORRIGAN *et al.*, 2002).

2.2 Aspectos fisiológicos e bioquímicos das cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos procariontes aeróbicos fotoautotróficos. Assemelham-se às bactérias por serem procariontes, mas sua fisiologia é bastante similar aos vegetais inferiores. Estão amplamente distribuídas por todo o mundo e presentes nos mais diversos habitats terrestres, que incluem vastas áreas oceânicas, regiões de água doce e salobra, solo e até mesmo desertos áridos, lagos glaciais e águas termais (HERRERO *et al.*, 2001).

A origem das cianobactérias foi estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos pela descoberta de fósseis em rochas sedimentares encontradas no noroeste da Austrália. Estes organismos, portanto, estão entre os pioneiros na Terra, sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (AZEVEDO & VASCONCELOS, 2006).

Compõem um grupo morfológico altamente diversificado, podem se apresentar na forma unicelular, vivendo em colônias ou como filamentos

multicelulares (RIPPKA *et al.*, 1979). As formas unicelulares podem aparecer esféricas, ovóides ou ainda cilíndricas. Por outro lado, as formas multicelulares são chamadas de tricomas e quando envoltos por uma bainha mucilaginosa recebem a denominação de filamentos, que por sua vez podem ser retos ou espiralados (CHORUS & BARTRAM, 1998).

A reprodução é exclusivamente assexuada, podendo ser variada na sua forma. Geralmente ocorre por fissão binária ou múltipla, em diferentes planos de divisão para as formas coloniais. As espécies filamentosas podem se reproduzir pela fragmentação do tricoma, geralmente sucedem a formação de um necrídeo, que representa um ponto de fragilidade no segmento. É formado então o hormogônio, que dará origem a um novo filamento. Outros tipos de reprodução assexuada também são encontrados em diferentes grupos de cianobactérias, porém menos freqüentes. Algumas espécies, neste caso exclusivamente as formas unicelulares e coloniais, podem formar exócito, que é a divisão transversal na parte superior da célula ou ainda a formação de baeócitos, com a clivagem do protoplasma e toda divisão do conteúdo citoplasmático em diversas partes, que depois aumentam de tamanho e formam novas células (CHORUS & BARTRAM, 1998).

A parede celular das cianobactérias é semelhante à das bactérias gram-negativas. Externamente à parede pode haver a presença de envelope mucilaginoso, para as formas cocóides ou ainda uma bainha mucilaginosa, que são compostas principalmente de polissacarídeos (AZEVEDO & VASCONCELOS, 2006).

Estes organismos possuem clorofila-a e fotossistemas I e II, contendo alguns carotenóides comuns em plantas superiores e alguns exclusivos de cianobactérias, ao contrário das bactérias fotossintéticas. São as únicas a possuírem ficobilissomos, com pigmentos acessórios ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina. Outros pigmentos e demais componentes celulares, tais como grânulos de cianoficina, substâncias de reserva, carboxissomos e ribossomos, além do material genético estão dispersos no citoplasma (AZEVEDO &

SANT'ANNA, 2006; RIVIERS, 2006).

O reino ao qual estes organismos fazem parte é o das Eubactérias, também conhecido como Protistas. Segundo Riviers, em 1971 eram conhecidos cerca de 150 gêneros e 2.000 espécies. Em 2006, Azevedo e Sant'Anna estimaram que cerca de 2.400 espécies já foram caracterizadas. São quatro ordens que compõem a divisão das *Cyanobacterias*. As ordens *Chroococcales* e *Oscillatoriales* possuem somente células vegetativas nos organismos representantes, enquanto as ordens *Nostocales* e *Stigonematales* apresentam além das células vegetativas, células diferenciadas, como o heterócito e o acineto.

O heterócito é especializado na fixação de nitrogênio atmosférico. Originam-se de células vegetativas que espessam a parede celular, perdem parte de seu conteúdo citoplasmático e desenvolvem pequenas zonas salientes, chamadas nódulos polares, direcionadas para o interior da célula que permitem a comunicação com células vegetativas vizinhas. Esta célula especializada capta N_2 atmosférico por meio de enzimas do tipo nitrogenase, transformando-o em NH_4 . O espessamento da parede celular impede a entrada de oxigênio, permitindo a ação da enzima nitrogenase que é facilmente oxidada. Nestas células ainda há a ausência do fotossistema-II que usa a energia luminosa para oxidar as moléculas de água e produzir elétrons, prótons e oxigênio, permitindo de tal maneira a nitrogenase atuar em condição anaeróbica total. Por outro lado, a presença do fotossistema-I permite a síntese de ATP e de NADPH necessários ao metabolismo celular e especialmente à redução do nitrogênio gasoso em amônio. Desta forma a fotossíntese e a fixação do nitrogênio ocorrem simultaneamente, porém em compartimentos distintos. (HERRERO *et al.*, 2001; RIVIERS, 2006).

O acineto é outra especialização celular bastante observada. É uma célula de resistência que se desenvolve quando as condições no ambiente não estão favoráveis. Da mesma forma do heterócito, esta célula se origina de uma célula vegetativa que espessa a parede celular, aumenta de tamanho e estoca grandes quantidades de substâncias de reserva. Os acinetos permanecem vivos e germinam quando as condições ambientais favorecerem o desenvolvimento dos

tricomas (AZEVEDO & SANT'ANNA, 2006).

Os gêneros que apresentam essas diferenciações e mais comumente encontrados em ambientes aquáticos são:: *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*. Os gêneros *Microcystis* e *Oscillatoria*, não desenvolvem estas células e podem ter seu crescimento prejudicado em águas com pouca concentração de nitrogênio (CHORUS & BARTRAM, 1998; SANT'ANNA *et al.*, 2007).

Outra especialidade das cianobactérias comum a todos os gêneros planctônicos é a presença de aerótopos. São vacúolos de ar constituídos de vesículas gasosas permeáveis somente aos gases. Essas estruturas permitem às células controlarem sua flutuabilidade na coluna d'água e moverem-se em direção à superfície ou zonas mais profundas, quando há necessidade da regulação da atividade metabólica e fotossintética. Em algumas espécies há o rompimento dos vacúolos para a descida da célula na coluna d'água, porém em outras espécies, como algumas *Microcystis* sp os vacúolos são resistentes e não se rompem, neste caso as células sintetizam amido que funciona como um lastro. Essas estruturas também foram observadas em bactérias (AZEVEDO & SANT'ANNA, 2006; RIVIERS, 2006)

Alguns organismos presentes em coletas realizadas nos reservatórios Salto Grandes no município de Americana (SP) e Taquacetuba, braço da represa Billings, na cidade de São Paulo (SP) podem ser vistas na figura 1.

Figura 1. Fotos de espécies de cianobactérias presentes no Reservatório de Salto Grande (a) e Taquacetuba (b).

2.3 Toxinas produzidas por cianobactérias: cianotoxinas

Algumas espécies de cianobactérias, principalmente as planctônicas que predominam em florações, podem produzir toxinas (cianotoxinas), que são alguns dos produtos de seu metabolismo secundário. As cianotoxinas produzidas podem ser classificadas como hepatotóxicas, que são os peptídeos cíclicos: microcistina e nodularina; neurotóxicas, representadas pelos alcalóides tal como anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s). A cilindrospermopsina é também um alcalóide, porém seu mecanismo de ação é a citotoxicidade e a hepatotoxicidade. Outro grande grupo é o das saxitoxinas. Elas são alcalóides carbamatos divididos em três classes distintas: as não sulfatadas que são as saxitoxinas propriamente ditas; as mono sulfatadas – gonyautoxinas e as dissulfatadas - C toxinas (CHORUS & BARTRAM, 1998; VAN APELDOORN *et al.*, 2007). Existem também as bislactonas fenólicas, como a aplysiatoxina e debromoaplysiatoxina. Ambas podem induzir a formação de tumor e são ativadoras da proteína quinase C. E ainda a lyngbiatoxina-a, cuja estrutura é idêntica ao isômero da teleocidina-A, encontrada no micélio de várias cepas de *Streptomyces sp.* E por último, as toxinas lipopolissacarídicas, que são característica comum de várias espécies de cianobactérias e responsáveis pelo efeito dermatotóxico (VAN APELDOORN *et al.*, 2007).

As principais cianotoxinas e respectivas estruturas químicas podem ser vistas na figura 2.

Figura 2. Principais toxinas produzidas por cianobactérias. Estruturas gerais das nodularinas e microcistinas. (desenhadas com auxílio do software ChemDraw[®] versão 11.0)

Gêneros diferentes de cianobactérias podem produzir a mesma cianotoxina. Por exemplo, o gênero *Anabaena* que pode produzir as cianotoxinas microcistina, anatoxina-a, saxitoxina, enquanto gêneros diferentes como *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* podem produzir a mesma cianotoxina microcistina (JANSE *et al.*, 2004).

2.3.1 Microcistina: a toxina mais comum produzida por cianobactérias

As microcistinas constituem uma família de cianotoxinas, que são hepatotóxicas e produzidas por diversos gêneros de cianobactérias, como *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* (cianobactéria terrestre), *Synechocystis* e *Lyngbya* (DAWSON, 1998; MSAGATI *et al.*, 2006; SIVONEN, 2006). A primeira microcistina foi isolada em meados de 1978 por Elleman *et al.* da espécie *Microcystis aeruginosa*. Descrita como um

heptapeptídeo cíclico com massa molecular variando entre 800 a 1100 (CHORUS & BARTRAM, 1998). Atualmente, sabe-se que a massa molecular de cada uma das variantes desta molécula pode estar entre 500 e 1100 Da (VAN APELDOORN *et al.*, 2007). Foram reportadas até o momento 77 variantes desta molécula (FUREY *et al.*, 2008).

As microcistinas são solúveis em metanol e em água, mas insolúveis em solventes apolares. Este grupo de cianotoxinas é extremamente estável em diversas condições (VAN APELDOORN *et al.*, 2007). Em ambientes naturais, principalmente na ausência de luz, as microcistinas podem permanecer estáveis por meses e até anos. A hidrólise ocorre somente em condições extremas, como a 6M HCl e a altas temperaturas (CHORUS & BARTRAM, 1998).

A estrutura básica da microcistina é a sua forma mais encontrada na natureza e pode ser denominada como ciclo (D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷). Essa estrutura envolve cinco aminoácidos praticamente invariáveis, D-alanina (1), *D-MeAsp* (ácido D-metilaspártico) (3), *Adda* (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6dienóico) (5), ácido D-glutâmico (6) e *Mdha* (N-metildiidroalanina) (7). E dois L-aminoácidos variáveis **X** e **Z** (2 e 4). Além de diferentes radicais nos aminoácidos das posições (3) e (7), **R**¹ e **R**² que podem ser H (hidrogênio) ou CH₃ (grupamento metil) (CHORUS & BARTRAM, 1998; SIVONEN, 2006). Como pode ser observado na figura 3.

Uma alteração bastante comum a essas moléculas é na posição 7. Normalmente nesta posição está o grupo *Mdha* (N-metildiidroalanina) ou ainda esse mesmo radical desmetilado, o *Dha* (diidroalanina). Em algumas variantes é encontrado o radical *Dhb* (diidrobutirina). Outros aminoácidos podem ocupar esta posição, como o *D*- e *L*- *Alanina* e *N-MeAla* (*N*- metil alanina) ou ainda *L-Ser* (serina) (KAYA *et al.*, 2001).

Outra posição que pode sofrer modificação é a posição 3. Esta posição é geralmente ocupada pelo *D-MeAsp*, mas esse radical desmetilado, o *D-Asp* (ácido aspártico) também é comumente encontrado (HARADA *et al.*, 1990). Além disso,

outras variações como desmetilação ou acetilação no carbono 9 do aminoácido ADDA podem ocorrer (FUREY *et al.*, 2008).

Referidas anteriormente na literatura como cianoviridinas, cyanoginosina, *fast death factor* ou ainda toxina de *Microcystis*, hoje são chamadas somente de microcistinas. A nomenclatura atual ainda estabelece que as duas letras do sulfixo indiquem os aminoácidos que se ligam às posições **X** e **Z** (2 e 4) da molécula (CARMICHAEL *et al.*, 1988). Essas posições são as que apresentam mais variações, podendo ser ocupadas por diferentes aminoácidos, como: arginina, leucina, alanina, tirosina, fenilalanina e triptofano (FUREY *et al.*, 2008)

Figura 3: Esquema da estrutura molecular da microcistina. (desenhada com o auxílio do software ChemDraw[®] versão 11.0)

A toxicidade das microcistinas representada em DL₅₀ fica entre 50µg/kg até 1.200 µg/kg de peso corpóreo, dependendo da variante da molécula. A toxicidade da microcistina-LR pela via intraperitoneal é de 50µg/kg em ratos e por via oral é 5.000µg/kg a 10.000µg/kg dependendo da espécie de ratos ou camundongos que foi exposta. A toxicidade de outras microcistinas (MC), como MC-LA, MC-YR, e MC-YM é semelhante à MC-LR, mas outras como a MC-RR por via intraperitoneal o DL₅₀ é dez vezes maior que a MC-LR. Outro exemplo da variação da atividade

biológica é a 6(*E*)-Adda-microcistina que é bastante tóxica. Na presença de radiação ultra violeta, esta variante torna-se o isômero não tóxico 6(*Z*)-Adda-microcistina e vice-versa (CHORUS & BARTRAM, 1998). A rapidez com que a microcistina pode causar um dano grave ao fígado é muito superior quando comparadas a outras cianotoxinas hepatotóxicas, assim sendo, uma injeção aplicada em rato demora entre 1h a 3h para levar o animal ao óbito (VAN APELDOORN *et al.*, 2007).

As toxicidades de algumas variantes da microcistina relevantes neste estudo podem ser observadas na tabela abaixo, na forma de DL₅₀:

Tabela 1. Toxicidade de algumas variantes de microcistina (CHORUS & BARTRAM, 1998; FUREY *et al.*, 2008).

Microcistina	Peso molecular	DL ₅₀ [*]
MC-LR	994	50
[D-Asp³] MC-LR	980	160 - 300
[Dha⁷]MC-LR	980	250
MC-RR	1037	600
[D-Asp³] MC-RR	1023	250
[Dha⁷]MC-RR	1023	180
MC-YR	1044	70

* Toxicidade determinada por via intraperitoneal em ratos (µg de toxina/Kg de peso corpóreo). A DL₅₀ representa o valor da dose de toxina letal a 50% dos animais expostos.

Muitos estudos para elucidar o mecanismo de ação destas moléculas têm sido conduzidos *in vivo* em animais de laboratório, *in situ*, em sistemas e órgãos isolados e também ensaios *in vitro* em preparações de células isoladas.

Exceto para algumas microcistinas hidrofóbicas, a maioria não penetra diretamente a membrana lipídica animal, vegetal ou das bactérias. Sua entrada nas células ocorre através dos transportadores de membrana, como exemplo o transportador de ácido biliar em hepatócitos (*OATP – Organic anion- transporting*

polypeptide). Este é o motivo pelo qual o fígado é o órgão primário para exposição e intoxicação por microcistinas. Nas administrações de doses sub-letais de microcistina radioativamente marcada, feitas por via intravenosa e intraperitoneal em ratos, observa-se que rapidamente cerca de 70% da toxina é encontrada no fígado do animal (CHORUS & BARTRAM, 1998).

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

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

A hiperfosforilação também pode ser o mecanismo responsável pela promoção de tumores devido a: (i) formação de nódulos nos hepatócitos associados às mudanças morfológicas e (ii) inativação dos produtos dos genes

supressores de tumor (retinoblastoma e P53) (DITTMANN & WIEGAND, 2006; CAMPOS & VASCONCELOS, 2010) .

Outro processo importante da toxicidade às microcistinas é o estresse oxidativo que elas promovem pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO podem ser os radicais superóxido, hidroxila e radicais de compostos orgânicos celulares, que participam de reações como a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e também do DNA ou ainda por espécies reativas, como o H_2O_2 , peróxidos orgânicos e o oxigênio singlete. A formação das ERO pode estar relacionada com a desorganização do citoesqueleto e conseqüente hepatotoxicidade, além disso, o aumento da sua produção pode ocorrer pela ruptura da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A formação de ERO pela MC-LR em cultura de hepatócitos de ratos, também está relacionada com alterações na concentração de glutathione (KUJBIDA *et al.*, 2008).

Um estudo observou que mesmo em concentrações mais baixas do que as recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para exposição crônica, a microcistina afeta leucócitos polimorfonucleares (PMN) humanos (KUJBIDA *et al.*, 2006). O efeito da microcistina sobre os PMN é um incremento para sua atividade tóxica. Os PMN se deslocam da corrente sanguínea até a área de maior concentração da toxina, o fígado. O efeito direto da microcistina nos hepatócitos causa dano citoplasmático, necrose, hemorragia hepática e fibrose é a causa do influxo das células inflamatórias, além do efeito quimiotático exercido pelas microcistinas nos PMN (KUJBIDA *et al.*, 2006).

A biotransformação ocorre por conjugação da microcistina e da glutathione intracelular, pela ação da enzima glutathione-S-transferase. Este complexo conjugado permanece ativo e ainda é capaz de inibir as PPs. É então metabolizado pelas enzimas gama glutamil transferase e peptidases e forma a MC-cisteína-S conjugada. Esta biotransformação ocorre nos organismos aquáticos, como peixes, mexilhões, daphnias e macrófitas, bem como em roedores e aves (DITTMANN & WIEGAND, 2006).

As microcistinas e a microcistinas-cojugada são levadas pela corrente circulatória até outros órgãos, músculos e cérebro. Os rins são afetados e podem sofrer apoptose celular e degeneração morfológica das cápsulas de Bowman e dos túbulos renais (CHORUS & BARTRAM, 1998).

A meia vida de eliminação da microcistina em ratos é de cerca de 30 min. A excreção em camundongos se dá principalmente pelas fezes (15%) e urina (9%), e sua maior parte não é metabolizada e detectada até seis dias após exposição (BISCHOFF, 2001).

2.3.2 Detecção e casos de exposição à microcistina

Populações de cianobactérias produtoras e não-produtoras de toxina podem coexistir no mesmo ecossistema e são indistinguíveis por microscopia ótica. Os métodos mais comumente usados para detectar as toxinas incluem cromatografia líquida de alta eficiência com diferentes detectores, como arranjo diodo (HPLC-PDA), cromatografia líquida e gasosa, também acopladas a diferentes detectores, mas especialmente a espectrometria de massas merece destaque (LC-MS). Além de outras técnicas, como cromatografia em camada delgada, ensaio de inibição das fosfatases, imunoenaios, entre outros (VAN APELDOORN *et al.*, 2007).

É difícil apurar a primeira ocorrência de floração de cianobactéria, justamente por elas estarem entre os primeiros organismos vivos do planeta. Apesar da falta de evidências, existe uma forte especulação sobre a primeira das dez pragas do Egito: “e todas as águas do rio se transformaram em sangue” [Exodus, 7:20] (BÍBLIA, 2002). Uma possível explicação a este fato é a ocorrência de um *bloom* de fitoplâncton (maré vermelha) que explicaria as pragas seqüentes (NORTON & LYONS, 2002).

O primeiro relato de intoxicação de animais por cianobactérias data de 1878, no sul da Austrália no lago Alexandrina (FRANCIS, 1878). Outros casos relacionados com cianotoxinas em todo o mundo são relatados e abrangem intoxicação de animais que bebem diretamente da água contaminada, sofrendo os

sintomas ou óbito. Há casos relacionados às exposições de origem recreativa, quando as pessoas entram em contato direto com as cianotoxinas ao se banharem em águas com altas concentrações das cianobactérias.

No Brasil, as florações de cianobactérias provocadas pelo aumento de nutrientes nas águas, têm causado problemas para a saúde pública (DOMINGOS *et al.*, 1999). Em fevereiro de 1996, em Caruaru, no Estado de Pernambuco, 110 pacientes apresentaram sintomas de intoxicação relatados por hepatotoxinas após tratamento de hemodiálise de rotina. Subsequentemente 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda e 70 deles morreram. Em outubro de 1997, 53 destas mortes foram atribuídas a “Síndrome de Caruaru”. As vítimas foram intoxicadas, portanto, pela água contaminada com microcistinas oriunda de um açude (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001). Outra ocorrência no Brasil, relacionada a presença de cianobactérias na água utilizada para consumo humano, aconteceu em 1988 na represa de Itaparica, região de Paulo Afonso na Bahia. Cerca de 2000 casos de gastroenterite foram relatados e resultaram na morte de 88 pessoas num período de 42 dias (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

2.4. Legislação para o controle de Cianobactérias e monitoramento de cianotoxinas

A portaria número 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, padrão de potabilidade entre outros.

As instituições fiscalizadoras são responsáveis pela realização do monitoramento de cianobactérias nas águas de mananciais. Segundo o capítulo V (dos planos de amostragem), artigo 19º, §1, o monitoramento no ponto de captação deve obedecer frequência mensal quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL (ou 1mm³/L de biovolume), e semanal quando o número de cianobactérias exceder este valor. O capítulo IV (do padrão e

potabilidade) Art. 14º, §1, define os valores de padrão de potabilidade para as substâncias que oferecem risco à saúde humana. No tocante às cianotoxinas determina como valor máximo permitido de 1 µg/L para microcistina, de 15 µg/L para cilindrospermopsina e de 3 µg/L para saxitoxina, sendo as duas últimas apenas uma recomendação (BRASIL, 2004).

Esta Portaria ainda preconiza as técnicas para análise de cianobactérias e cianotoxinas e comprovação de toxicidade por bioensaios em camundongos, incluindo até o estabelecimento de especificações para normas nacionais ou internacionais que disciplinem a matéria, devendo ser adotadas as metodologias propostas pela OMS em sua publicação *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* (CHORUS & BARTRAM, 1998).

Em 2010 ocorreu a revisão desta portaria, onde se mantiveram os valores para o monitoramento de cianotoxinas. Ainda foi incluída a necessidade de monitoramento da anatoxina-a(S), obedecendo-se alguns parâmetros prévios. A portaria esteve em discussões regionais durante todo o ano de 2010 e ainda segue em trâmites burocráticos para sua aprovação pelo governo federal.

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o potencial risco que as cianobactérias representam para a qualidade dos recursos hídricos, principalmente os destinados ao abastecimento humano, é proposta deste trabalho aprofundar o conhecimento sobre esses organismos em culturas mantidas em laboratório. O desenvolvimento de técnicas de isolamento de cepas de cianobactérias produtoras de toxinas e seu cultivo em diferentes condições nutricionais permitem o estudo de alguns dos fatores que influenciam a produção de seus metabólitos tóxicos.

O acompanhamento da produção destes compostos em nível molecular é fundamental para entender os mecanismos envolvidos na biossíntese de toxinas por estas espécies. Atualmente existem poucos trabalhos que avaliam a expressão gênica de espécies de cianobactérias frente a diferentes condições nutricionais de cultivo. O entendimento desses mecanismos é de grande importância para o melhor conhecimento das espécies e maior compreensão dos fatores envolvidos na síntese das toxinas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo central do trabalho é estudar a partir de amostras de florações de cianobactérias coletadas em diversos reservatórios, cepas tóxicas de cianobactérias isoladas a fim de investigar alguns fatores relacionados à biossíntese e à expressão gênica da microcistina.

4.2 Objetivos específicos

- Isolar diferentes cianobactérias de amostras ambientais;
- Estabelecer um banco de cianobactérias;
- Determinar as toxinas produzidas nas diferentes linhagens isoladas;
- Avaliar a variação do crescimento celular de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* em diferentes meios de cultivo;
- Analisar a variação na produção de toxina da cepa de *Microcystis aeruginosa* nos diferentes meios de cultivo;
- Avaliar as diferenças na expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e na síntese de microcistinas pela cepa de *Microcystis aeruginosa* em diferentes meios de cultivo.

5. CAPITULO I – COLETAS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS, ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO DE TOXINAS EM CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS

5.1 Introdução

5.1.1 Isolamento e cultivo de cepas de cianobactérias

As cianobactérias são um dos maiores grupos de organismos gram-negativos, possuindo cerca de 56 gêneros, classificados em mais de 2000 espécies (AZEVEDO & VASCONCELOS, 2006; RIVIERS, 2006). Nessas comunidades microbiológicas, diferentes populações de cianobactérias coexistem e em muitos casos, competem entre si. (CHORUS & BARTRAM, 2003).

Várias características das cianobactérias são observadas somente em seu habitat natural e não são bem reproduzidas em laboratório. Uma das características mais importantes que se observa é diferença na morfologia. Portanto a observação e identificação das espécies devem ser feitas logo que possível, sem a utilização de artifícios de conservação, como lugol ou formol, uma vez que essas substâncias podem dificultar alguns aspectos da identificação, no entanto seu uso é indicado quando a observação do material não for imediata.

O primeiro passo do isolamento das cianobactérias é suspender parte da amostra em meio de cultura e realizar diluições, principalmente se a floração for demasiada intensa. O isolamento pode ser feito a partir de dois procedimentos distintos. O primeiro é a separação manual de um único filamento, utilizando microscópio ótico e pipeta Pasteur esterilizada com ponta adaptada como um fino capilar (URMENETA *et al.*, 2003). Através desta técnica é possível obter cepas clones que formam tricomas ou filamentos.

O segundo método de isolamento é o plaqueamento. Utilizam-se para isso técnicas microbiológicas, onde o meio de cultura é incorporado ao agar ou agarose, as amostras são semeadas em ambiente estéril e mantidas em incubadora até o aparecimento das primeiras unidades formadoras de colônia

(UFC). Depois de observada as características das UFC, as escolhidas são repicadas para o meio de cultura e mantidas em condições de cultivo juntamente com o restante das cepas (SHIRAI *et al.*, 1989). Neste método diversas técnicas podem ser incorporadas, visando a diminuição e até mesmo eliminação do crescimento de diferentes tipos de bactérias juntamente com a cultura, e também o efeito inibitório de crescimento do agar. Para isso podem-se usar menores concentrações de agar, procedimentos de pré-lavagem, esterilização separada e soluções de nutrientes e a substituição do agar por agarose ou ainda outros agentes solidificantes. Paralelo a isso, alguns antibióticos podem ser incorporados ao agar para a inibição do crescimento de bactérias (FERRIS & HIRSCH, 1991).

Outro método de isolamento é próprio para cianobactérias unicelulares, por meio de técnicas intituladas auto-isolantes, para isso utilizam-se algumas características exclusivas da cianobactéria que se deseja isolar. É bastante útil também em culturas mistas ou quando há presença de espécies picoplanctônicas não desejadas (SHIRAI *et al.*, 1989). Ainda o uso de outros agentes inofensivos às cianobactérias, porém tóxicos para as bactérias contaminantes, como fenol, irradiação gama ou UV, temperaturas elevadas, entre outros (FERRIS & HIRSCH, 1991).

5.2 Objetivos

- Isolar diferentes cianobactérias de amostras ambientais;
- Estabelecer um banco de cianobactérias;
- Determinar as toxinas produzidas nas diferentes linhagens isoladas;

5.3 Material e Métodos

5.3.1. Material

- *Para coleta e armazenamento de amostras:* Rede de fitoplâncton (malha de 20 µm), geladeira (Eletrolux®) e Freezer -20°C (Eletrolux®), frascos de polietileno ou vidro, materiais para identificação das amostras, etiquetas.

- *Identificação das amostras:* Lâminas e lamínulas de vidro. Microscópio Primo Star, modelo 415500-0011-00 (Zeiss®).

- *Isolamento e cultivo das cepas:* Tubos de ensaio de vidro neutro 24,5x1x200 mm e 15,5x1x150 mm, balões volumétricos, pipetas graduadas, analíticas e Pasteur, placas de petri de vidro e plástico marca Falcon® 100x15 mm estéril. Algodão e gaze. Erlenmeyers de diferentes capacidades (250 mL, 500 mL, 1 L e 2 L). Reagentes para preparo dos meios de cultura. pHmetro modelo µPA-210 (Hipperquímica/Solumix®). Agitador magnético modelo Te-085 com aquecimento (Tecnal®). Bancada de fluxo laminar vertical modelo PCR2 (Pachane®). Incubadora – Câmara de Germinação, modelo TE-401 com controle de fotoperíodo COEL® (Tecnal®). Autoclave vertical, modelo 415 (Fanen®). Reagentes para preparo de soluções estoques. Agar. Balança analítica modelo APX60 (Denver Instrument®). Espátulas.

- *Para concentração, processamento das amostras, material resultante do aumento de biomassa, extração e análise de cianotoxinas:* Centrífuga modelo 5804-R da marca Eppendorf®. Liofilizador modelo L101 da Liotof®. Speed Vac modelo Savant SPD1010 (Thermo Electron Corporation®). Tubos de plástico com capacidade para 15 e 50 mL da marca Biologix®, tubos plásticos com capacidade de 2mL da marca Eppendorf®, tubos tipo Corex®, metanol. Colunas para extração C18 (Sep-Pak®). Micro filtros, com diâmetro de 0,45 µm, marca Millex®. Seringas de vidro com capacidade para 5 mL, marca ArtiGlass®. Banho de Ultrassom. Seringas de plástico com capacidade para 1 mL da marca (Becton Dickinson®) e agulhas descartáveis. Probe Ultra Sônica – Virsônic Digital 550 – Ultrasonic Cell Disrupter® Modelo #274506. HPLC prominence (Shimadzu®) acoplado a

espectrômetro de massas modelo Esquire HCT (Bunker Daltonics®) – LC-MS Ion trap. Padrões analíticos de microcistinas (MC) – MC-LR; MC-RR e MC-YR Abraxis®.

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Coleta, identificação e separação de amostras

A coleta do material foi feita de duas maneiras: (i) coleta de água em garrafas plásticas e (ii) uso de rede de fitoplâncton de 20 µm em água superficial nos reservatórios. O material foi acondicionado em garrafas plásticas até o laboratório. Uma parte da amostra foi encaminhada para observação em microscópio ótico, cuja identificação das espécies das cianobactérias foi feita pelas características morfológicas das mesmas. Outra parte da amostra (5 mL) foi inoculada em meio de cultura ASM-1 (descrito em 5.3.2.10) e mantida em incubadora. O restante foi separado para ser concentrado.

5.3.2.2 Concentração material coletado ou proveniente do aumento de biomassa

Em tubos Falcon com capacidade para 50 mL a amostra foi centrifugada a 3.214 g por 10 min, com temperatura controlada em 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o centrifugado conservado sob refrigeração para etapa de extração.

5.3.2.3 Extração para análise de microcistinas em LC-MS Ion Trap

Os materiais precipitados foram retirados da refrigeração para descongelamento. Alíquotas de 150 mg a 200 mg da amostra foram pesados, em balança analítica. À amostra foi adicionado 10 mL de água Milli Q® e agitado por 15 segundos no Vortex. Os tubos contendo as amostras em solução foram deixados em banho de ultrassom ou probe por 10 minutos, centrifugados a 3.214

g por 10 minutos, com temperatura controlada em 4°C. A coluna de extração em fase sólida – Sep-Pak Cartridges® (C18) foi condicionada com 3 mL de metanol 100% seguidos 3 mL água Milli Q®. Após a aplicação de 10 mL de amostra, a coluna foi lavada com 3 mL de água Milli Q®, 3 mL de metanol 30% e 3 mL de metanol 100%. A última fração foi coletada e o solvente evaporado em Speed Vac ou fluxo de nitrogênio. O resíduo foi reconstituído em 200 µL de metanol/água 1:1 e filtrado em filtro Millex® (0,45 µm) para vial de HPLC.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Fusion RP (150 x 2,0 mm; 4 µm; Phenomemex) utilizando-se como fase móvel (A) 1 mM de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 1 mM de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila/água (90:10), sob uma vazão de 200 µL/min. O gradiente empregado foi: 0 min, 30% B; 10 min, 50% B; 15 min, 90% B; 17 min, 90% B; 18 min, 30% B; 25 min, 30% B. O efluente da coluna foi dividido em 4 partes, sendo apenas uma parte enviada para a fonte de *electrospray* do espectrômetro de massas (Esquire HCT, Bruker Daltonics), a qual foi operada no modo positivo a 3,5 kV. O espectrômetro foi operado monitorando-se os seguintes íons: 520 (MC-RR), 1045 (MC-YR), 995 (MC-LR) e 910 (MC-LA). Os demais parâmetros empregados para a fonte de íons foram: Nebulizer gas: 35 psi; Drying gas: 5 L/min a 280°C. Hélio foi utilizado como gás de colisão.

5.3.2.4 Extração para análise de saxitoxina, anatoxina-a e cillindrospermopsina em LC-MS Ion Trap

Cerca de 50mg da amostra liofilizada foram pesados em balança analítica, e transferido para tubo de microcentrífuga, ao qual foi adicionado 1 mL de metanol/ácido acético 0,1% (1:1). A amostra foi agitada em vortex por 1 min, submetida a probe de ultrassom por 1 min e banho de ultrassom por 15 min, sendo em seguida centrifugada a 3.214 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido com seringa de 1 mL e filtrado em filtro Millex (0,45 µm) para vial de HPLC.

Para análise de saxitoxina, a separação cromatográfica foi realizada em coluna zic-HILIC (150 x 2,0 mm; 5 μ m; Merck Sequant) utilizando-se como fase móvel (A) 10 mM formiato de amônio + 0,01% ácido fórmico em água e (B) acetonitrila, sob uma vazão de 200 μ L/min. O gradiente empregado foi: 0 min, 50% B; 6 min, 15% B; 10 min, 15% B; 11 min, 50% B; 20 min, 50% B. O efluente da coluna foi dividido em 4 partes, sendo apenas uma parte enviada para a fonte de *electrospray* do espectrômetro de massas (Esquire HCT, Bruker Daltonics), a qual foi operada no modo positivo a 3,5 kV. O espectrômetro foi operado monitorando-se o íon de m/z 300 para a saxitoxina (MH^+). Os demais parâmetros empregados para a fonte de íons foram: Nebulizer gas: 35 psi; Drying gas: 5 L/min a 280 °C. Hélio foi utilizado como gás de colisão.

Para análise de anatoxina e cilindrospermopsina, a separação cromatográfica foi realizada em coluna Polar RP (150 x 2,0 mm; 4 μ m; Phenomenex) utilizando-se como fase móvel (A) 10 mM acetato de amônio + 0,01% ácido acético em água e (B) metanol, sob uma vazão de 200 μ L/min. O gradiente empregado foi: 0 a 5 min, 10% B; 6 min, 60% B; 7 min, 60% B; 7,5 min, 10% B; 15 min, 10% B. O efluente da coluna foi dividido em 4 partes, sendo apenas uma parte enviada para a fonte de *electrospray* do espectrômetro de massas (Esquire HCT, Bruker Daltonics), a qual foi operada no modo positivo a 3,5 kV. O espectrômetro foi operado monitorando-se o íon de m/z 166 para a anatoxina (MH^+) e 416 para a cilindrospermopsina (MH^+). Os demais parâmetros empregados para a fonte de íons foram: Nebulizer gas: 35 psi; Drying gas: 5 L/min a 280 °C. Hélio foi utilizado como gás de colisão.

5.3.2.5 Extração de anatoxina-a(S)

Foram pesados cerca de 500 mg do material concentrado em tubos Eppendorf, adicionado 1 mL de solução extratora (ac. Acético 0,1M e etanol (80:20)) e agitado no vortex por 5 min. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação a 3.214 g por 10 minutos. A solução extratora foi adicionada novamente na mesma

quantidade e o processo foi repetido por três vezes. O sobrenadante foi eluído coluna de extração em fase sólida - Sep-Pak Cartridges[®] (C18), previamente condicionada com 3 mL de metanol 100% e 3 mL de água Milli Q[®]. O eluato foi recolhido e seco para a análise em LC-MS Ion trap. Conforme técnica desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (DORR *et al.*, 2010).

5.3.2.6 Determinação da atividade/inibição da acetilcolinesterase

Preparo dos reagentes:

Tampão fosfato: (PP, 0,1 mol/L, pH 7,4)

Solução 1: 17,8 g de Na₂HPO₄·2H₂O em 1000 mL de água destilada

Solução 2: 2,72 g de KH₂PO₄ em 200 mL de água destilada.

Adicionada a solução 2 na solução 1 até o pH atingir 7,4 em temperatura ambiente. Filtrar o tampão fosfato em filtro Millipore e estocado a 4°C, por até duas semanas.

DTNB: (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)) (10 mmol/L)

Dissolvidos 396,3 mg de DTNB em 100 mL do tampão fosfato sob agitação magnética. Armazenado em alíquotas de 5 mL a -20°C.

Hemolisado (sangue total):

Reagente diluente: Adicionado 300 µL de Triton X-100 a 1000 mL do tampão fosfato. Armazenado em frasco âmbar a 4°C

Coletado sangue com EDTA ou heparina e adicionado 200 µL do sangue total a 20 mL do reagente diluente gelado.

ASCh (Acetilcolina)- substrato- (28,4mmol/L)

Dissolvido 82,24 mg de acetilcolina em 10 mL de água destilada. Armazenado em alíquotas de 1 mL a -20°C.

Procedimento:

REFERÊNCIA I		AMOSTRAS	
Tampão fosfato	1000 µL	1	Tampão fosfato 1000 µL
DTNB	50 µL	2	DTNB 50 µL
Hemolisado	250 µL	3	Hemolisado 250 µL
Solvente extração	20 µL	4	Amostra 20 µL
		5	Acetiltiocolina 30 µL

Os itens 1, 2 e 3 foram mantidos no gelo até o momento da reação.

Os itens 1, 2, 3 e 4 foram colocados em tubo de ensaio de vidro e submetidos ao banho-maria a 37°C, por 3 minutos. Transferidos então para a cubeta do espectrofotômetro e nesta adicionado o 5 (acetiltiocolina). Leitura em espectrofotômetro ajustado (comprimento de onda de 436 nm) durante 3 minutos, com leituras de 30 em 30 s. Realizada leitura do material de referência, substituindo a amostra pelo solvente utilizado na ressuspensão da extração (ELLMAN *et al.*, 1961; WOREK *et al.*, 1999).

5.3.2.7 Técnica de isolamento mecânico

O isolamento de uma única cianobactéria filamentosa foi feito por separação mecânica, colocando-se a amostra em lâmina, observando-se em microscópio em aumento de 50 vezes. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur esticada em chama, por capilaridade e proximidade foi absorvida uma quantidade de material, que foi então transferido para uma gota de meio ASM-1 também em lâmina. Todo o procedimento foi repetido até que permanecesse somente um filamento de cianobactéria. Este último filamento foi transferido para tubo de ensaio contendo meio de cultura previamente esterilizado, com tampão de algodão e gaze. Mantido em incubadora por 10 a 15 dias. O material foi então repicado para erlenmeyer por mais 20 dias para aumento de biomassa. Em seguida o material foi concentrado (como descrito em 5.3.2.2), foram realizadas as etapas de extração e analisadas em LC-MS para presença de cianotoxinas. Conforme descrito nos itens anteriores 5.3.2.3 e 5.3.2.4.

5.3.2.8 Técnica de plaqueamento

Para isolamento de espécies coloniais e purificação de cepas isoladas, foi feito semeadura de 200 µL do material (cultura ou amostra da natureza previamente diluída) em placas de petri com meio ASM-1 incorporado em ágar previamente lavado, na proporção de 1:1. Ocorreu o crescimento das colônias que foram observadas em microscópio ótico. As colônias formadas foram recuperadas do agar e repicadas para meio ASM-1 líquido e então incubadas.

5.3.2.9 Manutenção das cepas e aumento da biomassa

As culturas são mantidas em cultivo em incubadoras. As condições de cultivo são: fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro. Irradiância de 1000 (± 100) lux e temperatura controlada em 23°C ($\pm 0,5^\circ$). O meio de cultura utilizado foi o ASM-1. As culturas são repicadas quinzenalmente com todos os materiais e meio de cultura previamente esterilizados em autoclave (121°C por 20 minutos). Para o aumento de biomassa, os procedimentos de esterilização do material e meio de cultura são os mesmos, a cultura é transferida para erlenmeyers maiores, dependendo da quantidade de biomassa desejada.

5.3.2.10 Meio de Cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964)

Para o preparo das soluções estoque, os reagentes foram pesados um a um em béquer de 50 ml, utilizando balança analítica, dissolvidos em água ultrapura - Milli Q[®] e completados para respectivos volumes em balão volumétrico.

Solução estoque A : NaNO₃ (1,7 g); MgCl₂.6H₂O (0,41 g); MgSO₄ . 7 H₂O (0,49 g) e CaCl₂ . 2H₂O (0,29 g). Completado volume para 200 ml com água Milli Q[®].

Solução estoque B : KH₂PO₄ (0,68 g); NaH₂PO₄.H₂O (0,69 g) ou Na₂HPO₄.7H₂O (1,34 g) ou Na₂HPO₄.12H₂O (1,79 g). Completado volume para 100 ml com água MilliQ[®].

Solução estoque C : H₃BO₃ (2,48 g); MnCl₂.4H₂O (1,39 g); FeCl₃.6H₂O (1,08 g); ZnCl₂ (0,335 g); CoCl₂.6H₂O (0,019 g) e CuCl₂ (0,0014 g). Completado

volume para 100 mL com água Milli Q[®]. **Solução estoque D** : EDTA Na₂ (1,86 g). Completado volume para 100 mL com água Milli Q[®].

O preparo do meio foi realizado em balão volumétrico de 1 L, onde foram adicionados 300 mL de água Milli Q[®] e as seguintes soluções estoque: 20 mL da solução estoque A, 2 mL da solução estoque B, 0,1 mL da solução estoque C e 0,4 mL da solução estoque D.

Esta solução foi homogeneizada e o volume completado para 1 L com água Milli Q[®]. O pH ajustado para 8,0 utilizando soluções de NaOH 1 M ou HCl 1 M.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Coleta de amostras e análise de toxinas

5.4.1.1 Reservatório de Salto Grande em Americana – SP

A primeira coleta realizada no reservatório de Salto Grande, na cidade de Americana, São Paulo, ocorreu em setembro de 2006. Nesta data o reservatório apresentava floração intensa. Como mostrado na figura 4.

Figura 4. Reservatório de Salto Grande – Americana- SP.

Dois pontos de coleta foram estabelecidos para amostragem. A coleta foi realizada conforme item 5.3.2.1. Observações feitas por microscopia ótica revelaram a presença de dois gêneros de cianobactérias: *Microcystis* sp e *Anabaena* sp. Ficou evidente a predominância do gênero *Microcystis* sp.

Para cada amostra, os procedimentos de concentração, extração e análise por LC-MS Ion Trap foram realizados, como descrito nos itens 5.3.2.2, 5.3.2.3 e 5.3.2.4. Pôde-se observar a presença de microcistinas, conforme mostra os cromatogramas e espectros de massa a seguir.

Figura 5. Cromatograma obtido por LC-MS para quatro padrões de microcistinas, conforme descrito no item 5.3.2.3. A fonte de electrospray foi operada no modo positivo monitorando-se os íons de m/z 520 (MC-RR, 5,1 min), 1045 (MC-YR, 8,7 min), 995 (MC-LR, 9,0 min) e 910 (MC-LA, 15,9 min).

Figura 6. Espectro de massas em MS/MS do íon de m/z 520 para padrão de MC-RR (5,1 min), obtido por *electrospray* no modo positivo em ion trap. A fragmentação característica do íon $(M+2H)^{2+}$ pode ser vista.

Figura 7. Espectro de massas em MS/MS do íon de m/z 995 para padrão de MC-LR (9,0 min), obtido por *electrospray* no modo positivo em ion trap. A fragmentação característica do íon $(M+H)^+$ pode ser vista.

Figura 8. Espectro de massas em MS/MS do íon de m/z 1045 para padrão de MC-YR (8,7 min), obtido por *electrospray* no modo positivo em ion trap. A fragmentação característica do íon $(M+H)^+$ pode ser vista.

Figura 9. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 1 (Barragem – setembro de 2006), no reservatório de Salto Grande, em Americana-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520, 5,0 min), MC-YR (m/z 1045, 8,7 min) e MC-LR (m/z 995, 9,0 min) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Figura 10. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 2 (Fazenda Santa Lúcia – setembro de 2006), no reservatório de Salto Grande, em Americana-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520, 5,0 min), MC-YR (m/z 1045, 8,7 min) e MC-LR (m/z 995, 9,0 min) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Portanto, pôde-se observar a presença de três tipos de microcistina (MC) nas respectivas amostras, MC-LR, MC-RR e MC-YR. No ponto 1 (Barragem) ficou evidente a presença da MC-LR e em menor concentração variantes RR e YR. Já no ponto 2 (Fazenda Santa Lúcia), houve menor concentração de MC-LR, seguido por traços da MC-RR e também traços da variante MC-YR.

Nova coleta realizada nesse mesmo reservatório em março de 2007 demonstrou resultados semelhantes aos obtidos anteriormente. Ambos os pontos de coleta foram visitados e amostras de água coletadas, processadas conforme os itens 5.3.2.2, 5.3.2.3 e 5.3.2.4 descritos anteriormente e analisadas por LC-MS e os resultados são mostrados nas figuras 11 e 12.

As observações feitas por microscopia ótica revelaram a presença de dois gêneros de cianobactérias: *Microcystis* sp e *Anabaena* sp. Nesta coleta a dominância foi de cianobactérias do gênero *Anabaena* sp.

Figura 11. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 1 (Barragem – março de 2007), no reservatório de Salto Grande, em Americana-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520), MC-YR (m/z 1045) e MC-LR (m/z 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Figura 12. Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a amostra referente ao ponto 2 – Fazenda Santa Lúcia, reservatório de Salto Grande Americana-SP em março de 2007.

Portanto, pode-se observar a presença das mesmas três variantes de microcistinas observadas anteriormente, nas respectivas amostras, MC-LR, MC-RR e MC-YR.

Em ambos os pontos de coleta analisados, ficou evidenciada a presença da MC-LR em menores concentrações, MC-RR com maior expressão no ponto 1 (Barragem) e menor concentração no ponto 2 (Fazenda Santa Lúcia) e a MC-YR em menor concentração em ambos os pontos.

Para todas estas amostras os resultados para detecção de outras toxinas, como saxitoxina, cilindrospermopsina e anatoxina-a foram negativos.

5.4.1.2 Usina Hidrelétrica Gov. Bento Munhoz da Rocha Netto, Cruz Machado.

A coleta foi realizada em 10 de janeiro de 2007 com auxílio do Instituto Ambiental do Paraná. Foram coletadas amostras em dois pontos distintos. As amostras foram processadas conforme os itens 5.3.2.2, 5.3.2.3 e 5.3.2.4 descritos anteriormente e analisadas por LC-MS.

- Ponto 1: Alagado do Rio Areia.

Figura 13. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 1 (Alagado do Rio Areia – janeiro de 2007), no reservatório da Usina Hidrelétrica Gov. Bento Munhoz da Rocha Netto, em Cruz Machado-PR. A presença do pico característico para MC-LR (m/z 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

- Ponto 2: Barragem do Rio Areia.

Figura 14. Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra referente ao ponto de coleta 2 (Barragem do Rio Areia – janeiro de 2007), no reservatório da Usina Hidrelétrica Gov. Bento Munhoz da Rocha Netto, em Cruz Machado-PR. A presença do pico característico para MC-LR (m/z 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Ambos os pontos de coleta demonstram a presença de MC-LR (9,0).

Nenhuma outra toxina foi detectada nestas amostras.

5.4.1.3 Represa de Guarapiranga

Coleta realizada no dia 19 de janeiro de 2007, em parceria com os Professores Marcelo Pompêo e Viviane Moschini Carlos, colaboradores deste

trabalho. A amostra foi submetida aos mesmos procedimentos descritos anteriormente, itens 5.3.2.2, 5.3.2.3 e 5.3.2.4.

Pelas análises feitas por LC-MS, não foi detectada a presença de nenhuma variante da microcistina. Bem como nenhuma outra toxina.

5.4.1.4 Represa Billings - braço Taquacetuba

A coleta foi realizada em 16 de fevereiro de 2007, pelos professores Marcelo Pompêo e Viviane Moschini Carlos, colaboradores deste estudo. A amostra foi analisada conforme itens descritos em 5.3.2.2 e 5.3.2.3.

Figura 15: Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra coletada no braço Taquacetuba (fevereiro de 2007), no reservatório Billings, em São Paulo-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520), MC-YR (m/z 1045) e MC-LR (m/z 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Por comparação com o cromatograma dos padrões, pôde-se identificar nesta amostra a presença de três tipos de Microcistinas: MC-RR em maior projeção, MC-LR e MC-YR.

Análises para outras toxinas também foram realizadas para esta amostra, segundo procedimento descrito em 5.3.2.4. O que confirmou a presença de saxitoxina, como demonstra o cromatograma da figura 16:

Figura 16: Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra coletada no braço Taquacetuba (fevereiro de 2007), no reservatório Billings, em São Paulo-SP. A presença do pico característico para saxitoxina (m/z 300) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.4.

Nova coleta realizada nesta mesma represa e submetida às mesmas análises, porém em julho de 2007, demonstraram os resultados observados na figura 17.

Figura 17: Cromatograma obtido por LC-MS para a amostra coletada no braço Taquacetuba (julho de 2007), no reservatório Billings, em São Paulo-SP. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520), MC-YR (m/z 1045) e MC-LR (m/z 995) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Nesta segunda coleta, conforme o cromatograma da figura 17 pode-se observar as mesmas variantes detectadas anteriormente. Porém, a intensidades dos picos é menor, o que sugere menor concentração de toxinas. Não foram

detectadas outras toxinas também investigadas pelo método descrito em 5.3.2.4, como: anatoxina-a, cilindrospermopsina, saxitoxinas.

5.4.2 Isolamentos de cepas e análise de toxinas

Todas estas amostras foram submetidas a cultivo e posterior isolamento, como descritos em 5.3.2.6 e 5.3.2.7. Após a observação em microscopia ótica para certificação do sucesso no isolamento e identificação dos gêneros e em alguns casos da espécie, foi promovido o aumento da biomassa de cada uma das novas cepas. Posteriormente, foram empregados dois métodos de extração de toxinas para análise em LC-MS Ion Trap, conforme itens 5.3.2.3 e 5.3.2.4 descritos anteriormente.

Os cromatogramas obtidos foram comparados com cromatogramas dos padrões e a presença dos principais íons gerados no espectro de massas. Portanto é possível afirmar que três novas cepas isoladas são produtoras de microcistinas. Conforme mostram as figuras números 18,19 e 20.

Figura 18: Cromatograma obtido por LC-MS para a cepa isolada LTPNA02. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520; pico 1), MC-YR (m/z 1045; pico 3) e MC-LR (m/z 995; pico 4) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Figura 19: Cromatograma obtido por LC-MS para a cepa isolada LTPNA08. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520; pico 1), MC-YR (m/z 1045; pico 3) e MC-LR (m/z 995; pico 4) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Figura 20: Cromatograma obtido por LC-MS para a cepa isolada LTPNA09. A presença dos picos característicos para MC-RR (m/z 520; pico 1), MC-YR (m/z 1045; pico 3) e MC-LR (m/z 995; pico 4) pode ser evidenciada. Análise realizada conforme descrito no item 5.3.2.3.

Para as outras cepas isoladas o resultado destas análises foi negativo.

As análises para detecção de outras cianotoxinas (anatoxina-a, cillindrospermopsina e saxitoxina) foram realizadas, conforme item descrito em 5.3.2.4 e todos os resultados foram negativos.

O resultado do emprego destas técnicas pode ser visto na tabela 2, a seguir:

Tabela 2. Resultado dos experimentos de isolamento e análise de toxina.

Cepa Isolada	Organismo	Técnica de Isolamento	Reservatório de origem	Toxina
LTPNA 01	<i>Microcystis sp</i>	Plaqueamento	Salto Grande	Não produtora*
LTPNA 02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Plaqueamento	Salto Grande	MC-RR, MC-YR, MC-LR, DesmMC-LR*, DesmMC-RR*, MC-LF* e MC-LW*
LTPNA 03	<i>Microcystis protocystis</i>	Plaqueamento	Salto Grande	Não produtora**
LTPNA 04	<i>Aphanocapsa sp</i>	Plaqueamento	Salto Grande	Não produtora**
LTPNA 05	<i>Microcystis sp</i>	Plaqueamento	Salto Grande	Não produtora**
LTPNA 06	<i>Pseudoanabaena sp</i>	Isolamento Mecânico	Taquacetuba	Não produtora**
LTPNA 07	<i>Pseudoanabaena sp</i>	Isolamento Mecânico	Taquacetuba	Não produtora**
LTPNA 08	<i>Microcystis sp</i>	Plaqueamento	Salto Grande	MC-RR, MC-YR, MC-LR, DesmMC-LR*, DesmMC-RR*, MC-LF* e MC-LW*
LTPNA 09	<i>Microcystis sp</i>	Plaqueamento	Salto Grande	MC-RR, MC-YR, MC-LR, DesmMC-LR*, DesmMC-RR*, MC-LF* e MC-LW*
LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>	Plaqueamento	Taquacetuba	Não produtora*

* Ver anexo III

** Não produtora de microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a e cilindrospermopsina

As variantes de microcistinas desmetiladas, aqui representadas por [Desm] MC-LR e [Desm] MC-RR foram identificadas a partir dos espectros de massa obtidos nas análises. Como esta análise baseia-se nas massas dos fragmentos gerados, não é possível identificar qual dos aminoácidos do peptídeo apresenta a desmetilação e portanto optou-se por essa representação genérica.

5.4.3 Análises das cepas mantidas em cultivo no laboratório

As cepas ITEP A1, ITEP 18, ITEP 24, ITEP 25, ITEP 26, ITEP 28, ITEP 30 e Jucazinho, gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Renato Molica, colaborador deste trabalho, estão em cultivo nas mesmas condições descritas em 5.3.2.9. Para cada uma delas foram realizados os procedimentos para aumento de biomassa para análises das toxinas produzidas. Nesta etapa três métodos diferentes foram utilizados. Todas as cepas foram submetidas aos métodos descritos em 5.3.2.3 e 5.3.2.4. Para as ITEPS 24, 25 e 26 além destes métodos anteriores, foram utilizados os métodos descritos em 5.3.2.5 e 5.3.2.5.1, baseando-se nos achados de Molica *et al.*, 2004 dessas cepas serem produtoras de anatoxina-a(S). Os resultados destes experimentos podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados da análise de inibição da acetilcolinesterase.

Cepa	Ensaio de Inibição da Acetilcolinesteras (%)
ITEP 24	78,35
ITEP 25	84,06
ITEP 26	79,18

Os cromatogramas resultantes das análises das cepas foram comparados com os cromatogramas dos padrões de microcistina e saxitoxina. Assim como a observação dos principais íons gerados no espectro de massas.

Figura 21. Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para o padrão de saxitoxina. Tempos de retenção: 5 minutos.

Figura 22. Espectro de massas do pico em 5 min, que corresponde a saxitoxina e é utilizado para confirmação nas amostras.

Figura 23: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Itep A1, utilizando o método descrito em 5.3.2.4. Identificação de saxitoxina (pico1).

Figura 24: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Itep 18, utilizando o método descrito em 5.3.2.4. Identificação de saxitoxina (pico1).

Figura 25: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Itep 28, utilizando o método descrito em 5.3.2.4. Identificação de saxitoxina (pico1).

Figura 26: Cromatograma obtido por LC-MSn IonTrap para a cepa Jucazinho.

Para todas as amostras foi realizado o método de extração descrito em 5.3.2.4.

Foi detectado a produção de saxitoxinas nas cepas ITEP A1, ITEP 18 e ITEP 28. Na cepa Jucazinho a intensidade do pico é muito inferior quando comparada aos outros resultados, o que sugere a menor produção de saxitoxina por esta cepa. A cepa ITEP 30 não demonstrou produzir toxinas.

O resultado destas análises pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Resultado dos experimentos de análise de toxinas.

Cepa	Organismo	Reservatório de origem	Toxina
ITEP A1	<i>Cylindrospermopsis sp</i>	Arcoverde - PE	Saxitoxina **
ITEP 18	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Tabocas – Caruaru - PE	Saxitoxina **
ITEP 24	<i>Anabaena oumiana</i> *	Tapacurá - PE	Anatoxina-a (S)
ITEP 25	<i>Anabaena oumiana</i> *	Tapacurá - PE	Anatoxina-a (S)
ITEP 26	<i>Anabaena oumiana</i> *	Tapacurá - PE	Anatoxina-a (S)
ITEP 28	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Lago ITEP	Saxitoxina **
ITEP 30	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Lago ITEP	-
JUCAZINHO	<i>Cylindrospermopsis sp</i>	Jucazinho - PE	Saxitoxina **

* *Anabaena spiroides* – reclassificada (WERNER & LAUGHINGHOUSE, 2009).

** Ver anexo III

As análises para as toxinas anatoxina-a, cillindrospermopsina e microcistinas apresentaram resultado negativo para todas as cepas analisadas e referidas na tabela 4.

5.5 DISCUSSÃO

O isolamento das cepas de cianobactérias presentes nas amostras ambientais positivas para toxinas, se mostrou satisfatório. Através do plaqueamento das amostras em agar 1% previamente lavado (FERRIS & HIRSCH, 1991) mesmo sem a adição de agentes inibidores do crescimento de bactérias contaminantes, como antibióticos, foi possível o isolamento completo de oito novas cepas. O isolamento através do método mecânico (URMENETA *et al.*, 2003) resultou no isolamento de somente duas novas cepas, porém as tentativas de isolamento foram dezenas, provando ser um método mais exaustivo e com menor probabilidade de sucesso.

A análise das toxinas por meio de extração em fase sólida e posterior análise em LC-MSn Ion Trap já foram bem exploradas na literatura tanto na análise de amostras da natureza como na caracterização das toxinas produzidas por cepas isoladas (HAWKING *et al.*, 2005; FRIAS *et al.*, 2006; HILLER *et al.*, 2007; VAN APELDOORN *et al.*, 2007). Para as amostras coletadas nos reservatórios citados, a utilização deste método propiciou a caracterização das principais toxinas presentes que foram determinantes para a escolha das técnicas de isolamento empregadas e o sucesso obtido destes procedimentos.

As cepas já existentes no laboratório e algumas delas referidas na literatura, como as lteps 24, 25 e 26 produtoras de anatoxina-a(s) (MOLICA *et al.*, 2005) provaram continuar produzindo a toxina pelos resultados das análises de inibição da acetilcolinesterase obtidos. Portanto os resultados foram concordantes com os descritos anteriormente. Outra cepa também referida na literatura, ltep 18 produtora de saxitoxina (GUGGER *et al.*, 2005; VAN APELDOORN *et al.*, 2007) foi submetida ao método de extração proposto por Hiller *et al.*, 2007. Os resultados de produção de saxitoxina por esta cepa demonstram concordância entre o referido na literatura e resultados obtidos neste estudo.

6. CAPÍTULO II – VARIAÇÃO NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE TOXINA EM UMA CEPA DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*.

6.1 Introdução

6.1.1 Fatores que influenciam a produção de cianotoxinas

Estudos feitos em laboratório demonstram que fatores ambientais podem influenciar tanto no crescimento quanto em alterações de toxicidade e também na concentração de cianotoxinas nas cepas isoladas e incubadas em condições específicas. Os fatores ambientais mais estudados na biossíntese da microcistina são temperatura, irradiância e concentração de nutrientes (SIVONEN, 1990; WIEDNER *et al.*, 2003; AME & WUNDERLIN, 2005; MARINHO & AZEVEDO, 2007). A maioria dos estudos indica que as cianobactérias produzem mais cianotoxinas quando estão sob condições mais favoráveis ao seu crescimento. Essas condições variam entre diferentes gêneros e espécies de cianobactérias.

Sivonen (SIVONEN, 1990) avaliou a influência de vários fatores ambientais no crescimento e produção de microcistinas por *Oscillatoria agardhii*. A autora correlacionou altas concentrações de toxinas com altas concentrações de nitrato e também a baixas intensidades luminosas. Ainda mostrou que a produção de toxinas depende da presença de fosfato em baixas concentrações, enquanto altas concentrações deste nutriente não demonstraram nenhum efeito sobre os parâmetros avaliados. Determinou que a temperatura ótima para o crescimento e produção de toxina pelo organismo avaliado é de 25°C. Porém, alguns estudos se mostram contraditórios. Ernst e colaboradores (ERNST *et al.*, 2005) afirmam que altas concentrações de nitrato e fosfato diminuem a velocidade de crescimento e o desenvolvimento de duas cepas de *Synechococcus* spp não formadoras de florações.

Um estudo avaliou os efeitos da radiação fotossintética ativa (RFA) na produção de microcistinas por cepas de *Microcystis* sp. Demonstrou que existe uma correlação positiva entre RFA e crescimento, bem como com a produção de toxinas. Este efeito é observado até que se alcança uma velocidade de

crescimento máxima, porém quando esta cepa é exposta a intensidades luminosas mais altas (> 400 moles de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a produção de microcistina é inibida (WIEDNER *et al.*, 2003).

Amé e Wunderlin (AME & WUNDERLIN, 2005) também avaliaram diferentes fatores que podem influenciar o crescimento e produção de toxinas em cepa de *Microcystis aeruginosa*. Em presença de altas concentrações de ferro ($10\mu\text{M}$) há o aumento da concentração de proteínas e também de toxinas. Neste estudo, observa-se que o aumento da temperatura não afetou significativamente a concentração de proteínas, nem de toxinas. Porém a 28°C houve alteração na razão da produção das duas variantes de microcistinas monitoradas (MC-LR e MC-RR). Este estudo ainda demonstrou que a concentração de nitrogênio em forma de amônia tem efeito negativo sobre a concentração de microcistina produzida. Sendo que a razão de microcistina por célula e de proteína por célula diminuíram cerca de três vezes quando a concentração de nitrogênio aumentou de 0 a $54\mu\text{M}$ (AME & WUNDERLIN, 2005). Estes dados corroboraram o estudo anterior realizado em 2003, que relacionou nove fatores ambientais que estariam envolvidos com o crescimento de cianobactérias e concentração de toxinas. A concentração de fósforo inorgânico foi relacionada ao desenvolvimento de florações, enquanto a presença de pequenas quantidades de carbonatos, bicarbonatos, sulfatos e baixa população de *Coliformes fecais* foram relacionadas à baixa taxa de crescimento de cianobactérias (AME *et al.*, 2003).

As taxas de crescimento máximas das cianobactérias são observadas a temperaturas próximas de 25°C (SIVONEN, 1990; CHORUS & BARTRAM, 2003). Estudos demonstraram que temperaturas mais altas ou mais baixas que essa proporciona uma diminuição na quantidade de toxina produzida pelas cepas. Entretanto, temperaturas diferentes podem ser observadas na ótima produção de diferentes variantes de microcistinas de uma mesma cepa (RAPALA *et al.*, 1997; AME & WUNDERLIN, 2005).

6.1.2 Nitrogênio e fósforo, os principais nutrientes das cianobactérias

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para o fitoplâncton e para as cianobactérias. Está presente nos ambientes aquáticos sob várias formas: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3) e íon amônio (NH_4^+), óxido nitroso (N_2O) e nitrogênio molecular. O nitrato e o íon amônio representam as principais fontes de nitrogênio para os produtores primários, entre eles, as cianobactérias (ESTEVES, 1998). Estas formas de nitrogênio também são referidas como nitrogênio inorgânico dissolvido (*DIN – dissolved inorganic nitrogen*) (REYNOLDS, 2006).

O fitoplâncton geralmente é capaz de ativar a entrada de *DIN* nas células, mesmo em concentrações baixíssimas, como 0,2 a 0,3 μM . Apesar do nitrato ser mais abundante do que os íons amônio nos corpos d'água, é provável que energeticamente seja a segunda escolha dos organismos fitoplanctônicos. A assimilação de nitratos e nitritos requer um gasto energético a mais para esses organismos, que precisam reduzir essas formas de *DIN* para a utilização do nitrogênio. Essa redução é feita pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, respectivamente. (REYNOLDS, 2006).

Uma vez dentro da célula, o nitrato é convertido a nitrito pela nitrato redutase (NR) no citosol e então a amônia pela nitrito redutase (NiR) nos cloroplastos. O nitrato regula a atividade da NR, que aumenta de acordo com a oferta de nitrato ao organismo, mas quando o nitrito formado pela NR é maior que o nitrito reduzido pela NiR, há o acúmulo de nitrito intracelular (CHEN *et al.*, 2009). O nitrogênio então assimilado tem importante participação na formação de aminoácidos e proteínas. Este elemento volta para o ambiente na forma de peptídeos e polipeptídeos, excretados pelos organismos que os assimilaram anteriormente (ESTEVES, 1998).

Existem ainda as formas orgânicas de nitrogênio dissolvido também podem ser chamadas de nitrogênio orgânico dissolvido (*DON – dissolved organic nitrogen*). Compreendem uréia e também aminoácidos livres, que podem ser uma segunda fonte de nitrogênio para as cianobactérias (REYNOLDS, 2006).

O fósforo também é um elemento de grande relevância para o fitoplâncton. É essencial na vida das cianobactérias, como um componente dos ácidos nucleicos, está envolvido diretamente na síntese de proteínas, nas reações da adenosina fosfato, que por sua vez impulsionam os transportes e metabolismo celular (REYNOLDS, 2006).

As formas biodisponíveis do fósforo para as cianobactérias ocorrem em combinação com o oxigênio nos íons do ácido ortofosfórico $OP(OH)_3$. As proporções entre os diferentes ânions (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$) variam com o pH do meio. A presença de alguns cátions, como cálcio, alumínio e ferro, podem alterar a disponibilidade do fósforo pela interferência na solubilidade ânions (REYNOLDS, 2006).

6.1.3 Concentração de nitrogênio e fósforo no crescimento e produção de microcistinas

Estudos demonstraram que a afinidade das cianobactérias pelos nitratos e fosfatos é maior que os outros organismos fotossintéticos. O que sugere uma competição por estes elementos com os outros organismos, principalmente quando fosfatos e nitratos estão em baixas concentrações, explicando desta maneira o grande sucesso ecológico das cianobactérias (CHORUS & BARTRAM, 2003).

Por outro lado, estudos sobre a proporção entre nitrogênio e fósforo no crescimento de cianobactérias mostram-se muito contraditórios. Determinou-se que a proporção ótima para a formação de florações destes organismos seria N:P = 10 a 16, ou seja, (10 a 16 átomos de N para cada átomo de P) (LEE *et al.*, 2000; CHORUS & BARTRAM, 2003). Entretanto, esta razão nem sempre foi confirmada em outros estudos. Vezie e colaboradores (2002), determinaram em seu estudo que N e P tem efeito significativo no crescimento das duas cepas de *Microcystis* sp avaliadas. Ainda nesse estudo, reportam que a concentração intracelular de microcistina foi maior nos meios que continham a relação desses elementos entre

237<N:P<753 (VEZIE *et al.*, 2002). Um estudo que avaliou o crescimento de uma cepa de *Microcystis* sp em três proporções de N:P (3, 10 e 15) não observou nenhuma diferença no crescimento exponencial, bem como na produção de biomassa (MARINHO & AZEVEDO, 2007).

Ao avaliar o comportamento de cepas produtoras e não produtoras de microcistinas foi observado que as cepas não produtoras se desenvolveram melhor no que diz respeito ao crescimento, em condições com menor concentração de nutrientes. Neste mesmo experimento também foi observado que o maior crescimento de cepas produtoras de microcistinas ocorreu nas condições com maiores concentrações de nitrato e fosfato (VEZIE *et al.*, 2002).

A escolha dos diferentes meios de cultivo utilizados nos experimentos de variação levou em consideração as concentrações de nitrato e fosfato, bem como a presença de micronutrientes e elementos traços diferentes, para tentativa de associação com o aumento ou não da produção de toxinas.

6.1.4 Por que as cianobactérias produzem microcistinas?

Muito foi discutido sobre qual o verdadeiro papel das microcistinas na vida das cianobactérias. As primeiras suposições da importância das microcistinas eram da microcistina fazer parte do sistema de defesa das cianobactérias a outros organismos no ambiente (CHORUS & BARTRAM, 1998), porém isso é contestável uma vez que o zooplankton não parece ser diretamente afetado pela presença delas.

Outros estudos observaram que as microcistinas estão associadas aos tilacóides das membranas da célula através do radical ADDA, permitindo que o anel polar da estrutura fique livre no citoplasma para, via C=O das ligações peptídicas, coordenar ou quelar com metais. Foi demonstrado que a microcistina-LR tem a habilidade de se ligar a metais como cobre e zinco e ainda por suas propriedades ionofóricas a outros elementos, como cálcio, magnésio, manganês e ferro. Propriedade essa também descrita a outros peptídeos cíclicos (ORR & JONES, 1998).

Esta associação das microcistinas aos tilacóides pode sugerir uma união da toxina com outros elementos diretamente regulados pela luz, como a clorofila, com a função de receber e de certa forma armazenar a energia luminosa (LYCK, 2004). Além disso, seria um mecanismo de resposta adaptativa (CAMPOS & VASCONCELOS, 2010). Essa hipótese seria uma explicação que corrobora estudos conduzidos em diferentes irradiâncias que observaram diferenças significativas na produção de toxina (WIEDNER *et al.*, 2003).

Por outro lado cepas não produtoras de microcistina estariam então em desvantagem. O que não é verdade, visto que em situações com fatores externos limitantes, como luz e nutrientes, há o favorecimento do desenvolvimento de cepas não tóxicas, pois suas estruturas intracelulares colaboram para a captação mais eficiente desses recursos em comparação com as cepas produtoras (VEZIE *et al.*, 2002).

Existe uma grande variedade de compostos produzidos pelas cianobactérias, muitos com estruturas químicas bastante similares, com funções

bioquímicas e fisiológicas também bastante semelhantes, como os pigmentos fotossintéticos. Além das cianopectolinas e aeruginosinas cuja biossíntese por complexos sistemas não ribossomais é idêntico ao das microcistinas.

É importante ressaltar que um dos métodos de detecção muito utilizado para as microcistinas é a cromatografia líquida acoplada a detectores de luz ultravioleta, cuja detecção justamente depende da presença do dieno conjugado presente no radical ADDA da molécula, sendo este imprescindível para o efeito tóxico da molécula. A hidrogenação desta parte da molécula a torna invisível por este método de detecção e também a perda de sua toxicidade (ORR & JONES, 1998). Similarmente, uma mudança na isomeria deste mesmo dieno (*E* para *Z*), sem nenhuma alteração na massa molecular, inverte a toxicidade da molécula (CHORUS & BARTRAM, 1998).

O que se sabe é que a função da microcistina para a cianobactéria é incerta. A plasticidade bioquímica desses organismos é muito grande. Portanto sem se conhecer com certeza o papel da microcistina para a célula, é prudente atribuir às microcistinas a mesma importância celular de outros compostos estruturalmente semelhantes nas cepas não produtoras e consideradas então não tóxica.

6.2 OBJETIVOS

- Avaliar a variação do crescimento celular de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 02) em diferentes meios de cultivo;
- Analisar a variação na produção de toxina da cepa de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 02) nos diferentes meios de cultivo;

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 MATERIAL

- *Para procedimentos de variação nas condições de cultivo:* filtros estéreis Millipore® de 22µm, bombas de ar, difusores de fluxo. Algodão e gaze. Erlenmeyers de diferentes capacidades (500mL, 1L). Reagentes para preparo dos meios de cultura. pHmetro modelo µPA-210 (Hipperquímica/Solumix®). Agitador magnético modelo Te-085 (Tecnal®). Bancada de fluxo laminar vertical modelo PCR2 (Pachane®). Incubadora – Câmara de Germinação, modelo TE-401 com controle de fotoperíodo COEL® (Tecnal®). Autoclave vertical, modelo 415 (Fanen®). Reagentes para preparo de soluções estoques.

- *Para contagem das cianobactérias:* câmara de Neubauer de 0,1mm profundidade e 0,0025mm² no menor retículo, espectrofotômetro Bio-Tek® (Instruments Inc.), Sistema Power Wave X 340 e software KC4 v.3.0 com Power Reports®, cubetas de quartzo com capacidade para 1mL. Microscópio Primo Star, modelo 415500-0011-00 (Zeiss®).

- *Quantificação de microcistinas:* Tubos de plástico com capacidade para 15 e 50mL da marca Biologix®, micro filtros, com diâmetro de 0,45µm, marca Millex®. Seringas de vidro com capacidade para 5mL, marca ArtiGlass®. Banho de Ultrassom. Probe Ultra Sônica – Virsônic Digital 550 – Ultrasonic Cell Disrupter® Modelo #274506. Centrífuga modelo 5804-R da marca Eppendorf®. Sistema HPLC Agilent® 1200, com bomba quaternária, degaseificador, autoinjeter e forno de colunas. Acoplado a espectrômetro de massas modelo Sciex da Applied

Biosystems® 3200 Q-Trap e fonte de electrospray Turbo -V. Software Analyst 1.4.2. Padrões analíticos de microcistinas (MC) – MC-LR; MC-RR e MC-YR Abraxis®.

6.3.2 MÉTODOS

6.3.2.1 Variação nas condições de cultivo

Uma cepa isolada nas etapas anteriores deste trabalho, produtora de microcistina foi investigada:

LTPNA 02 – *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistinas MC-LR, MC- YR, MC RR, Desm-MC-RR e Desm-MC-LR)

Primeiramente foram estabelecidas as fases de crescimento. Para a cepa de *Microcystis sp* foi realizada contagem das células por microscopia ótica em câmara de Neubauer (descrito em 6.3.2.6) e correspondência com absorvância em espectrofotômetro (descrito em 6.3.2.7) (VALER & GLOCK, 1999).

Parâmetros de Variações

Os experimentos foram realizados em triplicata, com aeração constante, em condições de incubação referentes à temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), luminosidade (1100 lux) e fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, tempo de incubação (21 dias) e tempo de avaliação (a cada 72h) idênticos.

Os procedimentos para a montagem dos experimentos foram realizados com materiais previamente esterilizados em autoclave (121°C por 20 min) e em ambiente estéril – fluxo laminar.

O meio ASM-1 (descrito em 5.3.2.10) foi utilizado com três diferentes proporções nas concentrações molares de nitrato e fosfato ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 1, 10$ e 20). Os outros meios de cultura utilizados para a investigação da variação da produção de toxina foram: MLA (descrito em 6.3.2.3), Bold 3N (descrito em 6.3.2.4) e BG11 (descrito em 6.3.2.5) em duas concentrações molares diferentes ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10$ e 100).

As tomadas de dados ocorreram em intervalos de 72 horas durante 21 dias. Uma alíquota de cada uma das triplicatas foi coletada e analisada para: contagem em câmara de Neubauer, tomada de dados espectrofotométricos e preparo da amostra para quantificação de toxina e quantificação desta por LC-MS Q trap.

6.3.2.2 Meio de cultura ASM - 1 (GORHAM et al., 1964)

Descrito em 5.3.2.10 em sua condição normal [$\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10$]. Este meio foi utilizado para o experimento de variação 1 (E1).

Para os experimentos realizados com este meio modificado, somente a solução estoque A foi alterada, conforme segue:

Para [$\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 1$] - **Solução estoque A** : NaNO_3 (0,17 g); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,41 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,49 g) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,29 g). Completado volume para 200ml com água Milli Q[®]. Solução preparada de acordo com 5.3.2.10. Este meio foi utilizado para o experimento de variação 2 (E2).

Para [$\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 20$] - **Solução estoque A** : NaNO_3 (3,4 g); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,41 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,49 g) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,29 g). Completado volume para 200ml com água Milli Q[®]. Solução preparada de acordo com 5.3.2.10. Este meio foi utilizado para o experimento de variação 3 (E3).

6.3.2.3 Meio de Cultura MLA (BOLCH & BLACKBURN, 1996)

Realizado em três etapas. A primeira é o preparo das soluções estoque.

Os reagentes devem foram pesados em balança analítica um a um em bequer com capacidade para 50 mL e completados para os respectivos volumes com água ultrapura – Milli Q® em balão volumétrico.

- **Soluções estoques:**

Solução estoque	Nutriente	Quantidade (g)	Volume final (mL)
1	Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	4,94	100
2	NaNO ₃	17	200
3	K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	4,38	500
4	H ₃ BO ₃	0,247	100

- **Solução vitamínica:** pesado 0,01 g de Biotina e completado volume para 100 mL com água ultrapura. Pesado 0,01 g de Vitamina B12 para 100 mL de água ultrapura. Pesado 0,01 g de Cloridrato de tiamina e adicionado 50 µL de cada uma das soluções anteriores. Completado volume para 100 mL.

- **Solução de micronutrientes:**

Solução estoque	Nutriente	Quantidade (g)	Volume final (mL)
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1	100
6	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	100
7	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,1	100
8	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,06	100

Para o preparo de 1 L desta solução, foram pesados os seguintes compostos: 4,36 g de Edta Na₂; 1,58 g de FeCl₃ . 6H₂O; 0,6 g de NaHCO₃; 0,36 g de MnCl₂ . 4H₂O; e adicionado 10 ml de cada uma das soluções estoque 5, 6, 7 e 8.

A segunda etapa é o preparo das soluções de trabalho.

Solução de trabalho 1: Em balão volumétrico de 500 mL, foram colocados 280 mL de água ultrapura, adicionados 20 mL da solução estoque 1, 40 mL da solução

estoque **2**, 100 mL da solução estoque **3**, 20 mL da solução estoque **4**, 20 mL da solução vitamínica e 20 mL da solução de micronutrientes.

Solução de trabalho 2: Pesados 8,4 g de NaHCO_3 e completados para 500 mL de água.

Solução de trabalho 3: Pesados 2,94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e completado volume para 100 mL.

Por último foi feita a esterilização das soluções de trabalho e o preparo final de meio MLA. Cada uma das soluções de trabalho e também um frasco SCHOTT® contendo 964 mL de água ultrapura foram autoclavados separadamente. Após o resfriamento das soluções de trabalho, foi realizado o procedimento final dentro do fluxo laminar vertical em total condições de assepsia. À água previamente autoclavada, foi adicionado 25 mL da Solução de trabalho **1**, 10 mL da solução de trabalho **2** e 1 mL da solução de trabalho **3**.

Este meio de cultura foi utilizado para o experimento 4 (E4) $\text{NO}_3:\text{PO}_4=10,41$.

6.3.2.4 Meio de cultura BOLD 3N (NICHOLS & BOLD, 1965)

Realizado em duas etapas. A primeira foi o preparo das soluções estoque.

Os reagentes foram pesados em balança analítica um a um em bequer com capacidade para 50 mL e completados os respectivos volumes com água ultrapura – Milli Q® em balão volumétrico.

Solução estoque	Nutriente	Quantidade (g)	Volume final (mL)
1	NaNO ₃	5	200
2	CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,5	200
3	Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	1,5	200
4	K ₂ HPO ₄	1,5	200
5	KH ₂ PO ₄	3,5	200
6	NaCl	0,5	200
7	CaCO ₃	0,1	200

Solução vitamínica:

Foram pesados 0,01 g de Biotina e completado o volume em balão analítico de 100 mL com água ultrapura. Pesados 0,01 g de Vitamina B12 para 100 mL de água ultrapura. Pesados 0,01 g de Cloridrato de tiamina e adicional 50 µL de cada uma das soluções anteriores. Completado o volume para 100 mL.

Solução de micronutrientes:

Foi preparar 1 L desta solução com 0,750 g de Edta Na₂ ; 0,097 g de FeCl₃ . 6H₂O; 0,041 g de ZnCl₂; 0,002g de CoCl₂ . 6H₂O e 0,004 g de Na₂MoO₄.2H₂O.

A segunda etapa foi o preparo do meio a partir das soluções estoque.

Em frasco SCHOTT contendo 940 mL de água ultrapura, foram adicionados:

30 mL solução estoque 1, 10 mL das soluções estoque 2, 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente. 1 mL da solução vitamínica e 1 mL da solução de micronutrientes.

O meio de cultura Bold 3N foi utilizado no experimento 5 (E5) NO₃:PO₄=16.

6.3.2.5 Meio de cultura BG11 (RIPPKA et al., 1979; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003)

Realizado em duas etapas. A primeira é o preparo das soluções estoque.

Os reagentes foram pesados em balança analítica um a um em bequer com capacidade para 50 mL e completados os respectivos volumes com água ultrapura – Milli Q[®] em balão volumétrico.

Solução estoque	Nutriente	Quantidade (g)	Volume final (mL)
1	NaNO ₃	15	1000
2	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,4	100
3	Mg SO ₄ · 7H ₂ O	0,75	100
4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,36	100
5	Ácido cítrico	0,12	200
6	Edta Na ₂	0,02	200
7	Na ₂ CO ₃	0,2	100
8	FeCl ₃ · 3H ₂ O	0,12	100

Solução de micronutrientes:

Para o preparo de 1 L de solução, as seguintes substâncias foram pesadas: 2,86g de MnCl₂ · 4H₂O; 0,222 g de ZnSO₄ · 7H₂O; 0,39 g de Na₂MoO₄ · 2H₂O; 0,079 g de CuSO₄ · 5H₂O e 0,0494 g de Co(NO₃)₂ · 6H₂O.

A segunda etapa consistiu no preparo do meio de cultivo:

Em frasco SCHOTT foi colocado 100mL da solução estoque 1; 10 mL das soluções estoque 2, 3, 4, 7 e 8 respectivamente. E 5 mL das soluções estoque 5 e 6 e adicionado 1 mL da solução de micronutrientes. O pH foi ajustado para 7,4 e autoclavado por 20 minutos a 121°C.

Este meio de cultura foi utilizado para o experimento 6 (E6) [NO₃:PO₄ = 100].

A concentrações de NaNO₃ foi alterada de acordo com a proporção [NO₃:PO₄] desejada, para a realização dos experimentos 7 (E7) [NO₃:PO₄=10]. Neste experimento, a solução final foi preparada a partir de 10 ml da solução estoque 1, totalizando 0,15g de NaNO₃ por litro de meio de cultivo.

6.3.2.6 Contagem de cianobactérias em câmara de Neubauer

A lamínula foi fixada sobre a área demarcada da câmara. A suspensão celular foi homogeneizada e diluída quando necessário. Uma alíquota de 50µL foi transferida para os campos da câmara. Após as células sedimentarem por 2 minutos a câmara foi focalizada nas áreas demarcadas e a contagem realizada em aumento de 400x. Os cálculos de nº de células.mL⁻¹ foram realizados conforme esquema que segue.

$$\text{nº de céls/mL} = \frac{\text{nº total de células}}{\text{nº de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

6.3.2.7 Determinação espectrofotométrica (VALER & GLOCK, 1999)

Exato 1 mL das culturas analisadas foram colocadas em cubetas de quartzo e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro. Nos comprimentos de onda de 680nm e 750nm as absorvâncias foram medidas, usando-se como branco o meio de cultura.

6.3.2.8 Preparo das amostras para análise de toxina

Em tubo falcon, cerca de 5 ml da cultura foram submetidos a probe ultrasônica por 1 minuto, para o rompimento das células. O material foi centrifugado a 3.214 g por 10 minutos a 4°C. 5 mL do sobrenadante foram filtrados em microfiltros (Millipore®). As amostras foram identificadas e guardadas sob refrigeração a -20°C até momento da análise por LC-MS Q trap.

6.3.2.9 Quantificação de microcistinas por LC-MS Q trap

As análises foram realizadas em sistema HPLC Agilent® 1200 acoplado com espectrômetro de massas 3200 Q-Trap Sciex Applied Biosystems®.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Phenomenex Synergi MAX-RP (150 x 2.0 mm, 4 μ m) utilizando-se como fase móvel (A) água, ácido fórmico 0,1% e de 5mM de formiato de amônio e (B) Acetonitrila e ácido fórmico 0,1%, sob uma vazão de 300 μ L/min. O gradiente empregado foi: 0 min, 65%A e 35%B; 3 min, 10%A e 90%B; 5 min, 65%A e 35%B. Temperatura da Fonte ESI: 650 °C, em modo positivo. Os demais parâmetros de fonte foram: CUR (*Curtain Gas Interface*) 10; IS (*Ion Spray Voltage*) 5500; GS1 (*Gas 1*) 60; GS2 (*Gas 2*) 50 e CAD (*Collision Gas*) médio. A detecção foi realizada por meio de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), monitorando-se os seguintes íons: 519,8 (MC-RR), 995,6 (MC-LR) e 1045,5 (MC-YR). Demais parâmetros de monitoramento de íons podem ser vistos na tabela abaixo.

Tabela 5: Parâmetros de monitoramento de íons por detecção MRM.

Composto	Q1 <i>m/z</i>	Q3 <i>m/z</i>	Dwell (ms)	DP	EP	CEP	CE	CXP
MC-YR	1045,5	135,1	150	100	10,5	35	95	4
MC-LR	995,6	135,1	150	100	9,5	60	95	2
MC-RR	519,8	135,1	150	50	4,5	20	45	2

Q1 e Q3 – Qudrupolos; Dwell – tempo de parada; DP – Declustering Potential; EP – Entrance Potential; CEP – Colision Cell Entrance Potential; CE – Colision Energy; CXP – Colision Cell Exit Potential.

6.3.3 Cálculos

6.3.3.1 Cálculo da velocidade de crescimento (μ)

A comparação entre os diferentes crescimentos da cepa LTPNA 02 observados pode são apresentadas de duas maneiras: (i) pela comparação entre as taxas de crescimento das fases logarítmica de crescimento e estacionária e (ii) visualmente pela construção de gráficos que comparem os experimentos.

Os tempos amostrais para contagem de células foram os mesmos dos parâmetros de avaliação (a cada 72h).

A determinação do crescimento celular foi realizada aplicando-se uma função exponencial aos valores do número de células pelo tempo de acordo com a fórmula: (REYNOLDS, 2006)

$$N_t = N_0 \cdot e^{rn \cdot t}$$

Onde N_t corresponde ao número de células no final e N_0 ao número de células no início do intervalo de tempo avaliado e t é o intervalo de tempo, RN representa a velocidade instantânea ou intrínseca de crescimento.

$$rn = \mu - m$$

Onde μ é a velocidade de crescimento específico e m a taxa de mortalidade da população.

Como nas culturas de microalgas a determinação da mortalidade é nula ou difícil de ser estimada, a taxa de crescimento instantânea (rn), passa a ser nominalmente igual à velocidade de crescimento específico (μ) que pode ser calculada pela expressão:

$$\mu = \frac{\ln(N_t / N_0)}{\Delta t}$$

Esta fórmula se baseia no princípio que em um cultivo de microalgas o padrão de reprodução predominante é vegetativa. A divisão da célula mãe em duas células filhas representa o aumento do número de indivíduos presentes. Assim, as expressões de crescimento dos cultivos tendem a ser representadas com base no número de duplicações das células por unidade de tempo (LOURENÇO, 2007).

As taxas de crescimentos são apresentadas como crescimento total e crescimento exponencial. O crescimento total é a taxa encontrada pela regressão da função exponencial de todos os dados do experimento. O crescimento exponencial é a taxa encontrada pela regressão da função exponencial dos dados com aderência de pelo menos 95% ($R^2 \geq 0,95$) e é neste período que é determinado o dia em que cessou a fase logarítmica de crescimento do organismo analisado (WIDDEL, 2007).

As curvas de crescimento são apresentadas como classicamente é descrito para o crescimento microbiano (log número de células x tempo) .

6.3.3.2 Cálculo das taxas de produção celular de toxina

Para a produção celular de toxinas, foi calculado um quociente de produção (Q_{MC}), que consiste na divisão da concentração das toxinas (ng/mL) pelo número de células.mL⁻¹, gerando um resultado em fg de toxina/célula.

6.3.3.3 Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica (versão 8.0 Stat Soft Inc, Tulsa, USA). As variáveis foram tratadas como independentes. Foram testadas a normalidade através do teste W de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância com o teste de Brown-Forsythe. De acordo com os resultados desses testes, utilizou-se o teste de *one-way* ANOVA, seguido de Tukey. Quando as variáveis não apresentaram distribuição normal, porém apresentaram homogeneidade de variância, optou-se por utilizar o teste paramétrico one-way Anova, considerando seu poder estatístico maior.

Com relação à velocidade de crescimento foram considerados valores da média das triplicatas durante a fase logarítmica de crescimento e também crescimento total de cada grupo (E1 a E7). O grupo E1 foi considerado o grupo controle.

Para a análise estatística das taxas de produção de toxina por célula foram considerados os resultados das triplicatas de cada grupo individual de toxina Q_{MC-LR} , Q_{MC-RR} , Q_{MC-YR} e também a somatória $Q_{MC-Total}$. Os dados de cada um desses grupos foram analisados para cada dia de amostragem (dias 0; 3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21).

O nível de significância de 5% foi adotado como padrão. Quando esse nível apresentou-se entre 6-10% os resultados foram considerados marginalmente significativos.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Determinação da curva de crescimento

Os experimentos de variação nas condições de cultivo iniciaram-se pela determinação da curva de crescimento da cepa **LTPNA 02** de *Microcystis aeruginosa*, produtora das microcistinas MC-RR, MC-LR, MC-YR, [Desm] MC-RR e [Desm] MC-LR, a fim de se determinar as fases de crescimento.

Para isso foi montada uma cultura em erlenmeyer de 2 L, cuja concentração inicial de células era de $1,8 \times 10^5$ células/ml. As condições de cultivo foram: meio ASM-1, cultura mantida em incubadora a 25°C ($\pm 0,5$), fotoperíodo de 12 h luz, 12 h escuro, com irradiância de 1000 (± 100) lux e aeração constante.

Para acompanhar o crescimento da cepa dois métodos diferentes foram empregados, conforme sugerido por Valer e Glock, 1999 (VALER & GLOCK, 1999). Espectrofotometria para dados relativos à clorofila presente e contagem em câmara de Neubauer para posterior correlação de clorofila e número de células. Os dados espectrofotométricos foram tomados após a determinação do melhor comprimento de onda que refletiu a maior absorvância da clorofila. Diferentes diluições foram realizadas na cultura e através do método de varredura, inicialmente foi tomada a distribuição espectral da absorvância da cepa, nas concentrações diferentes, num intervalo de 500 a 800 nm, a fim de verificar os picos de absorção. O comprimento de onda que expressou a maior absorvância foi 680 nm. Este comprimento de onda foi utilizado para todas as etapas seguintes, bem como o comprimento de onda sugerido na literatura (750 nm). O método utilizado para realização dessas leituras está no item 6.3.2.7.

O segundo método é o de contagem do número de células por câmara de Neubauer e através de microscopia ótica como descrito em 6.3.2.6.

As alíquotas e análises para realização da curva de crescimento foram tomadas em intervalos máximos de 48h.

Os resultados obtidos podem ser visualizados através dos gráficos a seguir:

Figura 27: Crescimento em número de células por mL da cepa LTPNA02.

Figura 28. Crescimento da cepa LTPNA 02 por absorbância em 680 e 750 nm.

Pela análise dos gráficos pode-se identificar a fase de crescimento exponencial e estacionária. Este experimento serviu para estabelecer a concentração celular inicial de cada experimento, como 5×10^5 cél/mL. A concentração inicial da fase de crescimento exponencial será usada como partida para os outros experimentos.

A partir dos resultados obtidos pode-se comprovar a correlação entre os dois métodos. A figura 29 mostra a proporcionalidade entre os métodos escolhidos para avaliar o crescimento da cepa LTPNA 02. Tanto a contagem do número de células por mL, quanto as leituras das absorvâncias demonstram proporcionalidade, como mostra a razão de Pearson. Para 680nm, $r=0,99$ e para 750nm $r=0,98$.

Figura 29. Comparação entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento.

6.4.2 Experimentos de variação

Todos os experimentos foram processados conforme itens descritos em 6.3.2.

Primeiramente foi realizada a comparação da composição dos meios de cultura empregados como pode ser observado nas tabelas a seguir:

Tabela 6: Proporção nitrato e fosfato nos meios de cultura utilizados.

	ASM-1 (10)*	ASM-1 (20)	ASM-1 (1)	Bold3N*	MLA*	BG11*	BG11 (10)
[NO ₃ :PO ₄]	10	20	1	16,6	10,41	100,5	10,05

* Meios de cultura não modificados dos originais referidos na literatura.

Tabela 7: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e respectiva concentração por litro de solução.

Composição	ASM-1*	ASM-1 (20)	ASM-1 (1)	Bold 3N*	MLA*	BG11*	BG11(10)
NaNO ₃	0,17 g	0,34 g	0,017 g	0,75 g	0,17 g	1,5 g	0,15 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,041 g	0,041 g	0,041 g	-	-	-	-
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,049 g	0,049 g	0,049 g	0,075 g	0,0494 g	0,075 g	0,075 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,029 g	0,029 g	0,029 g	0,025 g	0,0294 g	0,036 g	0,036 g
KH ₂ PO ₄	0,0136 g	0,0136 g	0,0136 g	0,175 g	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	0,0268 g	0,0268 g	0,0268 g	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	2,48 mg	2,48 mg	2,48 mg	-	0,0123 g	2,86 mg	2,86 mg
K ₂ HPO ₄	-	-	-	0,075 g	-	-	-
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	-	-	-	-	0,0438 g	0,04 g	0,04 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,39 mg	1,39 mg	1,39 mg	0,041 mg	0,36 mg	1,81 mg	1,81 mg
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	1,08 mg	1,08 mg	1,08 mg	0,097 mg	1,58 mg	0,006 g	0,006 g
Zn Cl ₂	3,35 mg	3,35 mg	3,35 mg	0,005 mg	-	-	-
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,19 mg	0,19 mg	0,19 mg	0,002 mg	0,01 mg	-	-
CuCl ₂	1,4 µg	1,4 µg	1,4 µg	-	-	-	-
Edta Na ₂	7,44 mg	7,44 mg	7,44 mg	0,75 mg	4,36 mg	1 mg	1 mg
NaCl	-	-	-	0,025 g	-	-	-
CaCO ₃	-	-	-	0,005 g	-	-	-
Biotina**	-	-	-	0,05 µg	1 µg	-	-
Cobalamina **	-	-	-	0,05 µg	1 µg	-	-
Clorid. de Tiamina**	-	-	-	0,1 mg	2 mg	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	-	0,004 mg	6 µg	0,39 mg	0,39 mg
NaHCO ₃	-	-	-	-	169,6 mg	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-	-	0,01 mg	0,079 mg	0,079 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	22 µg	0,222 mg	0,222 mg
Ácido cítrico	-	-	-	-	-	0,006 g	0,006 g
Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	0,02 g	0,02 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	-	0,0494 mg	0,0494 mg

* Meios de cultura não modificados dos originais referidos na literatura.

** Biotina – C₁₀H₁₆N₂O₃S; Cobalamina – C₆₃H₈₈N₁₄O₁₄P; **Tiamina – C₁₂H₁₇CIN₄OS.HCl; **Ácido cítrico – C₆H₈O₇.

Tabela 8: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e a concentração em Mol/L.

Composição	ASM-1(10)*	ASM-1 (20)	ASM-1 (1)	Bold 3N*	MLA*	BG11*	BG11(10)
NaNO ₃	2 mM	4 mM	0,2 mM	8,8 mM	2 mM	17,6 mM	1,76 mM
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	-	-	-	-
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,199 mM	0,199 mM	0,199 mM	0,3 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,3 mM
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,1975 mM	0,1975 mM	0,1975 mM	0,17 mM	0,2 mM	0,245 mM	0,245 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	0,43 mM	-	-	-
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	-	-	-	-	0,192 mM	0,175 mM	0,175 mM
H ₃ BO ₃	40 µM	40 µM	40 µM	-	0,199 mM	46 µM	46 µM
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	7 µM	7 µM	7 µM	0,2 µM	1,8 µM	9,1 µM	9,1 µM
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	3,9 µM	3,9 µM	3,9 µM	0,3 µM	5,8 µM	22,1 µM	22,1 µM
Zn Cl ₂	24,6 µM	24,6 µM	24,6 µM	0,03 µM	-	-	-
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,7 µM	0,7 µM	0,7 µM	0,008 µM	0,042 µM	-	-
CuCl ₂	0,0104 µM	0,0104 µM	0,0104 µM	-	-	-	-
Edta Na ₂	19,9 µM	19,9 µM	19,9 µM	0,02 mM	11 µM	2,6 µM	2,6 µM
NaCl	-	-	-	0,427 mM	-	-	-
CaCO ₃	-	-	-	0,05 mM	-	-	-
Biotina**	-	-	-	0,002 µM	0,004 µM	-	-
Cobalamina**	-	-	-	3,6 x 10 ⁻⁵ µM	7,4 x 10 ⁻⁴ µM	-	-
Clorid. de Tiamina**	-	-	-	0,2 µM	6 µM	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	-	0,01 µM	0,0247 µM	1,6 µM	1,6 µM
NaHCO ₃	-	-	-	-	2,01 mM	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-	-	0,04 µM	0,3 µM	0,3 µM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	7,66x10 ⁻³ µM	0,7 µM	0,7 µM
Ácido cítrico**	-	-	-	-	-	0,03 mM	0,03 mM
Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	0,188 mM	0,188 mM
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	-	0,1 µM	0,1 µM

* Meios de cultura não modificados dos originais referidos na literatura.

** Biotina – C₁₀H₁₆N₂O₃S; Cobalamina – C₆₃H₈₈N₁₄O₁₄P; **Tiamina – C₁₂H₁₇ClN₄OS.HCl; **Ácido cítrico – C₆H₈O₇.

6.4.2.1 Experimento 1 – controle (E1)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 não sofreu nenhuma variação nas suas condições de cultivo. O inóculo permaneceu uma semana em meio ASM-1 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomadas de dados em intervalos de 72h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=10. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 30: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 31: Crescimento da cepa em em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=10 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 32: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento. (680nm e 750nm $r=0.996$).

Figura 33: Quantificação das microcistinas em meio ASM-1 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=10$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=3).

Figura 34: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio ASM-1 $[NO_3:PO_4]=10$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

O crescimento da cepa nas condições impostas neste experimento teve sua fase logarítmica nos quinze primeiros dias. O que pode ser observado na contagem do número de células. Pelas leituras das absorvâncias, pode-se também observar o crescimento da cepa. Os dois métodos são proporcionais e demonstram grande correlação ($r= 0,996$), como pode ser observado na figura 32.

A concentração de toxina oscilou durante o experimento, tendo sua máxima concentração entre os dias 9 a 15. A produção celular (Q_{MC}) observada na figura 34, quando se divide a concentração das toxinas pelo número de células demonstra um aumento gradual da produção durante os nove primeiros dias. Há um pequeno decréscimo nos dias 12 e 15. Durante a fase estacionária, que se inicia a partir do dia 15 é possível observar um decréscimo significativo na produção.

Este experimento é considerado o experimento controle.

6.4.2.2 Experimento 2 (E2)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 sofreu variação na relação das concentrações de nitrato e fosfato no meio ASM-1. O inóculo permaneceu uma semana em meio ASM-1 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomadas de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=1$. O experimento foi iniciado com 5×10^5 células/mL.

Figura 35: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=1$. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 36: Crescimento da cepa em meio ASM-1 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=1$ em valores de absorvância. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 37: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento. (680 nm $r=0,94$ e 750 nm $r=0,92$).

Figura 38: Quantificação das microcistinas em meio ASM-1 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=1$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 39: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio ASM-1 $[NO_3:PO_4]=1$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Neste experimento pode-se observar uma considerável diminuição no número de células. Tanto a contagem do número de células quanto as leituras das absorvâncias observou os mesmos resultados e continuaram demonstrando correlação em 680 nm ($r=0,94$) e em 750 nm ($r=0,92$), conforme figura 37. O crescimento durante a fase logarítmica, que foi observada nos 6 primeiros dias, foi significativamente menor que o controle ($p<0,02$).

Durante a fase exponencial de crescimento, a produção de toxina por célula foi mais baixa até o sexto dia, quando se manteve nas suas maiores concentrações até 12º dia. A partir do dia 15 a concentração de microcistinas decaiu e manteve-se constante até o último dia do experimento.

A quantificação das microcistinas, como era de se esperar visto o crescimento prejudicado, apresentou concentrações mais baixas para todas as variantes analisadas, como mostra a figura 38.

6.4.2.3 Experimento 3 (E3)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 sofreu variação na relação das concentrações de nitrato e fosfato no meio ASM-1. O inóculo permaneceu uma semana em meio ASM-1 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=20. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 40: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=20. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 41: Crescimento da cepa em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=20 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 42: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento. (680nm e 750nm $r=0,98$).

Figura 43: Quantificação das microcistinas em meio ASM-1 $[NO_3:PO_4]=20$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 44: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio ASM-1 $[NO_3:PO_4]=20$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Nas condições impostas neste experimento, com maiores concentrações de nitrato, o desenvolvimento da cepa mostrou-se favorecido. A proporcionalidade entre os métodos utilizados para acompanhar o crescimento da cepa células/mL e absorvâncias em 680 nm e 750 nm também pode ser observada (680 nm $r=0,979$ e 750 nm $r=0,977$), conforme figura 42.

A fase logarítmica de crescimento foi a mais longa e todos os experimentos, sendo observada até o 18º dia. A concentração de toxinas aumentou com o tempo, sendo gradual até o 18º dia, quando começou a decair conforme figura 43.

É possível observar na figura 44, que a produção de toxinas por células demonstrou um aumento também gradual, até o 9º dia. Depois disso decaiu no 12º e 15º dias, voltando a aumentar no 18º. Neste período demonstrou a maior produção de toxina por célula.

6.4.2.4 Experimento 4 (E4)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada no meio MLA. O inóculo permaneceu uma semana em meio MLA nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=10,4$. O experimento foi iniciado com 5×10^5 células/mL.

Figura 45: Crescimento da cepa em células/mL em meio MLA $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=10,4$. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 46: Crescimento da cepa em meio MLA $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=10,4$ em valores de absorvância. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 47: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680nm e 750nm $r=0,99$).

Figura 48: Quantificação das microcistinas em meio MLA $[NO_3:PO_4]=10,4$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 49: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio MLA $[NO_3:PO_4]=10,4$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Neste experimento, a proporção de nitrato e fosfato é a próxima ao experimento controle ($NO_3/PO_4=10$). Os métodos utilizados para determinar o crescimento continuaram a demonstrar proporcionalidade (680 nm $r=0,994$ e 750 nm $r=0,987$), conforme figura 47.

A quantificação das toxinas foi crescente durante todo o experimento, decaindo somente no último dia do experimento, como mostra figura 48. Isso não é observado na produção celular (Q_{MC}). Na primeira amostragem, a concentração de microcistina intracelular é muito superior aos outros dias, o que pode refletir a condição do inóculo. A concentração de microcistinas cai drasticamente nos 3 primeiros dias de experimento e volta a aumentar até o 9º dia, gradualmente. Mantendo-se constante até o final do experimento como visto na figura 49.

6.4.2.5 Experimento 5 (E5)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada no meio Bold 3N. O inóculo permaneceu uma semana em meio Bold 3N nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=16,6$. O experimento foi iniciado com 5×10^5 células/mL.

Figura 50: Crescimento da cepa em células/mL em meio Bold 3N $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=16,6$. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 51: Crescimento da cepa em valores de absorvância em meio Bold 3N $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=16,6$. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 52: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680nm e 750nm $r=0,97$).

Figura 53: Quantificação das microcistinas em meio Bold 3N $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=16,6$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 54: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio Bold 3N $[NO_3:PO_4]=16,6$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Apesar da proporção dos nutrientes avaliados ($NO_3:PO_4=16,6$) não ter sido drasticamente modificada, este experimento demonstrou crescimento significativamente menor ($p<0,0002$) que o controle. A fase logarítmica de crescimento foi observada durante os 9 primeiros dias.

A proporcionalidade entre os métodos para determinação do crescimento se manteve (680 nm $r=0,972$ e 750 nm $r=0,973$), conforme figura 52.

Já a quantificação das microcistinas foi surpreendente. As concentrações das variantes MC-LR e MC-YR estiveram abaixo do limite de quantificação. A variante MC-RR apresentou as menores concentrações dentre todos os experimentos conforme figura 53.

O mesmo se observou quando calculado a produção celular (Q_{MC}). Sugerindo a presença de algum fator estressante para o crescimento e também produção de toxinas.

6.4.2.6 Experimento 6 (E6)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada no meio BG-11 (+). O inóculo permaneceu uma semana em meio BG-11 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100,5$. O experimento foi iniciado com 5×10^5 células/mL.

Figura 55: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG 11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 56: Crescimento da cepa em meio BG 11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$, em valores de absorvância. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 57: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680 nm e 750 nm $r=0,93$).

Figura 58: Quantificação das microcistinas em meio BG 11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 59: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio BG 11 $[NO_3:PO_4]=100$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Este experimento foi realizado com a proporção de nutrientes dez vezes a concentração do experimento controle ($NO_3:PO_4=100$).

A fase logarítmica foi observada nos 9 primeiros dias de experimento. O total número de células durante o crescimento não foi expressivo, sendo significativamente menor que o controle ($p<0,05$). Ainda assim, a proporcionalidade entre os métodos de determinação de crescimento foi mantida (680 nm $r=0,932$ e 750 nm $r=0,935$), conforme figura 57.

Apesar do crescimento ter sido menor, o mesmo não ocorreu na quantificação das microcistinas, que demonstrou uma produção crescente após o 3º dia até o último dia do experimento, visto na figura 58.

Já a determinação da produção de toxina por célula (Q_{MC}), foi surpreendente, alcançando as maiores concentrações dentre todos os experimentos. Isso pode sugerir um fator que ao mesmo tempo diminua a divisão celular e aumente consideravelmente a produção de toxina.

Também se observa que a primeira amostragem se comporta como o experimento 4 – E4 (MLA), possivelmente refletindo as condições celulares do inóculo. A produção de toxina cai drasticamente durante o primeiro intervalo de 3 dias, voltando a aumentar gradualmente durante todo o experimento.

6.4.2.7 Experimento 7 (E7)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada no meio BG11 (-). O inóculo permaneceu uma semana em meio BG11 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=10. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 60: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG 11 [NO₃:PO₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 61: Crescimento da cepa em meio BG 11 [NO₃:PO₄]=10 em valores de absorvância. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 62: Proporcionalidade entre os métodos utilizados para avaliar o crescimento (680 nm $r=0,97$ e 750 nm $r=0,95$).

Figura 63: Quantificação das microcistinas em meio BG 11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=10$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 64: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio BG 11 $[NO_3:PO_4]=10$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Este experimento foi realizado com a mesma proporção de nutrientes que o experimento controle ($NO_3/PO_4=10$). A fase logarítmica de crescimento foi observada durante os 9 primeiros dias. Os métodos utilizados na determinação do crescimento se mantiveram proporcionais (680 nm $r=0,968$ e 750 nm $r=0,951$), conforme figura 62.

A concentração das microcistinas foi crescente durante todo o intervalo de tempo analisado.

A produção de toxina por célula (Q_{MC}) mostrou similaridade ao E4 (MLA) e E6 (BG-11) no tempo 0, este dado pode ser reflexo do estado celular do inóculo. Ainda se observa a drástica queda na produção de toxinas por células no primeiro intervalo de 72h. Após o 3º dia não há variação significativa na produção de microcistinas por célula, sendo que os valores permanecem próximos e constantes até o 21º dia, como pode ser visto na figura 64.

6.4.3 Comparação entre os experimentos

6.4.3.1 Crescimento

O crescimento foi determinado a partir da contagem do número de células e calculado de duas maneiras, como descrito em 6.3.2.6. Tanto o crescimento na fase exponencial, quanto na fase estacionária foram avaliados.

É possível observar na tabela 9, os valores calculados para cada uma das fases de crescimento, representados pela média das triplicatas de cada experimento.

Tabela 9: Comparação das taxas de crescimento entre os experimentos.

Experimentos	Dias crescimento exponencial	Crescimento Exponencial	Crescimento Total
E1	15	0,2126	0,1661
E2	6	0,1599	0,0425
E3	18	0,2030	0,1731
E4	12	0,2474	0,1588
E5	9	0,1882	0,0979
E6	9	0,1659	0,0682
E7	9	0,3065	0,1484

De acordo com os testes realizados, os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, portanto, utilizou-se a análise de variância (ANOVA one way), seguida de Tukey, para comparação dos resultados. E as diferenças estatísticas são vistas na tabela 10.

Tabela 10: Valores indicativos de diferença estatística (p) na comparação dos grupos (E2 – E7) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem, relativo ao crescimento exponencial e total.

Grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem		
Grupos	Crescimento Exponencial	Crescimento Total
E2	0,0214*	0,0002*
E3	0,9895	0,6371
E4	0,2102	0,5854
E5	0,5675	0,0002*
E6	0,0476*	0,0002*
E7	0,0002†	0,0103*

*Os valores de p são significativamente menores quando comparados com E1

† Os valores de p são significativamente maiores quando comparados com E1

A análise estatística dos dados demonstra que os crescimentos exponenciais dos experimentos E2 e E6 foram significativamente menores, quando comparados ao experimento controle, E1. O experimento E7 teve o crescimento exponencial significativamente maior que E1.

Em relação ao crescimento total, é possível observar que ao final de 21 dias de experimento, os experimentos E2, E5, E6 e E7 foram todos significativamente menores que E1.

O crescimento ainda pode ser observado nos gráficos da figura 65, a seguir, que mostram o crescimento da cepa nos diferentes experimentos, durante todo o tempo avaliado. É possível notar uma estreita similaridade entre os experimentos E1, E3, E4 e E7 durante as fases estacionárias de crescimento, onde formam um grupo homogêneo. Já o experimento 5, durante a fase estacionária não atingiu as concentrações celulares dos outros experimentos. O E2 e E6 foram os experimentos que menos se desenvolveram durante as fases logarítmicas e estacionárias.

Figura 65: Comparação do crescimento em células/mL entre os experimentos E1-E7.

A figura 66 mostra a comparação entre os experimentos conduzidos em ASM-1. E1 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$]; E2 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=1$] e E3 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=20$]. Fica evidente a similaridade entre os experimentos E1 e E3, também confirmada pelo cálculo das velocidades de crescimento exponencial e total que não demonstraram diferenças estatisticamente significativas. O experimento E2 foi significativamente menor que E1 ($p < 0,02$) durante o crescimento exponencial e marginalmente menor que E3 ($p < 0,07$). Durante o crescimento total calculado, E2 demonstrou valor estatisticamente menor que E1 e E3 ($p < 0,0002$). Esses dados estatísticos podem ser conferidos no Anexo II.

Figura 66: Comparação do crescimento em células/mL entre os experimentos conduzidos em ASM-1, em diferentes proporções de [$\text{NO}_3:\text{PO}_4$]. (E1=10; E2=1; E3=20)

Quando comparados os experimentos realizados em diferentes meios de cultura, porém com a mesma proporção de nutrientes avaliados [$\text{NO}_3\text{:PO}_4=10$]; E1, E4 e E7 demonstram comportamento semelhante, no que diz respeito ao crescimento, com as maiores concentrações celulares. Entre E1 (ASM-1) e E4 (MLA) não houve diferença estatística para os crescimentos exponencial e total. Por outro lado o experimento E7 (BG-11) teve o crescimento exponencial estatisticamente maior que E1 ($p<0,0002$) e E4 (0,009). Porém quando comparados os crescimentos totais, foi bastante semelhante, não havendo diferença com o E4, mas menor que E1 ($p<0,01$). Essa comparação pode ser vista na figura 67 e os dados estatísticos no anexo II.

Figura 67: Comparação do crescimento em células/mL entre os experimentos conduzidos na mesma proporção de [$\text{NO}_3\text{:PO}_4 = 10$]. (E1 em ASM-1, E4 em MLA e E7 em BG-11)

6.4.3.2 Produção de microcistinas por célula

Para possibilitar a comparação entre os experimentos, foi determinada a produção celular de microcistinas (Q_{MC}), como descrito em 6.3.3.2. Foi realizada a análise estatística para todas as variantes de microcistinas quantificadas (MC-RR, MC-LR e MC-YR), como pode ser visto na tabela 11 e no anexo II.

Figura 68: Comparação da produção de microcistinas intracelular entre os experimentos E1 ($NO_3:PO_4 = 10$), E2 ($NO_3:PO_4 = 1$) e E3 ($NO_3:PO_4 = 20$), em meio ASM-1. Erros padrões podem ser observados ($n=3$). (* $p<0,05$).

A figura 68 mostra a comparação da produção intracelular de microcistinas totais nos experimentos realizados em ASM-1. E1 [$NO_3:PO_4=10$]; E2 [$NO_3:PO_4=1$] e E3 [$NO_3:PO_4=20$]. Não existe diferença estatística na produção de toxinas, nos dias 0, 9, 12, e 15. Nos dias 3 e 6, a Q_{MC} Total de E2 e E3 é significativamente menor que E1. Nos dias finais do experimento, 18 e 21, E2 não é diferente do controle, enquanto E3 é significativamente maior que E1 ($p<0,004$) e E2 ($p<0,015$).

Apesar de E1 e E3 terem sido bastante semelhantes entre si, no crescimento e produção de toxinas por células, a falta de nitrogênio afetou significativamente o desenvolvimento da cepa, como é observado em E2. Tanto o crescimento foi prejudicado, como a produção de toxina por células também foi bem menor.

Figura 69: Comparação da produção de microcistinas intracelular entre os experimentos E1 (ASM-1), E4 (MLA) e E7 (BG11), todos na mesma concentração de $[\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10]$. Erros padrões são observados ($n=3$). (* $p=0,05$).

Nos experimentos realizados em diferentes meios de cultura, porém com a mesma proporção de nutrientes avaliados $[\text{NO}_3:\text{PO}_4=10]$; E1 (ASM-1), E4 (MLA) e E7(BG-11), a produção de microcistina intracelular demonstrou ser estatisticamente maior nos experimentos E7, E4 em comparação com E1. Neste primeiro tempo amostral a $Q_{MC \text{ Total}}$ de E7 também foi significativamente maior que E4 ($p<0,004$). Para os outros dias, as concentrações de toxinas não foram diferentes entre esses dois experimentos. É interessante lembrar que as durações dos crescimentos exponenciais desses experimentos variaram bastante. E1 atingiu seu máximo crescimento em 15 dias, E4 em 12 e E7 em 9 dias. Nesses tempos amostrais a $Q_{MC \text{ Total}}$ dos experimentos não demonstrou diferenças estatísticas.

Figura 70: Comparação da produção de microcistinas intracelular entre os experimentos controle E1 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10$) verso experimentos em BG-11: E6 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 100$) e E7 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10$). Erros padrões podem ser observados ($n=3$). (* $p<0,05$)

Ambos os experimentos conduzidos em BG-11 apresentaram diferença estatística para os valores de $Q_{MC \text{ Total}}$ quando comparados ao controle no primeiro dia amostral ($p<0,0002$ para ambos), sendo estatisticamente maiores. Esta diferença se inverteu no 6º dia, quando estes valores se tornaram estatisticamente menores que o controle E6 ($p<0,001$) e E7 ($p<0,0003$). A partir do 9º até o 15º dia, não foi observada nenhuma diferença. Já nos últimos dias de experimento, dias 18 e 21, os valores de $Q_{MC \text{ Total}}$ do experimento E6 demonstraram ser significativamente maiores que E1 (controle) ($p<0,001$) e E7 ($p<0,02$ no dia 18 e $p<0,0002$ no dia 21).

O crescimento de E7 acompanhou os experimentos semelhantes em $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]$ na comparação do crescimento, mas foi diferente na análise da produção de toxina. Já o E6, surpreendentemente, apesar de apresentar um crescimento bastante inibido, teve a maior concentração de toxina por célula observada em todo o trabalho.

Figura 71: Comparação entre os experimentos E1-E7 da produção intracelular de microcistinas totais ($Q_{MCTotais}$). Erros padrões podem ser observados ($n=3$). ($a=p<0,05$; $b=p<0,005$ e $c<0,0005$).

Na tabela abaixo estão os resultados das análises estatísticas a que se refere o texto a seguir.

Tabela 11: Valores indicativos de diferença estatística (p) obtidos por meio de teste de ANOVA seguida de Tukey na comparação dos grupos (E2 – E7) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem.

Grupos	Grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem								
		0	3	6	9	12	15	18	21
E2	Q _{MC-LR}	0,998	0,0008*	0,0004*	0,168	0,635	0,906	0,999	0,999
	Q _{MC-RR}	0,653	0,002*	0,002*	0,529	0,449	0,938	0,997	0,914
	Q _{MC-YR}	1	0,02*	0,004*	0,103	0,955	0,956	1	1
	Q _{MC-Total}	0,847	0,0048*	0,002*	0,307	0,502	0,924	0,999	0,987
E3	Q _{MC-LR}	0,987	0,009*	0,0005*	0,991	0,772	0,996	0,005 [†]	0,02 [†]
	Q _{MC-RR}	0,09*	0,131	0,002*	0,685	0,938	0,970	0,008 [†]	0,003 [†]
	Q _{MC-YR}	1	0,008*	0,009*	0,999	0,661	0,979	0,05 [†]	0,003 [†]
	Q _{MC-Total}	0,120	0,04*	0,002*	0,989	0,869	0,985	0,02 [†]	0,005 [†]
E4	Q _{MC-LR}	0,0002 [†]	0,003*	0,0002*	0,334	0,999	0,999	0,952	0,768
	Q _{MC-RR}	0,0006 [†]	0,003*	0,0003*	0,964	0,999	0,999	0,433	0,252
	Q _{MC-YR}	0,0007 [†]	0,05*	0,002*	0,555	0,999	1	0,817	0,335
	Q _{MC-Total}	0,0002 [†]	0,008*	0,0002*	0,720	0,999	1	0,714	0,426
E5	Q _{MC-LR}	0,997	0,0003*	0,0002*	0,002*	0,002*	0,346	0,937	0,966
	Q _{MC-RR}	0,05*	0,0009*	0,0002*	0,002*	0,003*	0,282	0,972	0,999
	Q _{MC-YR}	1	0,002*	0,0002*	0,002*	0,04*	0,405	0,952	0,996
	Q _{MC-Total}	0,08*	0,0004*	0,0002*	0,002*	0,002*	0,305	0,957	0,992
E6	Q _{MC-LR}	0,0002 [†]	0,999	0,002*	0,990	0,003*	0,07 [†]	0,0007 [†]	0,0002 [†]
	Q _{MC-RR}	0,0002 [†]	0,999	0,002*	0,999	0,752	0,425	0,002 [†]	0,0002 [†]
	Q _{MC-YR}	0,0002 [†]	0,992	0,02*	0,999	0,006*	0,03*	0,0003 [†]	0,0002 [†]
	Q _{MC-Total}	0,0002 [†]	0,999	0,002*	0,999	0,109	0,182	0,001 [†]	0,0002 [†]
E7	Q _{MC-LR}	0,0002 [†]	0,08 [†]	0,0003*	0,303	0,999	1	0,782	0,193
	Q _{MC-RR}	0,0002 [†]	0,627	0,0009*	0,792	0,998	0,999	0,405	0,07 [†]
	Q _{MC-YR}	0,0002 [†]	0,855	0,02*	0,428	0,987	0,998	0,516	0,03 [†]
	Q _{MC-Total}	0,0002 [†]	0,302	0,0004*	0,544	0,999	0,999	0,570	0,10 [†]

*Os valores de p são significativamente ou marginalmente menores quando comparados com E1

† Os valores de p são significativamente ou marginalmente maiores quando comparados com E1

Valores em vermelho são significativamente diferentes do controle.

Valores em verde são marginalmente diferentes do controle.

As produções de toxina por célula analisadas apresentaram homogeneidade de variância pelo teste de Brown-Forsythe. Portanto foi realizada uma análise de *one way* ANOVA, seguida de Tukey. Sempre usando E1 como experimento controle.

Em relação à Q_{MC-LR} , no tempo 0, somente os experimentos E4, E6 e E7 produziram toxina em quantidades significativamente maior que o controle. Neste mesmo tempo de amostragem, os dados referentes à produção de MC-RR por célula mostram que E4, E6 e E7 são significativamente maiores, enquanto E2 é igual a E1 e E3 marginalmente menor. Ainda neste tempo, as concentrações de MC-YR por célula mostram que os valores de E4, E6 e E7 são significativamente maiores que E1. Já para a somatória das três microcistinas, $Q_{MC-Total}$, percebe-se que E4, E6 e E7 são significativamente maiores que E1, enquanto E5 é marginalmente maior.

Após 72h, os dados referentes à Q_{MC-LR} , demonstram que em E2, E3, E4 e E5 as concentrações são significativamente menores que E1. E7 se mostra marginalmente maior quando comparado ao controle. Já as concentrações de MC-RR por célula neste tempo são menores em E2, E4 e E5. Para os dados relativos à MC-YR, as concentrações de E2, E3, E4 e E5 foram menores que E1. A somatória das variantes de microcistinas mostra que E2, E3, E4 e E5 são significativamente menores que o controle.

No dia 6, a produção celular de MC-LR foi significativamente menor em todos os experimentos quando comparados ao controle. O mesmo ocorreu para as concentrações de Q_{MC-RR} e Q_{MC-YR} . Consequentemente também refletiu nos valores de $Q_{MC-Total}$.

No 9º dia de crescimento, os valores de Q_{MC-LR} não foram significativamente diferentes do controle nos experimentos E2, E3, E4, E6 e E7. Já o E5 foi menor que E1. Os mesmos resultados podem ser observados ao se analisar as concentrações de Q_{MC-RR} , Q_{MC-YR} e $Q_{MC-Total}$.

Já nas amostras do dia 12, pode-se dizer que o experimento 6 demonstrou variações neste tempo amostral, apresentando-se significativamente menor que E1 nas quantificações de Q_{MC-LR} e Q_{MC-YR} e estatisticamente igual para Q_{MC-RR} e $Q_{MC-Total}$. As concentrações observadas no E5 foram todas significativamente menores que o controle, em todas as toxinas analisadas.

No 15º dia as concentrações de MC-LR por célula nos experimentos E2, E3, E4, E5 e E7 não são diferentes do controle, somente o E6 se mostrou marginalmente maior que E1. Para Q_{MC-RR} nenhuma diferença estatística para nenhum dos experimentos foi observado em comparação com o controle. Os dados de Q_{MC-YR} para os experimentos de E2, E3, E4, E5 e E7 são iguais ao controle e E6 significativamente menor que E1. Já na somatória das concentrações de microcistinas produzidas por células, não houve diferença estatística entre nenhum dos experimentos.

As concentrações celulares para todas as microcistinas e também para a somatória delas, no 18º dia foram consideradas iguais para os experimentos E2, E4, E5 e E7 em relação ao controle. Já os experimentos E3 e E6 demonstraram ter essas concentrações significativamente maiores que E1, também para todas as toxinas analisadas.

No último dia de amostragem foi observado que os Q_{MC-LR} , Q_{MC-RR} , Q_{MC-YR} e $Q_{MC-Total}$ dos experimentos E2, E4 e E5 não são estatisticamente diferentes do experimento controle, assim como o E3 e o E6 para todas as toxinas analisadas se mostrou significativamente maior que E1. Diferentemente, o experimento E7 no que diz respeito à concentração de MC-LR por célula, foi considerado igual a E1. Já a concentração celular de MC-RR e a MC-Total é marginalmente maior que o controle. Para a concentração de MC-YR por célula, apresentou valor significativamente maior que o controle.

6.5 Discussão

Os métodos utilizados para determinar o crescimento da cepa durante os estudos de variação permaneceram em perfeita correlação durante todo o tempo. Tanto a contagem, quanto as leituras das absorvâncias podem ser utilizados para o acompanhamento do desenvolvimento e avaliação do comportamento de culturas de cianobactérias, estando de acordo com Valer e Glock (VALER & GLOCK, 1999). Os comprimentos de onda utilizados (680 nm e 750 nm) refletem a absorvância máxima dos fotossistemas I e II respectivamente (WITT, 2004).

O crescimento e a concentração intracelular de microcistinas variam muito sob o efeito de diferentes concentrações de $\text{NO}_3:\text{PO}_4$. O que reflete o grande efeito que os nutrientes exercem sobre os fatores relacionados à biossíntese de microcistinas. Estudos mais antigos concluíam que as maiores concentrações de toxina por célula de cianobactérias são observadas sobre condições favoráveis ao crescimento, porém estudos atuais provam o contrário. Os resultados observados neste trabalho corroboram estes novos estudos.

Orr e Jones (ORR & JONES, 1998) avaliaram a relação entre a produção de toxinas e taxas de divisão celular em culturas de *Microcystis aeruginosa* com limitação na disponibilidade de nitrogênio. Culturas axênicas, ou seja, livre de outros organismos e contaminantes neste caso bactérias e fungos, e também culturas não axênicas foram avaliadas às mesmas alterações de nutrientes. Os autores observaram que as maiores concentrações celulares estavam diretamente relacionadas à concentração inicial de nitrato. Isso não foi observado em todos os nossos experimentos. Observamos aqui que os experimentos E5 e E6; conduzidos com as maiores concentrações de nitrato ($\text{NO}_3 = 8,8 \text{ mM}$ e $17,6 \text{ mM}$ respectivamente) não alcançaram grandes concentrações celulares em nenhum momento durante o crescimento. Porém na menor concentração de nitrato avaliada em nossos experimentos: E2 ($\text{NO}_3 = 0,2 \text{ mM}$) o comportamento observado por Orr e Jones foi corroborado, pois com menor disponibilidade de nitrato, o crescimento foi menor que o controle.

A justificativa para os experimentos E5 e E6 não terem apresentado um bom desenvolvimento no que diz respeito ao crescimento aparece quando

comparamos nossos resultados ao estudo conduzido por Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2009). Esses pesquisadores avaliaram o efeito do nitrato na concentração intracelular de nitrito e crescimento de cepa de *Microcystis aeruginosa*. Eles variaram as concentrações de nitrato nas culturas em valores de 3,57 mM a 21,43 mM. Ao avaliar o crescimento das cepas, observaram que o crescimento foi inibido nos experimentos com altas concentrações de nitrato. O mesmo foi observado em nossos experimentos E5 e E6. Eles apontam o fato de que em altas ofertas de nitrato, há um aumento significativo na concentração de nitrito intracelular. Em geral, o excesso de nitrato pode ser estocado nas células sem causar efeito deletério à célula, mas o nitrito afeta significativamente o processo fotossintético por inibir o transporte de elétrons, alterar o pH intracelular e causar danos diretos às membranas celulares (CHEN *et al.*, 2009).

Ainda no que diz respeito ao crescimento, Orr e Jones observaram relação entre o tempo de transição entre a fase logarítmica de crescimento para a fase estacionária quando há aumento da concentração de nitrato (ORR & JONES, 1998). Essa relação não foi observada em nossos experimentos. As diferenças que observamos podem ser atribuídas a outros fatores, mas não especificamente a concentração de nutrientes imposta.

Marinho e Azevedo, 2007 não encontraram alterações na velocidade de crescimento em diferentes concentrações de nitrogênio/fósforo. Diferente do que observamos neste trabalho. Por outro lado, no tocante à biomassa gerada nos experimentos, Marinho e Azevedo encontraram diferença significativa entre o aumento de biomassa e concentração de nitrato no meio, sendo esta relação proporcional (MARINHO & AZEVEDO, 2007). A mesma relação foi observada para os experimentos E1, E2, E3, E4 e E7 com proporção $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ variando entre 1 e 20. Os experimentos E1, E3, E4 e E7 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10$ a 20) apresentaram as maiores concentrações celulares durante a fase estacionária, formando um grupo homogêneo. Enquanto E2 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 1$) teve a menor concentração celular durante todo o experimento. Este mesmo resultado também foi observado em estudo conduzido por Vézic e colaboradores (VEZIE *et al.*, 2002). A exceção encontrada foi para os experimentos E5 e E6, que

apesar da alta proporção entre os nutrientes avaliados, apresentaram as menores concentrações celulares ao final do experimento.

Existe uma grande discussão em torno do papel das microcistinas. Enquanto Orr e Jones afirmam que este composto é um metabólito primário, participando em algum processo metabólico essencial para a célula e, portanto sendo constantemente produzido. Por outro lado, Carmichael (CARMICHAEL, 1992) afirma que esses heptapeptídeos são metabólitos secundários e sua síntese é estimulada assim que termina a fase exponencial de crescimento. Para provar sua teoria, Orr e Jones encontraram uma correlação linear direta entre divisão celular e produção de microcistina. Eles afirmam que isso pode ser estendido a todas as cianobactérias produtoras de toxinas, a não ser pela presença de algum fator ambiental que limite a divisão celular. Ou seja, nutrientes e fatores limitantes de crescimento como luz, temperatura, entre outros que influenciem a produção de microcistinas pelas cianobactérias pelo seu efeito no crescimento e divisão celular, mas não por algum efeito direto nas vias metabólicas ou biossintéticas das toxinas (ORR & JONES, 1998).

Sendo assim, a taxa de produção de toxina por célula (Q_{MC}) deveria ser uma constante, porém as variações das concentrações dessa taxa são significativas e constantemente observadas em vários estudos (SIVONEN, 1990; VEZIE *et al.*, 2002). O que sugere uma relação mais complexa entre crescimento e produção de toxina (LYCK, 2004). A correlação linear existente entre crescimento e produção de microcistinas reportada por Orr e Jones também foi observada por Lyck. Neste trabalho também observamos essa correlação. Por outro lado a grande variação nas concentrações de toxina por célula não permite que possamos afirmar que existe constância na produção de toxinas.

Maiores valores Q_{MC} no final da fase logarítmica de crescimento e início da fase estacionária foram observados para todos os experimentos conduzidos por Orr e Jones (ORR & JONES, 1998). Em nosso trabalho o mesmo foi observado nos experimentos E1, E2 e E3 este último com a ressalva que a maior concentração de Q_{MC} foi durante a fase estacionária, porém neste período de transição de fases, houve um grande aumento em comparação com os outros tempos avaliados. Já nos experimentos E4, E6 e E7 esse

comportamento não foi observado. Nesses experimentos foi observado um aumento gradual da produção intracelular de microcistina, porém a máxima concentração de Q_{MC} não foi encontrada no período de tempo mencionado anteriormente. Os referidos pesquisadores perceberam similaridade da Q_{MC} na fase estacionária de seus experimentos, onde esses valores diminuam e permaneciam constantes e isso só foi observado em nosso experimento E7.

Este aumento da concentração celular de microcistinas durante a fase estacionária tardia pode ser a explicação dos altos valores de Q_{MC} observados no tempo zero em vários experimentos. Uma vez que o tempo zero reflete a condição celular quando inóculo, e é perfeitamente justificável o aparecimento de grandes concentrações celulares de microcistina nos experimentos E4, E7 e E6. O que não se observa em E1, E2, E3 e E5. Com exceção de E5, todos foram realizados em meio ASM-1. Chama a atenção que no tempo zero, todos apresentam as menores concentrações celulares de toxina.

No estudo de Vézic e colaboradores (VEZIE *et al.*, 2002), também se observou a significativa influência que os nutrientes tem sobre a concentração intracelular de toxinas. Eles encontraram altas concentrações intracelulares de microcistinas nos experimentos onde foram observados os maiores crescimentos celulares, bem como no experimento que apresentou menor desenvolvimento celular. Entra, portanto em concordância com nossos resultados, onde altas concentrações celulares de microcistina foram encontradas nos experimentos que melhor se desenvolveram E1, E4 e E7; assim como no experimento que teve seu crescimento pouco expressivo E6.

Lee e colaboradores (LEE *et al.*, 2000) observaram as mudanças nas concentrações de microcistinas em cepa de *Microcystis aeruginosa* sobre diferentes razões de N:P. Eles observaram que a razão desses nutrientes quando N:P=16, propiciou melhor crescimento e produção de toxinas. Ainda nesse estudo, os autores observaram as maiores absorvâncias de clorofila em 680nm nos experimentos com as maiores concentrações de N no meio e também as menores leituras de absorvância neste comprimento de onda nos experimentos cujo meio era composto com as menores concentrações de nitrogênio (LEE *et al.*, 2000).

Um estudo realizado por Downing e colaboradores (DOWNING *et al.*, 2005) encontrou as maiores concentrações de microcistinas em relações de N:P 18 a 51, sendo a proporção ótima de N:P=31,1. Os autores não encontraram correlações significativas entre os constituintes celulares das cepas de *M. aeruginosas* avaliados, tal como teor de microcistinas, clorofila e proteínas e o crescimento da mesma nos experimentos realizados com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo. No entanto, observaram que quanto maior o crescimento também é maior a concentração de microcistinas por célula. Os autores ressaltam que as microcistinas são produzidas em função do teor de nitrogênio intracelular e que a contradição entre vários estudos é devido a modulação da concentração intracelular de nitrogênio por fatores que controlam a entrada deste nutriente nas células e o assimilam (DOWNING *et al.*, 2005).

Estudos conduzidos com outros parâmetros que não a produção de microcistina por células tornam a comparação difícil. Uma vez que teores de proteína, clorofila e peso seco mesmo sendo parâmetros correlacionados ao crescimento podem não representar uma interpretação precisa dos dados. Principalmente pelo fato de serem também fatores dependentes de processos celulares e passíveis de alterações no que diz respeito ao efeito de fatores ambientais possíveis de alterar crescimento e produção de toxina, levando a conclusões errôneas.

7. CAPÍTULO III – TRANSCRIÇÃO GÊNICA E BIOSÍNTESE DAS MICROCISTINAS

7.1 Introdução

Os recentes avanços das técnicas de biologia molecular promoveram a compreensão mais detalhada da produção dos metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias. Possibilitaram estudos que envolvem a descoberta dos genes e vias biossintéticas envolvidas na produção da cianotoxina microcistina a partir de espécies de *Microcystis* sp. Isto foi possível a partir da elucidação da organização estrutural dos genes relacionados com a síntese desta toxina pela cepa *Microcystis aeruginosa* PCC-7806 (TILLET *et al.*, 2000).

O genoma completo desta espécie já foi totalmente elucidado. É um único cromossomo circular que contém 5.842.795 pares de base, compreendendo 6312 genes codificadores de proteínas. Sequências insercionais e elementos de transposição representam 11,8% do genoma e conferem à espécie grande plasticidade através de mecanismos que envolvem recombinações homólogas mediante elementos repetitivos de DNA. Três agrupamentos de genes responsáveis pela síntese não ribossômica de peptídeos foram encontrados durante a caracterização do genoma da *Microcystis aeruginosa* – NIES-843. Um deles é responsável pela síntese de microcistinas (*mcyA-J*) outro pela síntese de cianopectolinas e o último ainda com função desconhecida (KANEKO *et al.*, 2007).

A síntese da microcistina ocorre fora dos ribossomos através de um grande complexo enzimático multifuncional, o qual consiste de vários módulos de síntese de peptídeos não ribossomais e síntese de policetídeos, denominados NRPS (*non-ribosomal peptide synthase*) e PKS (*polyketide synthase*) respectivamente. Esses complexos enzimáticos constituem uma classe de proteínas multifuncionais que regem complexas reações enzimáticas com mecanismos muito interessantes e de grande apelo comercial pelo fato desses complexos sintetizarem uma infinidade de metabólitos secundários, muitos dos quais são fármacos utilizados na terapêutica, como antibióticos e imunossupressores. Essas enzimas representam algumas das maiores

proteínas conhecidas e por consequência desta característica multifuncional, uma única proteína pode catalizar dezenas de reações bioquímicas (HUTCHINSON, 2003).

Na biossíntese da microcistina, os módulos de síntese de peptídeos individuais catalisam a ativação de amino/hidroxi ácidos e reações de formação de tioésteres na mesma razão na qual seus resíduos são incorporados nas cadeias heptapeptídicas em formação. O alongamento desta cadeia é catalisado pelo cofator de enzima de ligação, a 4-fosfopanteteína. É proposto que a síntese de policetídeos esteja envolvida na produção do ácido graxo presente em um dos lados da cadeia do aminoácido Adda, cuja presença confere toxicidade para a molécula (KAEBERNICK *et al.*, 2000; KAEBERNICK & NEILAN, 2001)

Estudos genéticos sobre sínteses não ribossômicas de peptídeos, via enzimas multifuncionais, não são exclusivos de cianobactérias. Ao contrário, foram primeiramente estudados em vários gêneros de bactérias, fungos e actinomicetos. Os genes envolvidos na síntese de peptídeos estão geralmente relacionados à biossíntese de antibióticos, exotoxinas e outros compostos bioativos. Acredita-se que a regulação destes genes seja um controle primário do início da transcrição, possivelmente via sistema duplo de componentes bacterianos que estão envolvidos na transdução de informações referentes a condições ambientais através de um ativador (sensor quinase) e uma proteína receptora, via fosforilação (KAEBERNICK & NEILAN, 2001). Genes codificadores da síntese de peptídeos das cianobactérias estão geralmente agrupados em unidades funcionais do genoma com domínios repetidos onde os núcleos sequenciais bem conservados foram identificados.

A elucidação do agrupamento gênico (*mcy*) responsável pela síntese da microcistina tornou possível o desenvolvimento de técnicas moleculares capazes de estudar diferentes gêneros produtores dessa toxina. O agrupamento *mcy* é significativamente diferente entre os diferentes gêneros produtores de microcistinas, como *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*; as diferenças encontradas dizem respeito à organização e à presença dos genes *mcy* envolvidos, bem como na sequência de nucleotídeos (HOTTO *et al.*, 2007). O agrupamento *mcyA-J* foi identificado e seqüenciado na espécie

Microcystis aeruginosa PCC 7806 (TILLET *et al.*, 2000) e na cepa também de *M. aeruginosa* NIES-843 (KANEKO *et al.*, 2007). É composto de 55kb por 10 quadros de leitura (ORFs), ou módulos, arranjados em duas prováveis unidades funcionais - operons (*mcyA-C* e *mcyD-J*), o que também revelou ser uma estrutura bidirecional. Sabe-se, portanto que o gene *mcy* é modular e cada um dos módulos que o compõem ativa e incorpora à molécula diferentes constituintes do heptapeptídeo. Pode ser dividido da seguinte maneira: os genes *mcyA-C*, são responsáveis pela síntese dos heptapeptídeos, ativação e incorporação do N-metildiidroalanina (Mdha), *D*-alanina, arginina (X/Z) e *D*-Metil-aspartato durante a biossíntese da microcistina e também pela ciclização final do heptapeptídeo (KURMAYER & KUTZENBERGER, 2003). Enquanto os genes *mcyD-J* são responsáveis pela síntese tanto dos peptídeos quanto dos policetídeos, catalisando a formação do Adda e sua ligação ao glutamato.

De um total de 48 reações sequenciais envolvidas na biossíntese da microcistina, 45 foram atribuídas aos domínios catalíticos com seis grandes multienzimas de síntese (*mcyA-E, G*), as quais incorporam à molécula precursores do fenilacetato, malonil-coenzimaA, S-adenosil-L-metionina, serina e leucina. O gene *mcyJ* está envolvido na *O*-metilação, *mcyF* na epimerização, *mcyI* na desidratação e o *mcyH* na localização (TILLET *et al.*, 2000).

A mutagênese insercional de alguns desses genes (*mcyA, B e D*) produzem mutantes não produtores de toxina, evidenciando ainda mais o envolvimento deste gene na síntese de microcistinas (KAEBERNICK & NEILAN, 2001).

O *mcyB* codifica a síntese para um peptídeo de 242,334Da, composto por dois módulos que possuem domínios de adenilação, tiolação e condensação. É provável que o *mcyB* esteja envolvido na ativação dos dois aminoácidos que podem variar nas posições X/Z da molécula. Vários estudos foram realizados utilizando os iniciadores de oligonucleotídeos desta região, FAA e RAA, para se identificar cepas produtoras de microcistina. (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; DOS ANJOS *et al.*, 2006)

O controle do nitrogênio nas cianobactérias é mediado por um regulador transcricional chamado NtcA, que pertence à família CAP (ativador de gene

catabólito ou receptor de proteína AMP cíclico), porém diferente dos sistemas Ntr com a função semelhante encontrados em outros procariotos.

Pouco é conhecido sobre fatores regulatórios envolvidos na biossíntese de toxinas. Estudos envolvendo diferentes concentrações de nitrato são contraditórios. Entretanto a existência de *boxes* de NtcA nas regiões promotoras do gene bidirecional *mcy* sugere que esse fator de transcrição poderia participar na regulação da síntese de microcistinas. Outros genes também estão ligados a modulação no NtcA e não somente envolvidos na metabolismo do nitrogênio, mas na fixação de carbono, na fotossíntese e na homeostase (SEVILLA *et al.*, 2008).

O esquema do grupamento gênico responsável pela síntese das microcistinas pode ser visto na figura a seguir (figura 72).

Figura 72: Representação esquemática da organização do gene cluster *mcy*. Adaptada de (TILLET et al., 2000).

7.2 Objetivo

- Avaliar as diferenças na expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e na síntese de microcistinas pela cepa de *Microcystis aeruginosa* em diferentes meios de cultivo.

7.3 Material e Métodos

7.3.1 Material

Kit para extração de RNA RNAqueous da Applied Biosystems®, RNA Later - Applied Biosystems®, Kit de síntese de cDNA High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix da Applied Biosystems® e kit para amplificação TaqMan® Gene Expression Master Mix da Applied Biosystems® e Custom TaqMan® Gene Expression Assay com iniciadores e sondas. *Primers* específicos dos genes monitorados *mcvB* e rRNA 16S. Como controle endógeno, o gene *cpc*. Placas para RT-PCR de 96 poços e adesivos ópticos. Termociclador modelo PTC-200 (MJ-Research. Inc.). Microcentrífuga Eppendorf® modelo 5415R. Equipamento de PCR Real time modelo 7500 da Applied Biosystems® Software & Version: SDS v.2.0.3. Software Bio Edit® - *Biological sequence alignment editor for Win 95/98/NT/2K/XP*.

Primers para confirmação de síntese de cDNA Fermentas® *mcvB* (F-TGGATACCTCAACCAACCTGAATTG, R-CCCTGAGCAAAAGGATGAGGAA) e *16s rRNA* (F- GCGTGAAATGCGTAGAGATTGG e R-TGTCAGATACAGCCCAGTAGCA), Taq DNA Polymerase Fermentas® recombinante, DNTPs Fermentas®, gel de agarose a 1,2%, corante GelRed (Biotium®, Inc.). Dietil pirocarbonato - Sigma Aldrich®. Microcutbos, ponteiras e pipetas Eppendorff®. Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer Uniscience.

Para a contagem de células, preparo das amostras e quantificação das microcistinas, os mesmos materiais descritos em 6.3.1 foram utilizados.

7.3.2 Métodos

7.3.2.1 Variações condições de cultivo

A mesma cepa estudada no capítulo anterior foi utilizada para se realizarem os experimentos propostos no capítulo presente. Como descrito em 6.3.2.1, a cepa **LTPNA 02** – *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistinas MC-LR, MC- YR, MC RR, Desm-MC-RR e Desm-MC-LR) foi cultivada em dois diferentes meios de cultura, cada um com duas variações na proporção $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]$

- Meio ASM-1

Descrito em 5.3.2.10 em sua condição normal $[\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10]$. Este meio foi utilizado para o experimento de variação 1 (E1).

Para o experimento realizado com este meio modificado, somente a solução estoque **A** foi alterada, conforme segue:

Para $[\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 100]$ - **Solução estoque A** : NaNO_3 (17 g); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,41 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,49 g) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,29 g). Completado volume para 200ml com água Milli Q®. Solução preparada de acordo com 5.3.2.10. Este meio foi utilizado para o experimento de variação 2 (E2).

- Meio BG-11

Descrito em 6.3.2.5.

Foram utilizadas as duas concentrações de meio já descritas anteriormente. BG-11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 10]$ - Experimento de variação 3 (E3) e BG-11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4 = 100]$ – experimento de variação 4 (E4).

Os experimentos foram realizados em triplicata, com aeração constante, em condições de incubação referentes à temperatura ($25^\circ\text{C} \pm 0,5$), luminosidade (1100 lux) e fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro, tempo de incubação (21 dias) e tempo de avaliação (a cada 120 h) idênticos.

Os procedimentos para a montagem dos experimentos foram realizados com materiais previamente esterilizados em autoclave (121°C por 20 min) e em ambiente estéril – fluxo laminar.

7.3.2.2 Contagem de cianobactérias em câmara de Neubauer

Procedimento realizado como descrito em 6.3.2.6.

7.3.2.3 Preparo das amostras para análise de toxinas

Procedimento realizado como descrito em 6.3.2.8.

7.3.2.4 Quantificação de microcistinas por LC-MS Q Trap

Procedimento realizado como descrito em 6.3.2.9.

7.3.2.5 Isolamento RNA

Para o isolamento do RNA foi utilizado o RNAqueous® Kit (AM 1912). Primeiramente foram preparadas as soluções de trabalho como descrito no kit. A partir de 75mg de material concentrado das culturas, as células foram lisadas por processo de congelamento/descongelamento repetido três vezes. Ao lisado de células foi adicionado 75mL de etanol 64% (solução de lise), agitado em Vortex®. Centrifugado por 2 minutos a 15.682 g. Esta solução de lisado foi aplicada pelo filtro, provido no kit de isolamento e então centrifugado por 1 min a 15.682 g. O filtrado foi descartado. Ao filtro foram aplicados 700 µL da *Wash Solution nº1*, centrifugado por 30 s a 15.682 g, descartado o filtrado. Novamente ao filtro foram aplicados 500 µL da *Wash Solution 2/3* e centrifugado por 1 min a 15.682 g. Após esse passo, o filtro é removido do tubo e acondicionado em novo tubo, estéril. Ao filtro são adicionados 40 µL da solução de eluição e centrifugado por 30s a 15.682 g. O filtrado desta etapa consiste no RNA.

A qualidade e concentração do RNA extraído foram determinadas por nanodrop, monitorando as absorvâncias em 260 nm e 280 nm. A qualidade é representada pela razão das absorvâncias $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, que deve estar entre 1,8 a 2,1. A concentração foi calculada pela fórmula:

$$A_{260\text{ nm}} \times \text{fator diluição} \times 40 = \mu\text{gRNA/mL}$$

7.3.2.6 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix da Applied Biosystems®. A partir do RNA extraído na etapa anterior, o procedimento foi realizado com o protocolo do kit.

No termociclador foram seguidos os seguintes passos: (i) 25°C por 5 min; (ii) 42°C por 30 min; (iii) 85°C por 5 min e (iv) 4°C.

7.3.2.7 PCR em tempo real

As reações para as análises de PCR em tempo real foram obtidas a partir do cDNA sintetizado na etapa anterior, adicionado a TaqMan® Gene Expression Master Mix da Applied Biosystems® e Custom TaqMan® Gene Expression Assay, na seguinte proporção:

20X Custom TaqMan® Gene Expression Assay.....	1 µL
TaqMan® Gene Expression Master Mix.....	10 µL
cDNA.....	9 µL
<hr/>	
Volume total de reação	20 µL

Todas as reações para os três genes analisados foram realizadas em triplicatas.

7.3.2.8 Desenho dos iniciadores e sondas

Para o desenho dos iniciadores, foram escolhidas partes das sequências dos genes trabalhados que são mais conservados, descritos na literatura e disponíveis no banco de dados do *NCBI - National Center for Biotechnology Information (NCBI, 1999)*. Para escolher as partes dos genes, foi utilizado o software *Bio Edit® - Biological sequence alignment editor for Win 95/98/NT/2K/XP*. Após a escolha das sequências de interesse, o desenho dos iniciadores e sondas foi realizado pela empresa Applied Biosystems®, na forma do kit Custom TaqMan® Gene Expression Assay. Genes analisados:

- **cpc** (parte do gene da ficocianina) – *Controle endógeno*
- **16S** (parte do gene 16S RNA ribossomal) – *Gene alvo*
- **mcyB** (parte do gene *mcyB* – responsável pela síntese de microcistinas) – *Gene alvo*

Tabela 12: Sequência dos iniciadores e sondas

cpc	F - GGCGATTGCAGTGCTTTAATGTC
	R - GAGACTAGCCCCAGGGACTA
	Sonda (FAM) - TAGCTGGCAATTTCA
16S	F - GGCGATTGCAGTGCTTTAATGTC
	R - GAGACTAGCCCCAGGGACTA
	Sonda (FAM) - TAGCTGGCAATTTCA
mcyB	F - TGGATACCTCAACCAACCTGAATTG
	R - CCCTGAGCAAAAGGATGAGGAA
	Sonda (FAM) - ACGGCTGAGAAATTTA

Os parâmetros do termociclador foram 50°C por 2 min, seguido de 95°C por 10 min e então 52 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

7.3.2.9 Eficiência das reações

Para calcular as eficiências das reações, os mesmos procedimentos descritos em 7.3.2.5, 7.3.2.6 e 7.3.2.7 foram realizados. As concentrações dos genes analisados para realizar as curvas de calibração e então calcular as eficiências foram diluições dos *templates*, de 1:2, 1:4; 1:8 e 1:16.

Figura 73: Esquema da execução dos experimentos de análise da expressão gênica.

7.4 Resultados

7.4.1 Comparação meios de culturas

Todos os experimentos foram processados conforme itens descritos de 7.3.2.2 a 7.3.2.7.

Comparação da composição dos meios de cultura empregados como pode ser observado nas tabelas 13, 14 e 15 a seguir:

Tabela 13: Proporção nitrato e fosfato nos meios de cultura utilizados.

	ASM-1 (10)*	ASM-1 (100)	BG11* (100)	BG11 (10)
[NO₃:PO₄]	10	100	100,5	10,05

* Meios de cultura não modificados dos originais referidos na literatura.

Tabela 14: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e respectiva concentração por litro de solução.

Composição	ASM-1*	ASM-1 (100)	BG11(10)	BG11* (100)
NaNO₃	0,17 g	1,7 g	0,15 g	1,5 g
MgCl₂ . 6 H₂O	0,041 g	0,041 g	-	-
Mg SO₄ . 7 H₂O	0,049 g	0,049 g	0,075 g	0,075 g
CaCl₂ . 2 H₂O	0,029 g	0,029 g	0,036 g	0,036 g
KH₂PO₄	0,0136 g	0,0136 g	-	-
Na₂HPO₄ . 7 H₂O	0,0268 g	0,0268 g	-	-
H₃BO₃	2,48 mg	2,48 mg	2,86 mg	2,86 mg
K₂HPO₄. 3 H₂O	-	-	0,04 g	0,04 g
MnCl₂ . 4 H₂O	1,39 mg	1,39 mg	1,81 mg	1,81 mg
FeCl₃ . 6 H₂O	1,08 mg	1,08 mg	0,006 g	0,006 g
Zn Cl₂	3,35 mg	3,35 mg	-	-
CoCl₂ . 6 H₂O	0,19 mg	0,19 mg	-	-
CuCl₂	1,4 µg	1,4 µg	-	-
Edta Na₂	7,44 mg	7,44 mg	1 mg	1 mg
Na₂MoO₄.2H₂O	-	-	0,39 mg	0,39 mg
CuSO₄.5H₂O	-	-	0,079 mg	0,079 mg
ZnSO₄.7H₂O	-	-	0,222 mg	0,222 mg
Ácido cítrico	-	-	0,006 g	0,006 g
Na₂CO₃	-	-	0,02 g	0,02 g
Co(NO₃)₂.6H₂O	-	-	0,0494 mg	0,0494 mg

* Meios de cultura não modificados dos originais referidos na literatura.

** Ácido cítrico – C₆H₈O₇.

Tabela 15: Relação da composição dos meios de cultura utilizados e suas concentração molar.

Composição	ASM-1(10)*	ASM-1 (100)	BG11(10)	BG11 (100) *
NaNO₃	2 mM	20 mM	1,76 mM	17,6 mM
MgCl₂ . 6 H₂O	0,2 mM	0,2 mM	-	-
Mg SO₄ . 7 H₂O	0,199 mM	0,199 mM	0,3 mM	0,3 mM
CaCl₂ . 2 H₂O	0,1975 mM	0,1975 mM	0,245 mM	0,245 mM
KH₂PO₄	0,1 mM	0,1 mM	-	-
Na₂HPO₄ . 7 H₂O	0,1 mM	0,1 mM	-	-
K₂HPO₄ . 3 H₂O	-	-	0,175 mM	0,175 mM
H₃BO₃	40 µM	40 µM	46 µM	46 µM
MnCl₂ . 4 H₂O	7 µM	7 µM	9,1 µM	9,1 µM
FeCl₃ . 6 H₂O	3,9 µM	3,9 µM	22,1µM	22,1µM
Zn Cl₂	24,6 µM	24,6 µM	-	-
CoCl₂ . 6 H₂O	0,7 µM	0,7 µM	-	-
CuCl₂	0,0104 µM	0,0104 µM	-	-
Edta Na₂	19,9 µM	19,9 µM	2,6 µM	2,6 µM
Na₂MoO₄.2H₂O	-	-	1,6 µM	1,6 µM
CuSO₄.5H₂O	-	-	0,3 µM	0,3 µM
ZnSO₄.7H₂O	-	-	0,7 µM	0,7 µM
Ácido cítrico**	-	-	0,03 mM	0,03 mM
Na₂CO₃	-	-	0,188 mM	0,188 mM
Co(NO₃)₂.6H₂O	-	-	0,1 µM	0,1 µM

* Meios de cultura não modificados dos originais referidos na literatura.

** Ácido cítrico – C₆H₈O₇.

7.4.2 Determinação das eficiências das reações de RT-PCR

O método utilizado para o estudo da expressão dos genes 16S, *mcyB* e *cpc* foi o método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$. Este método foi escolhido, pois não existem padrões comerciais disponíveis para as amostras deste estudo que permitiriam realizar o método de quantificação absoluta e também porque a quantificação relativa simples demanda uma curva de calibração presente em cada placa analisada. Pelo número de amostras e genes analisados, este último método se tornaria impraticável tanto na execução, quanto na quantidade de reagentes requeridos.

Para a realização da quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$ é necessário que as amplificações dos genes escolhidos tenham as suas eficiências determinadas e que essas estejam dentro de uma variação de 20%, ou seja entre 90% e 110%.

As eficiências das reações são geradas a partir de curvas de amplificação de reações de PCR em tempo real, com diferentes concentrações de *templates*, neste caso foi utilizado o cDNA da cepa LTPNA-02. As respectivas eficiências podem ser observadas na tabela 16 e figuras 74, 75 e 76.

Tabela 16: Relação das eficiências das reações de RT-PCR.

Gene	Eficiência
<i>cpc</i>	101,1%
16S	108,1%
<i>mcyB</i>	105,77

Figura 74: Eficiência da reação do gene *cpc*. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Figura 75: Eficiência da reação do gene 16S. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 76 : Eficiência da reação do gene *mcvB*. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

7.4.3 Experimento 1 – controle (E1)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 não sofreu nenhuma variação nas suas condições de cultivo. O inóculo permaneceu uma semana em meio ASM-1 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100lux. Realizada em triplicata. Tomadas de dados em intervalos de 120 h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=10. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 77: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 78: Quantificação das microcistinas totais em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).

Figura 79: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em meio ASM-1 $[NO_3:PO_4]=10$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 80: Expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene *cpc* em meio ASM-1 $[NO_3:PO_4]=10$.

Este experimento é considerado como controle e será a base para a comparação entre os outros experimentos realizados nesta etapa do trabalho.

O crescimento exponencial ocorreu durante os 15 primeiros dias. A concentração de microcistinas (MC-LR, MC-RR e MC-YR) foi crescente desde o tempo 0 até o último dia de experimentos.

O quociente de microcistinas por célula, para todas as variantes foi maior no tempo 0, sendo este um reflexo das condições do inóculo. Teve diminuição nos primeiros 10 dias, mantendo-se constante até o final do experimento, como pode ser visto na figura 79.

A análise da expressão dos genes, demonstrada na figura 80 pode sugerir uma decrescente expressão tanto do gene 16S, quanto do *mcyB* nos 10 primeiros dias, seguido de um aumento. A comparação das diferenças nas quantificações relativas nos tempos amostrais não expressa uma variação real, pois são valores muito sutis e podem ser interpretadas como se não houvesse nenhuma diferença.

7.4.4 Experimento 2 – (E2)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada em meio ASM-1 modificado. O inóculo permaneceu uma semana em meio ASM-1 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomadas de dados em intervalos de 120 h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=100. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 81: Crescimento da cepa em células/mL em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=100. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 82: Quantificação das microcistinas totais em meio ASM-1 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 83: Relação de microcistinas por células ($Q_{\text{MC-Total}}$) em meio ASM-1 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 84: Expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene *cpc* em meio ASM-1 [NO₃:PO₄]=100.

Esse experimento teve sua fase de crescimento exponencial observada nos 15 primeiros dias. Novamente observa-se um gradual aumento na concentração de toxinas analisadas. Figura 82.

O quociente de microcistinas por células mostra sua maior concentração no tempo 0, decaindo nos 5 primeiros dias e mantendo-se constante até o final do experimento. Como mostra a figura 83.

A análise da expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene *cpc* sugere uma diminuição da expressão dos genes analisados. Mais uma vez essa diferença na expressão pode ser interpretada como inexistente, uma vez que os valores da quantificação relativa não exprimem valores significativos.

7.4.5 Experimento 3 – (E3)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada no meio BG11 (-). O inóculo permaneceu uma semana em meio BG11 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=10. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 85: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG-11 [NO₃:PO₄]=10. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 86: Quantificação das microcistinas totais em meio BG-11 [NO₃:PO₄]=10 para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).

Figura 87: Relação de microcistinas por células ($Q_{MC-Total}$) em cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 88: Expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene *cpc* em meio BG-11 $[NO_3:PO_4]=10$.

A fase de crescimento exponencial da cepa neste experimento foi observada nos 10 primeiros dias.

A concentração de microcistinas intracelular teve sua maior concentração no tempo 0, refletindo as condições do inóculo. Teve um

pequeno decréscimo nos 5 primeiros dias, voltando a ter um aumento gradual, porém sutil até o final do experimento, como é visto na figura 87.

A expressão do gene alvo 16S, em relação ao controle endógeno *cpc* sugere uma diminuição na expressão nos 15 primeiros dias, com um pequeno aumento no 20º dia. Já a expressão do gene alvo *mcvB*, demonstra um leve aumento nos 5 primeiros dias, diminuindo até o 15º dia. No 20º dia é possível observar um grande aumento na sua expressão, coincidindo com o aumento na produção intracelular de microcistinas.

7.4.6 Experimento 4 – (E4)

Neste experimento a cepa LTPNA 02 foi cultivada no meio BG11 (+). O inóculo permaneceu uma semana em meio BG11 nas mesmas condições em que se realizaram os experimentos. Aeração constante, temperatura em 25°C(±1), fotoperíodo 12/12 h, irradiância de 1100 lux. Realizada em triplicata. Tomada de dados em intervalos de 72 h. Proporção de nutrientes: [NO₃:PO₄]=100. O experimento foi iniciado com 5x10⁵ células/mL.

Figura 89: Crescimento da cepa em células/mL em meio BG-11 [NO₃:PO₄]=100. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Figura 90: Quantificação das microcistinas totais em meio BG-11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 91: Relação de microcistinas por células ($Q_{\text{MC-Total}}$) em meio BG-11 $[\text{NO}_3:\text{PO}_4]=100$ para cada tempo amostral. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$).

Figura 92: Expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene *cpc* em meio BG-11 [NO₃:PO₄]=100.

A fase de crescimento exponencial foi observada nos 5 primeiros dias.

A concentração intracelular de microcistinas teve sua maior concentração no tempo 0, refletindo as condições do inóculo. Teve um pequeno decréscimo nos 5 primeiros dias, voltando a ter um aumento gradual, porém sutil até o final do experimento, como é visto na figura 91. Este comportamento foi muito semelhante ao comportamento da cepa nas condições impostas no experimento E3. Ambos foram realizados em meio BG-11. A diferença observada entre os dois experimentos está nos valores da concentração intracelular de microcistinas que foram superiores neste experimento (E4) em comparação com E3.

Ao se analisar a expressão dos genes, é possível identificar uma diminuição inicial na expressão de ambos os genes alvos nos 10 primeiros dias. Após o 15º dia se observa um aumento sutil na expressão. As quantificações relativas observadas no último dia amostral demonstram aumento da expressão do gene *mcyB* e leve diminuição do 16S.

7.4.7 Comparação entre os experimentos

7.4.7.1 Crescimento

O crescimento foi determinado a partir da contagem do número de células e calculado de duas maneiras, como descrito em 6.3.2.6. Tanto o crescimento na fase exponencial, quanto na fase estacionária foram avaliados.

É possível observar na tabela 17, os valores calculados para cada uma das fases de crescimento, representados pela média das triplicatas de cada experimento.

Tabela 17: Comparação das taxas de crescimento entre os experimentos.

Experimentos	Dias crescimento exponencial	Crescimento Exponencial	Crescimento Total
E1	15	0,2705	0,2142
E2	15	0,2453	0,1976
E3	10	0,2816	0,1684
E4	5	0,361	0,1329

De acordo com os testes realizados, os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, portanto, utilizou-se a análise de variância (ANOVA one way), seguida de Tukey, para comparação dos resultados. E as diferenças estatísticas são vistas na tabela 18.

Tabela 18: Valores indicativos de diferença estatística (p) na comparação dos grupos (E2 – E4) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem, relativo ao crescimento exponencial e total.

Grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem		
Grupos	Crescimento Exponencial	Crescimento Total
E2	0,4353	0,5424
E3	0,8955	0,0215*
E4	0,0022†	0,0008*

*Os valores de p são significativamente menores quando comparados com E1

† Os valores de p são significativamente maiores quando comparados com E1

A análise estatística dos dados demonstra que os crescimentos nas fases exponenciais, somente o E4 mostrou ser significativamente maior que o controle (E1). Em relação ao crescimento total, observado no final do 20º dia de experimento, observa-se que tanto E3, como E4 foram significativamente

menores que o controle, reforçando os dados dos experimentos mostrados no capítulo anterior, que demonstraram o mesmo comportamento, para os experimentos realizados nas mesmas condições.

Figura 93: Comparação do crescimento em cél/mL entre os experimentos E1 a E4. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A figura 93 mostra a comparação entre o crescimento dos quatro experimentos realizados. Pelos dados estatísticos, pode-se afirmar que o crescimento exponencial foi estatisticamente maior no E4, em relação ao controle ($p < 0,002$) e também a todos os outros experimentos. E2 e E3 não foram diferentes do controle.

O crescimento total foi significativamente menor nos experimentos E3 ($p < 0,02$) e E4 ($p < 0,0008$) em comparação ao controle, sendo E4 marginalmente menor que E3 ($p < 0,07$). Novamente corroboram os dados observados no capítulo anterior.

7.4.7.2 Produção de microcistinas por células

Para possibilitar a comparação entre os experimentos, foi determinada a produção celular de microcistinas (Q_{MC}), como descrito em 6.3.3.2. Foi realizada a análise estatística para todas as variantes de microcistinas quantificadas (MC-RR, MC-LR e MC-YR), como pode ser visto na tabela 19 e no anexo II.

Tabela 19 Valores indicativos de diferença estatística (p) obtidos por meio de teste de ANOVA seguida de Tukey na comparação dos grupos (E2 – E4) com o grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem relativos à produção de toxinas intracelular.

Grupos	Grupo controle (E1) nos diferentes dias de amostragem					
		0	5	10	15	20
E2	Q_{MC-LR}	0,003 [†]	0,981	0,01 [†]	0,015 [†]	0,014 [†]
	Q_{MC-RR}	0,002 [†]	0,786	0,108	0,203	0,108
	Q_{MC-YR}	0,010 [†]	1	0,041 [†]	0,051 [†]	0,044 [†]
	$Q_{MC-Total}$	0,001 [†]	0,988	0,031 [†]	0,065 [†]	0,046 [†]
E3	Q_{MC-LR}	0,118	0,113	0,995	0,870	0,998
	Q_{MC-RR}	0,003 [*]	0,022 [*]	0,985	0,976	0,994
	Q_{MC-YR}	0,924	0,760	0,708	0,939	0,458
	$Q_{MC-Total}$	0,008 [*]	0,052 [*]	0,996	0,953	0,992
E4	Q_{MC-LR}	0,810	0,512	0,739	0,577	0,025 [†]
	Q_{MC-RR}	0,553	0,374	0,431	0,671	0,102
	Q_{MC-YR}	0,978	1	0,212	0,480	0,010 [†]
	$Q_{MC-Total}$	0,638	0,467	0,550	0,618	0,052 [†]

*Os valores de p são significativamente ou marginalmente menores quando comparados com E1

† Os valores de p são significativamente ou marginalmente maiores quando comparados com E1

Valores em vermelho são significativamente diferentes do controle.

Valores em verde são marginalmente diferentes do controle.

No primeiro tempo amostral, o E2 demonstrou ter concentrações de microcistinas intracelulares significativamente maiores que o controle E1, para todas as variantes e consequentemente a somatória delas. Ainda neste tempo, o E3 teve concentrações de Q_{MC-RR} e $Q_{MC-Total}$ significativamente menores que o controle. Este comportamento deste experimento (E3) se repetiu no tempo 5, sendo a concentração de microcistinas totais marginalmente menor que o controle.

No tempo 10, somente o experimento E2 demonstrou concentrações intracelulares de microcistinas superiores ao controle. Novamente este comportamento se repete, sendo no dia 15 marginalmente maior que E1 para

Q_{MC-YR} e $Q_{MC-Total}$ e significativamente maior para Q_{MC-LR} . Esta mesma diferença, para este experimento volta a ser significativamente maior que o controle no último tempo experimental.

No último dia de amostragem destes experimentos, o E4 teve os Q_{MC-LR} , Q_{MC-YR} estatisticamente maiores que o controle e $Q_{MC-Total}$ marginalmente também maior. As diferenças da produção de microcistinas totais intracelulares em todos os experimentos podem ser observadas na figura 94.

Figura 94: Comparação entre os experimentos E1-E4 para o conteúdo intracelular de microcistinas totais ($Q_{MCTotais}$). Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$) ($a=p<0,05$ e $b=p<0,005$).

Figura 95: Comparação da produção intracelular de microcistina entre os experimentos em meio ASM-1. E1 ($[NO_3:PO_4]=10$) e E2 ($[NO_3:PO_4]=100$).

Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$). ($a=p<0,05$ e $b=p<0,005$).

Ao se comparar os experimentos conduzidos em meio ASM-1 em diferentes proporções de nutrientes; E1 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$]; E2 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$], vemos que para a somatória das microcistinas intracelular analisadas, os valores calculados em E2 foram estatisticamente maiores que E1 nos tempos: 0 ($p<0,001$), 10 ($p<0,03$) e 20 ($p<0,04$). E marginalmente maior no tempo 15 ($p<0,06$). Essas diferenças são observadas na figura 95.

Figura 96: Comparação da produção intracelular de microcistina entre os experimentos em meio BG-11 E3 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$] e E4 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$]. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=3$). Erros padrões podem ser observados ($n=3$). ($a=p<0,005$).

Os experimentos conduzidos em meio BG11 em diferentes proporções de nutrientes; E3 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$]; E4 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$] demonstram esta diferença de $Q_{MC\ total}$ somente no tempo 0, onde E4 é significativamente maior que E3 ($p<0,03$). E no tempo 20, onde é marginalmente maior que E4 ($p<0,07$). Como pode ser visto na figura 96.

7.4.7.3 Expressão gênica

Figura 97: Comparação da expressão do *mcyB* em relação ao gene *cpc* em todos os experimentos.

Figura 98: Comparação da expressão do 16S em relação ao gene *cpc* em todos os experimentos

O comportamento da expressão dos genes 16S e *mcyB* em relação ao gene escolhido como controle endógeno *cpc*, não demonstrou uma variação significativa entre os experimentos realizados. Portanto, com os presentes dados não se pode inferir sobre a relação entre as diferenças nas condições nutricionais e produção de toxina e a expressão dos genes analisados. As diferenças entre os valores da quantificação relativa são muito sutis, e não demonstram nenhuma diferença entre os experimentos.

7.5 Discussão

Nos experimentos realizados para a investigação da expressão dos genes da cepa LTPNA 02, de *Microcystis aeruginosa*, também foram monitorados o crescimento e produção de toxina. Novamente observamos diferenças nos crescimentos, tanto durante a fase exponencial, como o crescimento total. E também na produção de toxina.

Os experimentos realizados em meio ASM-1 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$ (E1) e 100 (E2)], não demonstraram nenhuma diferença significativa durante os crescimentos exponencial e total, diferente do referido na literatura, que relaciona excesso de nitrato e aumento no crescimento da *Microcystis sp* (ORR & JONES, 1998; VEZIE *et al.*, 2002). Quando, porém, avaliamos os experimentos em BG11 [$\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$ (E3) e 100 (E4)], vemos que o crescimento durante a fase logarítmica do experimento E3 foi significativamente menor quando comparado ao E4, corroborando os estudos citados. Ao compararmos estes experimentos ao controle (E1), encontramos diferença no crescimento total, sendo que ambos os experimentos em BG-11 cresceram significativamente menos que em ASM-1, sugerindo de alguma forma que o meio ASM-1 promove melhores condições de crescimento ao organismo do que o meio BG-11.

Ao realizar uma comparação dos crescimentos entre os experimentos em BG-11 e controle desta etapa do trabalho com os realizados anteriormente e descritos no capítulo II, encontramos o mesmo comportamento na avaliação do crescimento total. O meio ASM-1 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$), nas condições de controle, demonstra proporcionar melhores condições para o crescimento da cepa avaliada.

Encontramos também algumas diferenças na produção de toxina intracelular. Para o quociente de microcistinas total por células, os experimentos realizados em excesso de nitrato ($\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$) demonstraram maior produção de toxinas ao término do experimento quando comparados ao experimento controle, corroborando as análises apresentadas no capítulo II e também os estudos conduzidos por Lee e colaboradores que encontraram as maiores taxas de produção de microcistinas na mesma proporção de nutrientes (LEE *et al.*, 2000).

Ainda sobre a concentração de microcistina por célula, não observamos diferenças significativas entre os experimentos E1 e E3, após o 10º dia de experimento. O que ressalta a idéia de que a produção de toxinas está intimamente relacionada à oferta de nitrato e também à relação N:P (LEE *et al.*, 2000).

No capítulo anterior, ressaltamos que Vezie e colaboradores encontraram as maiores taxas de produção de toxinas nos experimentos com maiores crescimentos celulares e também nos menores crescimentos, nestes experimentos, o mesmo se aplica ao experimento (E4) realizado em BG11 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$) quando comparado ao controle E1. Pois apesar do crescimento total ter sido menor, a produção de toxina por célula foi maior. Novamente encontramos no trabalho de Chen e colaboradores a provável explicação para o crescimento diminuído. Onde o excesso de nitrato se converte em altas concentrações de nitrito intracelular, afetando significativamente os processos fotossintéticos, pela inibição do transporte de elétrons, mudanças no pH intracelular e dano à membrana celular (CHEN *et al.*, 2009). Por outro lado, o mesmo não foi observado no experimento (E2), realizado em ASM-1 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$). A explicação sugerida por Chen e colaboradores não se aplica, uma vez que não se observa diferença no crescimento em relação ao controle. O que torna contraditória a elucidação do efeito que o excesso de nitrato exerce no crescimento. Porém a produção de toxina por célula neste experimento foi semelhante ao E4, significativamente maior que o controle, tal como o encontrado nos estudos de Orr e colaboradores e Vezie e colaboradores (ORR & JONES, 1998; VEZIE *et al.*, 2002).

As novas técnicas de biologia molecular, como a análise de expressão de genes ainda foram pouco exploradas na investigação dos genes das cianobactérias. Poucos são os trabalhos que trazem novas descobertas nessa área.

Kaebernick e colaboradores estudaram em 2002 o efeito da intensidade luminosa na expressão do conjunto de genes (operon *mcy*) responsável pela síntese de microcistinas. Até então, sabia-se que a intensidade luminosa era o único fator relacionado à expressão destes genes (KAEBERNICK *et al.*, 2002).

Outros estudos que aplicaram a quantificação em tempo real das reações de PCR foram voltados para diferenciar as populações de *Microcystis* sp produtoras e não produtoras de toxinas coexistindo na mesma floração (KURMAYER & KUTZENBERGER, 2003).

Somente em 2008 foi publicado o primeiro trabalho que observou correlação entre o aumento da transcrição de um gene relacionado à biossíntese de microcistinas, o *mcyD* e o aumento da concentração de MC-LR por Sevilla e colaboradores em 2008. Eles avaliaram a expressão deste gene frente a diferentes concentrações de ferro e descobriram que em condições depletadas em ferro há o aumento da expressão do *mcyD* e também da produção de microcistina (SEVILLA *et al.*, 2008).

Este mesmo grupo de pesquisa, em junho de 2010 publicou um estudo do efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio na expressão do gene *mcyD* e produção de toxina por uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (SEVILLA *et al.*, 2010). Os autores não encontraram nenhuma relação significativa entre a expressão do gene e produção de toxina.

Ao tentar comparar os dados encontrados neste trabalho e o de Sevilla e colaboradores em 2008, vemos uma sugestiva tendência de uma leve diminuição na expressão dos genes relacionados à biossíntese da microcistina nos primeiros dias de cultivo. Os autores acompanharam um crescimento de 6 dias e neste período houve a diminuição da expressão do gene *mcyD*. O mesmo foi observado neste trabalho. Nos primeiros 5 dias de cultivo, nós observamos a diminuição da expressão do *mcyB* nos experimentos em ASM-1 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$ e 100) e também em BG11 ($\text{NO}_3:\text{PO}_4=100$). Não observamos essa tendência em BG11($\text{NO}_3:\text{PO}_4=10$).

Outra diferença entre os trabalhos é o controle endógeno utilizado. Os trabalhos de Sevilla e colaboradores e, 2008 e 2010 utilizaram como controle endógeno o gene 16S rRNA e apontaram que a expressão deste gene não é constante, característica requerida para a escolha de um controle endógeno. No trabalho de 2010, além do 16S rRNA utilizaram também o gene *RpoC*, mas também observaram a inconstância na expressão deste (SEVILLA *et al.*, 2010).

Pelo fato de serem poucos os trabalhos publicados, a diferença entre os controles endógenos utilizados e também entre as técnicas utilizadas na

análise de toxinas, fica inviável o confronto dos dados do nosso trabalho com os já publicados.

Poderia ser sugerido a diminuição na expressão dos genes *mcyB* durante a fase logarítmica de crescimento nos experimentos (E1, E2 e E4), bem como o aumento na expressão durante a fase estacionária (para todos os experimentos). Porém não é possível traçar um paralelo com a produção de toxinas.

Vemos ainda que a expressão do gene 16s rRNA demonstra um padrão em todos os experimentos realizados, tendo expressão diminuída na fase logarítmica de crescimento em todos os experimentos, e um padrão de aumento da expressão nos experimentos (N:P = 10) ao final do experimento.

Pelas diferenças das expressões serem muito sutis e não representarem alterações significativas entre os experimentos, nem serem relacionadas com a produção de toxinas, não se pode inferir com propriedade que exista uma relação entre as diferentes concentrações nutricionais impostas à cepa nos diferentes cultivos e a expressão dos genes analisados.

Outros fatores podem ser apontados para a não correlação entre as expressões dos genes escolhidos nos experimentos deste trabalho e a produção de microcistinas. São elas: (i) possível falha na decisão da escolha do controle endógeno, (ii) presumíveis variações das sequências do gene *mcyB*, entre cepas do hemisfério norte com seus genomas publicados e a cepa isolada neste trabalho e (iii) amplificação tardia do gene alvo *mcyB*. No entanto, todos os protocolos foram seguidos de acordo com o que é sugerido na literatura e sabemos que são muitos os fatores que influenciam a biossíntese de microcistinas e a expressão gênica e que nem todos foram considerados neste estudo.

8. CONCLUSÕES

A produção de microcistinas é determinada geneticamente. Os fatores ambientais somente possuem efeito indireto na produção desses compostos.

A produção de toxinas está intimamente relacionada ao ciclo celular, porém não é determinada por ele.

Pode-se, portanto, afirmar que este estudo revela que diferentes concentrações de nitrato exercem um efeito significativo sobre o crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 02) avaliada, bem como a produção de microcistinas.

A análise da influência da razão $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ *per se* não é suficiente para explicar as diferenças no crescimento e produção de toxinas. Esses nutrientes não são os únicos responsáveis pelas alterações desses parâmetros, mesmo em ambiente controlado quanto à luz, temperatura e período de irradiância. Outros elementos estão relacionados às alterações observadas, como por exemplo, a composição dos meios de cultura.

Preliminarmente, o comportamento da expressão do gene *mcyB* não se altera significativamente frente a diferentes condições nutricionais impostas à cepa estudada.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AME, M. V., DIAZ, M. D. e WUNDERLIN, D. A. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina): A field and chemometric study. **Environmental Toxicology**, v.18, n.3, p.192-201. 2003.

AME, M. V. e WUNDERLIN, D. A. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. **Water Air and Soil Pollution**, v.168, n.1-4, p.235-248. 2005.

AZEVEDO, M. T. D. e SANT'ANNA, C. L. Morfologia e reprodução. In: SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. D., *et al* (Ed.). **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias de águas continentais Brasileiras**. 1.ed. Rio de Janeiro: Intersciência, 2006.

AZEVEDO, M. T. D. e VASCONCELOS, V. M. Toxinas de Cianobactérias: causas e consequências para a Saúde Pública. In: ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**. 1.ed. São Carlos: Rima, 2006.

BIANCHI, T. S., ENGELHAUPT, E., WESTMAN, P., ANDREN, T., ROLFF, C. e ELMGREN, R. Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: Natural or human-induced? **Limnology and Oceanography**, v.45, n.3, p.716-726. 2000.

BÍBLIA. Exodus. São Paulo: Paulus. 7: 20 2002.

BISCHOFF, K. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. **Veterinary and Human Toxicology**, v.43, n.5, p.3. 2001.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, v.2, n.1, p.51-60. 2003.

BOLCH, C. J. S. e BLACKBURN, S. I. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutz. **Journal of Applied Phycology**, v.8, n.1, p.5-13. 1996.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. MS 2004.

CAMPOS, A. e VASCONCELOS, V. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.1, p.268-287. 2010.

CARMICHAEL, W. W. CYANOBACTERIA SECONDARY METABOLITES - THE CYANOTOXINS. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, n.6, p.445-459. 1992.

CARMICHAEL, W. W., AZEVEDO, S., AN, J. S., MOLICA, R. J. R., JOCHIMSEN, E. M., LAU, S., RINEHART, K. L., SHAW, G. R. e EAGLESHAM, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.7, p.663-668. 2001.

CARMICHAEL, W. W., BEASLEY, V., BUNNER, D. L., ELOFF, J. N., FALCONER, I., GORHAM, P., HARADA, K., KRISHNAMURTHY, T., JUAN, W. Y., MOORE, R. E., RINEHART, K., RUNNEGAR, M., SKULBERG, O. M. e WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v.26, n.11, p.3. 1988.

CHEN, W. M., ZHANG, Q. M. e DAI, S. G. Effects of nitrate on intracellular nitrite and growth of *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v.21, n.6, p.701-706. 2009.

CHORUS, I. e BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water - a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3 ed.: Publisher on behalf of WHO - World Health Organization. 1998

DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v.36, n.7, p.953-962. 1998.

DITTMANN, E. e WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins--occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Mol Nutr Food Res**, v.50, n.1, p.7-17. 2006.

DOMINGOS, P., RUBIM, T. K., MOLICA, R., AZEVEDO, S. M. F. O. e CARMICHAEL, W. W. First report of microcystis production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from northeast Brazilian drinking water supply. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p.4. 1999.

DORR, F. A., RODRIGUEZ, 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. 2010.

DOS ANJOS, F. M., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D., ZAJAC, M. P., HILLER, S., CHRISTIAN, B., ERLER, K., LUCKAS, B. e PINTO, E. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, v.48, n.3, p.239-245. 2006.

DOWNING, T. G., SEMBER, C. S., GEHRINGER, M. M. e LEUKES, W. Medium N : P ratios and specific growth rate comodulate microcystin and protein content in

Microcystis aeruginosa PCC7806 and M-Aeruginosa UV027. **Microbial Ecology**, v.49, n.3, p.468-473. 2005.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. e FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.2, p.88-8. 1961.

ERNST, A., DEICHER, M., HERMAN, P. M. J. e WOLLENZIEN, U. I. A. Nitrate and phosphate affect cultivability of cyanobacteria from environments with low nutrient levels. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.3379-3383. 2005.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos da Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 1998

FERRIS, M. J. e HIRSCH, C. F. Method for isolation and purification of cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.5, p.1448-1452. 1991.

FRANCIS, G. Poisonous Australian Lake. **Nature**, v.18, p.2. 1878.

FRIAS, H. V., MENDES, M. A., CARDOZO, K. H. M., CARVALHO, V. M., TOMAZELA, D., COLEPICOLO, P. e PINTO, E. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.344, n.3, p.741-746. 2006.

FUREY, A., ALLIS, O., ORTEA, P. M., LEHANE, M. e JAMES, K. J. Hepatotoxins: context and chemical determination. In: BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and freshwater toxins**. 2.ed.: CRC Press, 2008.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T. e KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lynbg). **International Association of Theoretical and Applied Limnology**, v.15, p.8. 1964.

GUGGER, M., MOLICA, R., LE BERRE, B., DUFOUR, P., BERNARD, C. e HUMBERT, J. F. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.1097-1100. 2005.

HARADA, K., MATSUURA, K., SUZUKI, M., WATANABE, M. F., OISHI, S., DAHLEM, A. M., BEASLEY, V. R. e CARMICHAEL, W. W. Isolation and Characterization of the Minor Components Associated with Microcystins Lr and Rr in the Cyanobacterium (Blue-Green-Algae). **Toxicon**, v.28, n.1, p.55-64. 1990.

HAWKING, P. R., NOVIC, S., COX, P., NEILLAN, B. A., BURNS, B. P., SHAW, G., WICKRAMASINGUE, W., PEERAPORNPIAL, Y., RUANGYUTTIKARN, W., ITAYAMA, T., SAITOU, T., MIZOUCHI, M. e INAMORI, Y. A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environmental. **Jounarl of Water Supply: Research Technology**, v.182, n.2, p.14. 2005.

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

HILLER, S., KROCK, B., CEMBELLA, A. e LUCKAS, B. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.42, p.1238-1250. 2007.

HORRIGAN, L., LAWRENCE, R. S. e WALKER, P. How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. **Environmental Health Perspectives**, v.110, n.5, p.445-456. 2002.

HOTTO, A. M., SATCHWELL, M. F. e BOYER, G. L. Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in lake Ontario embayments and nearshore waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.14, p.4570-4578. 2007.

HUTCHINSON, C. R. Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: Falling together by coming apart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.6, p.3010-3012. 2003.

JANSE, I., KARDINAAL, W. E. A., MEIMA, M., FASTNER, J., VISSER, P. M. e ZWART, G. Toxic and nontoxic microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.3979-3987. 2004.

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

KAEBERNICK, M., DITTMANN, E., BORNER, T. e NEILAN, B. A. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.449-455. 2002.

KAEBERNICK, M. e NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **Fems Microbiology Ecology**, v.35, n.1, p.1-9. 2001.

KAEBERNICK, M., NEILAN, B. A., BORNER, T. e DITTMANN, E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3387-3392. 2000.

KANEKO, T., NAKAJIMA, N., OKAMOTO, S., SUZUKI, I., TANABE, Y., TAMAOKI, M., NAKAMURA, Y., KASAI, F., WATANABE, A., KAWASHIMA, K., KISHIDA, Y., ONO, A., SHIMIZU, Y., TAKAHASHI, C., MINAMI, C., FUJISHIRO, T., KOHARA, M., KATOH, M., NAKAZAKI, N., NAKAYAMA, S., YAMADA, M., TABATAI, S. e WATANABE, M. M. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA Research**, v.14, n.6, p.247-256. 2007.

KAYA, K., SANO, T., INOUE, H. e TAKAGI, H. Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS. **Analytica Chimica Acta**, v.450, n.1-2, p.73-80. 2001.

KRUEGER, T., MÖNCH, B., OPPENHÄUSER, S. e LUCKAS, B. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB(2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. **Toxicon**, v.in press. 2009.

KUJBIDA, P., HATANAKA, E., CAMPA, A., COLEPICCOLO, P. e PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.341, n.1, p.273-277. 2006.

KUJBIDA, P., RODRIGUEZ, V. C. S. e PINTO, E. Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.225-240.

KURMAYER, R. e KUTZENBERGER, T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6723-6730. 2003.

LEE, S. J., JANG, M. H., KIM, H. S., YOON, B. D. e OH, H. M. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N : P ratio and growth stage. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, n.2, p.323-329. 2000.

LOURENÇO, S. D. Isolamento de microalgas, purificação e medidas de crescimento. In: LOURENÇO, S. D. (Ed.). **Cultivo de microalgas marinhas - Princípios e aplicações** 1.ed. São Carlos: Rima, 2007.

LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture

experiment with *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**, v.26, n.7, p.727-736. 2004.

MACKINTOSH, R. W., DALBY, K. N., CAMPBELL, D. G., COHEN, P. T. W., COHEN, P. e MACKINTOSH, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Letters**, v.371, n.3, p.236-240. 1995.

MAHMOOD, N. A. e CARMICHAEL, W. W. The phamacology of anatoxin-a(S), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC525-17. **Toxicon**, v.24, n.5, p.10. 1985.

MARINHO, M. M. e AZEVEDO, S. M. F. D. O. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. **Aquatic Ecology**, v.41, p.525-533. 2007.

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

MSAGATI, T. A. M., SIAME, B. A. e SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v.78, n.4, p.382-397. 2006.

NCBI. National Center for Biotechnology Information
1999.

NICHOLS, H. W. e BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen et sp nov. **Journal of Phycology**, v.1, n.1, p.34-&. 1965.

NORTON, S. A. e LYONS, C. Blister beetles and the ten plagues. **Lancet**, v.359, n.9321, p.1950-1950. 2002.

ORR, P. T. e JONES, G. J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. **Limnology and Oceanography**, v.43, n.7, p.1604-1614. 1998.

POURIA, S., DE ANDRADE, A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R. L., BARRETO, V. T. S., WARD, C. J., PREISER, W., POON, G. K., NEILD, G. H. e CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v.352, n.9121, p.21-26. 1998.

RAPALA, J., SIVONEN, K., LYRA, C. e NIEMELA, S. I. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.6, p.2206-2212. 1997.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Phytoplankton**. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2006

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. e STANIER, R. Y. GENERIC ASSIGNMENTS, STRAIN HISTORIES AND PROPERTIES OF PURE CULTURES OF CYANOBACTERIA. **Journal of General Microbiology**, v.111, n.MAR, p.1-61. 1979.

RIVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Belo Horizonte: Artmed. 2006

SANT'ANNA, C. L., MELCHER, S. S., CARVALHO, M. C., GAMELGO, M. C. P. e AZEVEDO, M. T. Planktic cyanobacteria from upper Tietê Basin reservoirs, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, p.14. 2007.

SEVILLA, E., MARTIN-LUNA, B., VELA, L., BES, M. T., FILLAT, M. F. e PELEATO, M. L. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Environmental Microbiology**, v.10, n.10, p.2476-2483. 2008.

SEVILLA, E., MARTIN-LUNA, B., VELA, L., BES, M. T., PELEATO, M. L. e FILLAT, M. F. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the mcyD gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Ecotoxicology**, v.19, n.7, p.1167-1173. 2010.

SHIRAI, M., MATUMARU, K., OHOTAKE, A., TAKAMURA, Y., AIDA, T. e NAKANO, M. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.10, p.2569-2571. 1989.

SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth of hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.9, p.8. 1990.

_____. Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, v.35, n.6, p.6. 2006.

SMITH, V. H., TILMAN, G. D. e NEKOLA, J. C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, v.100, n.1-3, p.179-196. 1999.

TEIXEIRA, M. G. L. C., COSTA, M. C. N., CARVALHO, V. L. P., PEREIRA, M. S. P. e HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v.27, n.3, p.9. 1993.

TILLET, D., DITTMANN, E., ERHARD, M., VON DOHREN, H., BORNER, T. e NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis*

aeruginosa PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, v.7, n.10, p.753-764. 2000.

URMENETA, J., NAVARRETE, A., HUETE, J. e GUERRERO, R. Isolation and characterization of cyanobacteria from microbial mats of the Ebro Delta, Spain. **Current Microbiology**, v.46, n.3, p.199-204. 2003.

VALER, R. M. e GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.11, n.2, p.7. 1999.

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

VEZIE, C., RAPALA, J., VAITOMAA, J., SEITSONEN, J. e SIVONEN, K. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. **Microbial Ecology**, v.43, n.4, p.443-454. 2002.

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

WETZEL, R. G. **In Limnologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1993

WIDDEL, F. Theory and measurement of bacterial growth. **Grundpraktikum Mikrobiologie**. Bremen: Universität Bremen. 4 2007.

WIEDNER, C., VISSER, P. M., FASTNER, J., METCALF, J. S., CODD, G. A. e MUR, L. R. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1475-1481. 2003.

WITT, H. T. Steps on the way to building blocks, topologies, crystals and X-ray structural analysis of Photosystems I and II of water-oxidizing photosynthesis. **Photosynthesis Research**, v.80, n.1-3, p.86-107. 2004.

WOREK, F., MAST, U., KIDERLEN, D. e DIEPOLD, P. E. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v.288, p.17. 1999.

ANEXO 1

DADOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR LC-MS QTRAP

Curva de calibração e controles de qualidade referentes às análises de LC/MS Q trap do Capítulo II.

Capítulo II

- Curvas de Calibração

Tabela 1: Curva de calibração MC-LR

MC-LR (Coef. Correl.: 0.9984)			
Quant. Nominal (pg)	Quant. Experimental (pg)	Exatidão %	Nominal ng/mL
25	24,9	99,7	1,25
250	256	102	12,5
500	487	97,3	25
1000	1100	110	50
2000	2010	100	100
3000	2860	95,5	150
3500	3300	94,3	175
Linear (Ponderada $1/x^2$)		$Y = aX + b$	
Equação:		$Y = 17.1X + 111$	
Amplitude da CC (Inj. 20 μ L):		1.25 - 175 ng/mL	

Tabela 2: Curva de calibração MC-RR.

MC-RR (Coef. Correl.: 0.9966)			
Quant. Nominal (pg)	Quant. Experimental (pg)	Exatidão %	Nominal ng/mL
5	4,98	99,6	0,250
25	28,6	114	1,25
25	23,1	92,3	1,25
50	51	102	2,5
50	44	88	2,5
250	254	102	12,5
500	508	102	25
500	549	110	25
1000	981	98,1	50
2000	2120	106	100
2000	1850	92,3	100
3000	3000	100	150
3500	3720	106	175
3500	3080	88,1	175
Linear (Ponderada $1/x^2$)		$Y = aX + b$	
Equação:		$Y = 58.0X + 103$	
Amplitude da CC (Inj. 20 μ L):		0.25 - 175 ng/mL	

Tabela 3: Curva de calibração MC-YR.

MC-YR (Coef. Correl.: 0.9969)			
Quant. Nominal (pg)	Quant. Experimental (pg)	Exatidão %	Nominal ng/mL
5	4,9	98	0,250
25	27,7	111	1,25
50	53	106	2,50
50	45	89,9	2,50
250	272	109	12,5
250	253	101	12,5
500	559	112	25,0
500	504	101	25,0
1000	1000	100	50,0
1000	854	85,4	50,0
2000	2090	104	100
2000	1880	94,2	100
3000	2980	99,2	150
3000	2820	93,9	150
3500	3650	104	175
3500	3190	91,2	175
Linear (Ponderada $1/x^2$)		$Y = aX + b$	
Equação:		$Y = 15.9X + 30.3$	
Amplitude da CC (Inj. 20 uL):		0.25 - 175 ng/mL	

- Dados dos controles de qualidade:

Quantidade "on column": 1000 pg
 Volume de Injeção: 20 uL
 Concentração Nominal: 50 ng/mL

Tabela 4: Controles de qualidade MC-LR

MC-LR							
Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %	Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %
*1569	156,9	*78.5	157,0	977	97,7	48,9	97,7
998	99,8	49,9	99,8	873	87,3	43,7	87,3
1090	109,0	54,5	109,0	1067	106,7	53,3	106,7
948	94,8	47,4	94,8	1067	106,7	53,3	106,7
952	95,2	47,6	95,2	1065	106,5	53,2	106,5
1008	100,8	50,4	100,8	1067	106,7	53,3	106,7
1096	109,6	54,8	109,6	900	90,0	45,0	90,0
890	89,0	44,5	89,0	1002	100,2	50,1	100,2

Coeficiente de variação % : 7,5

Tabela 5: Controles de qualidade MC-RR

MC-LR							
Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %	Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %
995	99,5	49,7	99,5	988	98,8	49,4	98,8
1019	101,9	51,0	101,9	1001	100,1	50,0	100,1
946	94,6	47,3	94,6	1044	104,4	52,2	104,4
952	95,2	47,6	95,2	1068	106,8	53,4	106,8
982	98,2	49,1	98,2	1007	100,7	50,3	100,7
964	96,4	48,2	96,4	1031	103,1	51,6	103,1
970	97,0	48,5	97,0	1062	106,2	53,1	106,2
995	99,5	49,7	99,5	976	97,6	48,8	97,6
Coeficiente de variação %: 3,7							

Tabela 6: Controles de qualidade MC-YR

MC-LR							
Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %	Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %
*1319	131,9	*66,0	132,0	943	94,3	47,1	94,3
1033	103,3	51,7	103,3	956	95,6	47,8	95,6
1002	100,2	50,1	100,2	989	98,9	49,5	98,9
982	98,2	49,1	98,2	1027	102,7	51,4	102,7
1050	105,0	52,5	105,0	947	94,7	47,4	94,7
922	92,2	46,1	92,2	1011	101,1	50,6	101,1
1042	104,2	52,1	104,2	1069	106,9	53,4	106,9
1019	101,9	51,0	101,9	1008	100,8	50,4	100,8
Coeficiente de variação %: 3,7							

Capítulo III

- Curvas de Calibração

Tabela 7: Curva de calibração MC-LR

MC-LR (Coef. Correl.: 0.9983)	
Parâmetro de Análise:	Q1/Q3 íons: 995.50/135.30 Da (área)
Linear (Ponderada $1/x^2$)	$Y = aX + b$
Equação:	$Y = 17.7X - 11.9$
Amplitude da CC ("on column"):	15 - 4000 pg
Amplitude da CC (Inj. 20 µL):	0.75 - 200 ng/mL

Tabela 8: Curva de calibração MC-RR

MC-RR (Coef. Correl.: 0.9990)	
Parâmetro de Análise:	Q1/Q3 íons: 519.90/135.30 Da (área)
Linear (Ponderada $1/x^2$)	$Y = aX + b$
Equação:	$Y = 62.4X + 68.4$
Amplitude da CC ("on column"):	15 - 4000 pg
Amplitude da CC (Inj. 20 µL):	0.75 - 200 ng/mL

Tabela 9: Curva de calibração MC-YR

MC-YR (Coef. Correl.: 0.9978)	
Parâmetro de Análise:	Q1/Q3 íons: 1045.50/135.30 Da (área)
Linear (Ponderada $1/x^2$)	$Y = aX + b$
Equação:	$Y = 15.3X + 0.158$
Amplitude da CC ("on column"):	15 - 4000 pg
Amplitude da CC (Inj. 20 µL):	0.75 - 200 ng/mL

- Dados dos controles de qualidade:

Quantidade "on column": 250 pg
 Volume de Injeção: 5 µL
 Concentração Nominal: 50 ng/mL

Tabela 10: Controles de qualidade MC-LR

MC-LR			
Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %
0.00*	0,0	0.0*	0,0
217	86,8	43,4	86,8
210	84,0	42,0	84,0
241	96,3	48,2	96,4
240	96,0	48,0	96,0
236	94,2	47,2	94,4
242	96,7	48,4	96,8
246	98,3	49,2	98,4
Média (ng/mL)		46,6	
Exatidão %:		93,3	
Coeficiente de Variação %:		6,0	
Controles Aprovados %:		87,5	

Tabela 11: Controles de qualidade MC-RR

MC-RR			
Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %
2.66*	1,1	0.53*	1,1
241	96,6	48,2	96,4
220	87,9	44,0	88,0
239	95,8	47,8	95,6
242	96,8	48,4	96,8
246	98,4	49,2	98,4
217	86,9	43,4	86,8
241	96,4	48,2	96,4
Média (ng/mL)		47,0	
Exatidão %:		94,1	
Coeficiente de Variação %:		4,9	
Controles Aprovados %:		87,5	

Tabela 12: Controles de qualidade MC-YR

MC-YR			
Quant. Exp. (pg)	Exatidão %	Conc. Exp. (ng/mL)	Exatidão %
0.00*	0,0	0.0*	0,0
222	88,9	44,4	88,8
203*	81,3	40.6*	81,2
228	91,2	45,6	91,2
241	96,4	48,2	96,4
231	92,3	46,2	92,4
245	98,0	49,0	98,0
247	98,9	49,4	98,8
Média (ng/mL)		47,1	
Exatidão %:		94,3	
Coeficiente de Variação %:		4,3	
Controles Aprovados %:		75,0	

ANEXO 2 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS

CRESCIMENTO TOTAL E EXPONENCIAL

Capítulo II

Tabela 1. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E7, **Crescimento-Total e Exponencial**

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (Crescimento exp e total) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Cresc. Exponencial	0,000170	6	0,000028	0,002210	14	0,000158	0,179550	0,977909
Cresc. Total	0,000059	6	0,000010	0,000213	14	0,000015	0,652695	0,688103

Tabela 2. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (Crescimento exp e total) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Cresc. Exponencial	0,046979	6	0,007830	0,003863	14	0,000276	28,3782	0,000000
Cresc. Total	0,049180	6	0,008197	0,000360	14	0,000026	318,6571	0,000000

Tabela 3. Teste de Tukey para **crescimento exponencial**, mostrando as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os grupos

Grupos (MC)	Tukey HSD test; Variable: Cresc. Exponencial (Crescimento exp e total) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=,2126	{2} M=,1599	{3} M=,2029	{4} M=,2473	{5} M=,1882	{6} M=,1659	{7} M=,3064
E1 {1}		0,021362	0,989507	0,210153	0,567523	0,047592	0,000259
E2 {2}	0,021362		0,076276	0,000378	0,409549	0,999212	0,000174
E3 {3}	0,989507	0,076276		0,064244	0,921469	0,160972	0,000196
E4 {4}	0,210153	0,000378	0,064244		0,009058	0,000628	0,009139
E5 {5}	0,567523	0,409549	0,921469	0,009058		0,660686	0,000177
E6 {6}	0,047592	0,999212	0,160972	0,000628	0,660686		0,000174
E7 {7}	0,000259	0,000174	0,000196	0,009139	0,000177	0,000174	

Tabela 4. Teste de Tukey para **crescimento total**, mostrando as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os grupos

Grupos (MC)	Tukey HSD test; Variable: Cresc. Total (Crescimento exp e total) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=,1661	{2} M=,0425	{3} M=,1731	{4} M=,1588	{5} M=,0979	{6} M=,0682	{7} M=,1483
E1 {1}		0,000174	0,637112	0,585380	0,000174	0,000174	0,010313
E2 {2}	0,000174		0,000174	0,000174	0,000174	0,000493	0,000174
E3 {3}	0,637112	0,000174		0,046761	0,000174	0,000174	0,000654
E4 {4}	0,585380	0,000174	0,046761		0,000174	0,000174	0,223897
E5 {5}	0,000174	0,000174	0,000174	0,000174		0,000227	0,000174
E6 {6}	0,000174	0,000493	0,000174	0,000174	0,000227		0,000174
E7 {7}	0,010313	0,000174	0,000654	0,223897	0,000174	0,000174	

Capítulo III

Tabela 5. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E4, **Crescimento-Total e Exponencial**

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (Crescimento exp e total E1-E4) Marked effects are significant at p < ,05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Cresc. Exponencial	0,000493	3	0,000164	0,001644	8	0,000206	0,799376	0,528155
Cresc. Total	0,000298	3	0,000099	0,001310	8	0,000164	0,606372	0,629222

Tabela 6. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (Crescimento exp e total) Marked effects are significant at p < ,05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Cresc. Exponencial	0,046979	6	0,007830	0,003863	14	0,000276	28,3782	0,000000
Cresc. Total	0,049180	6	0,008197	0,000360	14	0,000026	318,6571	0,000000

Tabela 7. Teste de Tukey para **crescimento exponencial**, mostrando as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os grupos

Grupos (MC)	Tukey HSD test; Variable: Cresc. Exponencial (Crescimento exp e total E1-E4) Marked differences are significant at p < ,05000			
	{1} M=,2705	{2} M=,2452	{3} M=,2815	{4} M=,3609
E1 {1}		0,435338	0,895544	0,002192
E2 {2}	0,435338		0,180603	0,000570
E3 {3}	0,895544	0,180603		0,004764
E4 {4}	0,002192	0,000570	0,004764	

Tabela 8. Teste de Tukey para **crescimento total**, mostrando as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os grupos

Grupos (MC)	Tukey HSD test; Variable: Cresc. Total (Crescimento exp e total E1-E4) Marked differences are significant at p < ,05000			
	{1} M=,2142	{2} M=,1976	{3} M=,1684	{4} M=,1329
E1 {1}		0,542422	0,021508	0,000817
E2 {2}	0,542422		0,147807	0,003048
E3 {3}	0,021508	0,147807		0,070782
E4 {4}	0,000817	0,003048	0,070782	

QUOCIENTE DE MICROCISTINA TOTAL INTRACELULAR

CAPÍTULO II

Tabela 9. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E7, **MC-LR** dias 0-21.

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC LR) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	8,3435	6	1,39058	38,2242	14	2,73030	0,509313	0,791597
Dia 3	13,3651	6	2,22752	42,3474	14	3,02481	0,736416	0,628984
Dia 6	4,3657	6	0,72762	16,6923	14	1,19231	0,610261	0,718692
Dia 9	39,3813	6	6,56355	70,2977	14	5,02126	1,307153	0,316521
Dia 12	10,8303	6	1,80506	31,0623	14	2,21874	0,813551	0,576790
Dia 15	104,6485	6	17,44141	303,3408	14	21,66720	0,804968	0,582468
Dia 18	146,7736	6	24,46226	392,4779	14	28,03414	0,872588	0,538714
Dia 21	52,7504	6	8,79174	145,7015	14	10,40725	0,844770	0,556438

Tabela 10. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC LR) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	3204,575	6	534,0958	43,3103	14	3,09359	172,6460	0,000000
Dia 3	405,790	6	67,6317	61,5834	14	4,39881	15,3750	0,000019
Dia 6	362,323	6	60,3871	27,5044	14	1,96460	30,7377	0,000000
Dia 9	458,499	6	76,4165	149,9006	14	10,70719	7,1369	0,001222
Dia 12	528,132	6	88,0220	60,5527	14	4,32520	20,3510	0,000004
Dia 15	899,977	6	149,9961	356,9082	14	25,49344	5,8837	0,003032
Dia 18	2400,518	6	400,0863	472,6783	14	33,76274	11,8499	0,000086
Dia 21	3174,835	6	529,1392	213,3899	14	15,24213	34,7156	0,000000

Tabela 11-18. Teste de Tukey para as médias dos grupos E1-E7 (MC-LR), mostrando as diferenças estatisticamente significativas encontradas.

Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 3 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=1,059	M=1,843	M=0,000	M=18,80	M=0,000	M=33,48	M=19,80	E1 {1}	M=11,83	M=1,829	M=4,294	M=3,053	M=0,000	M=12,08	M=6,332
E2 {2}	0,997500		0,987462	0,000174	0,987462	0,000174	0,000174	E2 {2}	0,000778		0,773234	0,989361	0,927617	0,000640	0,188857
E3 {3}	0,987462	0,848592		0,000174	1,000000	0,000174	0,000174	E3 {3}	0,008402	0,773234		0,988574	0,227988	0,006474	0,886651
E4 {4}	0,000174	0,000174	0,000174		0,000174	0,000174	0,990906	E4 {4}	0,002377	0,989361	0,988574		0,573399	0,001864	0,502357
E5 {5}	0,987462	0,848592	1,000000	0,000174		0,000174	0,000174	E5 {5}	0,000260	0,927617	0,227988	0,578399		0,000240	0,030126
E6 {6}	0,000174	0,000174	0,000174	0,000174	0,000174		0,000175	E6 {6}	0,999999	0,000640	0,006474	0,001864	0,000240		0,055214
E7 {7}	0,000174	0,000174	0,000174	0,990906	0,000174	0,000175		E7 {7}	0,071353	0,188867	0,886651	0,502357	0,030126	0,055214	
Tukey HSD test; Variable: Dia 6 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 9 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=15,15	M=7,829	M=7,965	M=5,609	M=0,000	M=8,881	M=7,158	E1 {1}	M=14,76	M=7,543	M=13,78	M=8,774	M=0,000	M=12,86	M=8,583
E2 {2}	0,000396		1,000000	0,488553	0,000277	0,963132	0,996268	E2 {2}	0,168492		0,292921	0,999041	0,138359	0,460114	0,999631
E3 {3}	0,000453	1,000000		0,424071	0,000252	0,981129	0,990026	E3 {3}	0,999744	0,292921		0,524477	0,002257	0,999815	0,484247
E4 {4}	0,000180	0,488553	0,424071		0,003493	0,130569	0,316643	E4 {4}	0,334421	0,999041	0,524477		0,063081	0,723820	1,000000
E5 {5}	0,000174	0,000277	0,000252	0,003493		0,000192	0,737599	E5 {5}	0,001254	0,138359	0,002257	0,063081		0,004058	0,071478
E6 {6}	0,001341	0,963132	0,981129	0,130569	0,000192		0,737599	E6 {6}	0,989668	0,460114	0,999815	0,723820	0,004058		0,683514
E7 {7}	0,000249	0,996268	0,990026	0,816643	0,000467	0,737599		E7 {7}	0,303010	0,999631	0,484247	1,000000	0,071478	0,683514	
Tukey HSD test; Variable: Dia 12 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=9,143	M=6,282	M=11,59	M=8,546	M=0,000	M=17,98	M=8,591	E1 {1}	M=9,138	M=4,450	M=11,60	M=7,473	M=0,000	M=22,75	M=8,711
E2 {2}		0,635387	0,772000	0,999795	0,001560	0,002093	0,999869	E2 {2}		0,905847	0,995869	0,999546	0,345856	0,060958	1,000000
E3 {3}	0,635387		0,082941	0,825679	0,030948	0,000263	0,813205	E3 {3}	0,905847		0,606367	0,987845	0,924283	0,007871	0,937253
E4 {4}	0,772000	0,082941		0,572404	0,000280	0,026822	0,587659	E4 {4}	0,995869	0,606367		0,945404	0,140434	0,167499	0,990343
E5 {5}	0,999795	0,825679	0,572404		0,002789	0,001198	1,000000	E5 {5}	0,999546	0,987845	0,945404		0,560944	0,029624	0,999918
E6 {6}	0,001560	0,030048	0,000280	0,002789		0,000174	0,002669	E6 {6}	0,345856	0,924283	0,140434	0,560944		0,001264	0,386081
E7 {7}	0,002093	0,000263	0,026822	0,001198	0,000174		0,001247	E7 {7}	0,060958	0,007871	0,167499	0,029624	0,001264		0,050751
E7 {7}	0,999869	0,813205	0,587659	1,000000	0,002669	0,001247			1,000000	0,937253	0,990343	0,999918	0,396081	0,050751	
Tukey HSD test; Variable: Dia 18 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 21 (MC LR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=4,915	M=3,988	M=21,68	M=9,535	M=0,000	M=33,02	M=11,66	E1 {1}	M=2,883	M=3,729	M=16,13	M=7,503	M=0,000	M=38,95	M=11,21
E2 {2}		0,999993	0,040390	0,951904	0,936515	0,000698	0,782267	E2 {2}		0,999960	0,013137	0,767866	0,965837	0,000174	0,153452
E3 {3}	0,999993		0,026413	0,894617	0,975920	0,000545	0,674908	E3 {3}	0,999960		0,021244	0,889143	0,894225	0,000174	0,287865
E4 {4}	0,040390	0,026413		0,210005	0,006238	0,271796	0,395960	E4 {4}	0,013137	0,021244		0,167075	0,002661	0,000228	0,717353
E5 {5}	0,951904	0,894617	0,210005		0,450050	0,003215	0,999179	E5 {5}	0,767866	0,889143	0,167075		0,285744	0,000174	0,896101
E6 {6}	0,936515	0,975920	0,006238	0,450050		0,000253	0,245577	E6 {6}	0,965837	0,894225	0,002661	0,285744		0,000174	0,041588
E7 {7}	0,000698	0,000545	0,271796	0,003215	0,000253		0,007054	E7 {7}	0,000174	0,000174	0,000228	0,000174	0,000174		0,000177
E7 {7}	0,782267	0,674908	0,395960	0,999179	0,245577	0,007054			0,193452	0,287865	0,717353	0,896101	0,041588	0,000177	

Tabela 19. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E7, MC-RR, dias 0-21.

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC RR)							
	Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	46,3424	6	7,72374	87,3825	14	6,24161	1,237459	0,345353
Dia 3	41,3478	6	6,89130	99,3468	14	7,09620	0,971126	0,479244
Dia 6	6,4845	6	1,08076	30,6751	14	2,19108	0,493254	0,803030
Dia 9	59,0400	6	9,84000	166,9989	14	11,92849	0,824916	0,569326
Dia 12	29,5745	6	4,92909	100,2767	14	7,16262	0,688168	0,662802
Dia 15	173,5022	6	28,91703	541,3623	14	38,66874	0,747814	0,621115
Dia 18	187,8220	6	31,30367	597,6583	14	42,68988	0,733281	0,631157
Dia 21	88,5159	6	14,75265	335,8009	14	23,98578	0,615058	0,715221

Tabela 20. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC RR)							
	Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	9846,258	6	1641,043	200,4472	14	14,31766	114,6167	0,000000
Dia 3	632,462	6	105,410	163,9651	14	11,71180	9,0004	0,000380
Dia 6	605,066	6	100,844	46,6478	14	3,33199	30,2655	0,000000
Dia 9	967,462	6	161,244	234,3869	14	16,74192	9,6311	0,000266
Dia 12	887,357	6	147,893	202,9654	14	14,49753	10,2012	0,000196
Dia 15	1066,174	6	177,696	631,7037	14	45,12169	3,9381	0,016220
Dia 18	2973,038	6	495,506	647,2967	14	46,23548	10,7170	0,000150
Dia 21	3943,887	6	657,314	395,1117	14	28,22227	23,2906	0,000002

Tabelas 21-28. Teste de Tukey para as médias dos grupos E1-E7 (MC-RR) dias 0-21. Mostram as diferenças estatisticamente significativas encontradas.

Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 3 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=10,80	M=5,691	M=1,100	M=29,58	M=0,000	M=57,96	M=46,89	E1 {1}	M=16,16	M=4,312	M=3,180	M=5,208	M=0,000	M=15,05	M=11,41
E2 {2}		0,65295	0,080934	0,000573	0,043208	0,000174	0,000174	E2 {2}		0,011273	0,130899	0,020136	0,000849	0,999585	0,627225
E3 {3}		0,862995	0,748428	0,000192	0,543938	0,000174	0,000174	E3 {3}		0,011273	0,801311	0,999880	0,716852	0,023136	0,216287
E4 {4}		0,080934	0,748428	0,000175	0,999778	0,000174	0,000174	E4 {4}		0,130899	0,801311	0,928939	0,928939	0,116440	0,244882
E5 {5}		0,000573	0,000192	0,000175	0,000175	0,000175	0,001107	E5 {5}		0,020136	0,999880	0,928939	0,531456	0,041248	0,343557
E6 {6}		0,043208	0,543938	0,999778	0,000175	0,000174	0,000174	E6 {6}		0,000849	0,716852	0,116440	0,531456	0,001554	0,014948
E7 {7}		0,000174	0,000174	0,000174	0,000175	0,000174	0,036994	E7 {7}		0,999535	0,023136	0,244882	0,041248	0,001554	0,840353
Tukey HSD test; Variable: Dia 6 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 9 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=19,33	M=12,95	M=13,40	M=8,973	M=12,70	M=11,47	M=10,66	E1 {1}	M=18,35	M=12,10	M=23,69	M=15,29	M=1,092	M=17,51	M=13,66
E2 {2}		0,010552	0,018186	0,000254	0,000174	0,001871	0,000813	E2 {2}		0,528516	0,635377	0,964034	0,001387	0,999972	0,791661
E3 {3}		0,018186	0,999917	0,107923	0,000176	0,843220	0,547866	E3 {3}		0,528516	0,045544	0,956039	0,036544	0,574134	0,998982
E4 {4}		0,000254	0,176691	0,107923	0,000887	0,640107	0,505774	E4 {4}		0,635377	0,045544	0,226018	0,000239	0,539752	0,102640
E5 {5}		0,000174	0,000177	0,000178	0,000887	0,000197	0,000238	E5 {5}		0,956039	0,956039	0,226018	0,000239	0,006526	0,998647
E6 {6}		0,001871	0,947002	0,843220	0,540107	0,000197	0,597640	E6 {6}		0,000239	0,036544	0,000239	0,006526	0,002074	0,015750
E7 {7}		0,000313	0,721577	0,547866	0,905774	0,000238	0,997640	E7 {7}		0,999972	0,674134	0,539752	0,992758	0,000274	0,800373
Tukey HSD test; Variable: Dia 12 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=16,27	M=10,01	M=19,47	M=15,49	M=0,319	M=20,87	M=14,66	E1 {1}	M=13,02	M=7,367	M=17,83	M=14,23	M=0,561	M=24,29	M=14,92
E2 {2}		0,448939	0,938280	0,999973	0,002027	0,751879	0,998142	E2 {2}		0,938045	0,970449	0,999986	0,281612	0,425328	0,999810
E3 {3}		0,448939	0,096043	0,589766	0,071603	0,043630	0,743800	E3 {3}		0,938045	0,506543	0,861943	0,826046	0,083879	0,804711
E4 {4}		0,588280	0,096043	0,350905	0,000467	0,999160	0,714773	E4 {4}		0,970449	0,506543	0,993225	0,068066	0,390921	0,997861
E5 {5}		0,999973	0,589766	0,850905	0,003082	0,610426	0,999957	E5 {5}		0,999986	0,861943	0,993225	0,202382	0,543430	1,000000
E6 {6}		0,002027	0,071603	0,000467	0,003082	0,000305	0,004913	E6 {6}		0,281812	0,826046	0,058068	0,202382	0,003170	0,166241
E7 {7}		0,751879	0,043630	0,999160	0,610426	0,000305	0,457010	E7 {7}		0,425328	0,086879	0,890921	0,548430	0,008170	0,621293
Tukey HSD test; Variable: Dia 18 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 21 (MC-RR) Marked differences are significant at $p < .05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=4,858	M=7,916	M=29,75	M=16,19	M=0,424	M=34,91	M=16,49	E1 {1}	M=2,160	M=6,980	M=24,66	M=12,75	M=0,544	M=42,61	M=16,17
E2 {2}		0,997371	0,007279	0,433006	0,971981	0,001490	0,404837	E2 {2}		0,914468	0,002155	0,251655	0,998702	0,000175	0,069272
E3 {3}		0,007279	0,019667	0,251136	0,001648	0,981166	0,271840	E3 {3}		0,914468	0,015195	0,827336	0,686652	0,000181	0,392751
E4 {4}		0,433006	0,745682	0,251136	0,120071	0,053982	1,000000	E4 {4}		0,002155	0,015195	0,156993	0,000697	0,013599	0,479136
E5 {5}		0,971981	0,734192	0,001648	0,120071	0,000453	0,109653	E5 {5}		0,251655	0,827336	0,156993	0,116557	0,000264	0,982356
E6 {6}		0,001490	0,003732	0,961166	0,053982	0,000453	0,059420	E6 {6}		0,998702	0,686652	0,000997	0,116557	0,000174	0,029145
E7 {7}		0,404837	0,715809	0,271840	1,000000	0,109653	0,059420	E7 {7}		0,000175	0,000181	0,013599	0,000264	0,000174	0,000562

Tabela 29. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E7, MC-YR, dias 0-21.

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC YR) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	0,441880	6	0,073647	0,402211	14	0,028729	2,563459	0,068817
Dia 3	0,159704	6	0,026617	0,668548	14	0,047753	0,557390	0,756991
Dia 6	0,189431	6	0,031572	0,482052	14	0,034432	0,916927	0,511302
Dia 9	0,288365	6	0,048061	1,127507	14	0,080536	0,596760	0,728467
Dia 12	0,242615	6	0,040436	0,395280	14	0,028234	1,432155	0,270581
Dia 15	0,735193	6	0,122532	2,500681	14	0,178620	0,685993	0,664344
Dia 18	0,885889	6	0,147648	2,845595	14	0,203257	0,726412	0,635931
Dia 21	0,305891	6	0,050982	0,970066	14	0,069290	0,735772	0,629430

Tabela 30. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC YR) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	31,75353	6	5,292255	0,948831	14	0,067774	78,08725	0,000000
Dia 3	3,69012	6	0,615019	0,751922	14	0,053709	11,45101	0,000104
Dia 6	4,41636	6	0,736060	0,907186	14	0,064799	11,35912	0,000109
Dia 9	5,90232	6	0,983719	1,576673	14	0,112619	8,73490	0,000443
Dia 12	5,55289	6	0,925482	1,020991	14	0,072928	12,69036	0,000059
Dia 15	7,71044	6	1,285074	2,728353	14	0,194882	6,59410	0,001787
Dia 18	19,56233	6	3,260389	3,176751	14	0,226911	14,36860	0,000029
Dia 21	26,02651	6	4,337752	1,393686	14	0,099549	43,57403	0,000000

Tabelas 31-38. Teste de Tukey para as médias dos grupos E1-E7 (MC-YR) dias 0-21. Mostram as diferenças estatisticamente significativas encontradas.

Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 3 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=0,000							E1 {1}	M=1,031						
E2 {2}		M=0,000						E2 {2}		M=2,221					
E3 {3}			M=0,000					E3 {3}			M=1,902				
E4 {4}				M=1,272				E4 {4}				M=3,383			
E5 {5}					M=0,000			E5 {5}					M=0,000		
E6 {6}						M=3,260		E6 {6}						M=1,161	
E7 {7}							M=2,188	E7 {7}							M=7,915
E1 {1}		1,000000	1,000000	0,000644	1,000000	0,000174	0,000174	E1 {1}		0,010549	0,007791	0,049340	0,001404	0,991510	0,854956
E2 {2}	1,000000		1,000000	0,000644	1,000000	0,000174	0,000174	E2 {2}	0,010549		0,999997	0,973905	0,892793	0,003151	0,101502
E3 {3}	1,000000	1,000000		0,000644	1,000000	0,000174	0,000174	E3 {3}	0,007791	0,999997		0,939926	0,944468	0,002370	0,075984
E4 {4}	0,000644	0,000644	0,000644		0,000644	0,000175	0,000949	E4 {4}	0,049340	0,973905	0,939926		0,439830	0,014373	0,375618
E5 {5}	1,000000	1,000000	1,000000	0,000644		0,000174	0,000174	E5 {5}	0,001404	0,892793	0,944468	0,439830		0,000534	0,012528
E6 {6}	0,000174	0,000174	0,000174	0,000175	0,000174		0,002743	E6 {6}	0,991510	0,003151	0,002370	0,014373	0,000534		0,481210
E7 {7}	0,000174	0,000174	0,000174	0,000949	0,000174	0,002743		E7 {7}	0,854956	0,101502	0,075984	0,375618	0,012528	0,481210	
Tukey HSD test; Variable: Dia 6 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 9 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=1,677							E1 {1}	M=1,533						
E2 {2}		M=,6452						E2 {2}		M=,7124					
E3 {3}			M=,7630					E3 {3}			M=1,617				
E4 {4}				M=,5821				E4 {4}				M=1,034			
E5 {5}					M=0,000			E5 {5}					M=0,000		
E6 {6}						M=,8426		E6 {6}						M=1,483	
E7 {7}							M=,7908	E7 {7}							M=,9719
E1 {1}		0,003125	0,008465	0,001877	0,000184	0,016922	0,010768	E1 {1}		0,103424	0,999908	0,555247	0,001115	0,999996	0,428255
E2 {2}	0,003125		0,996918	0,999912	0,086245	0,957019	0,990404	E2 {2}	0,103424		0,060907	0,892332	0,197849	0,140324	0,957606
E3 {3}	0,008465	0,996918		0,971512	0,031619	0,999663	0,999999	E3 {3}	0,999908	0,060907		0,388167	0,000717	0,998648	0,284585
E4 {4}	0,001877	0,999912	0,971512		0,143633	0,861368	0,944774	E4 {4}	0,555247	0,892332	0,388167		0,026202	0,661917	0,999984
E5 {5}	0,000184	0,086245	0,031619	0,143633		0,015812	0,024840	E5 {5}	0,001115	0,197849	0,000717	0,026202		0,001488	0,039520
E6 {6}	0,016922	0,957019	0,999663	0,861368	0,015812		0,999972	E6 {6}	0,999996	0,140324	0,998648	0,661917	0,001488		0,529359
E7 {7}	0,010768	0,990404	0,999999	0,944774	0,024840	0,999972		E7 {7}	0,428255	0,957606	0,284585	0,999984	0,039520	0,529359	
Tukey HSD test; Variable: Dia 12 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=,8136							E1 {1}	M=,7552						
E2 {2}		M=,6022						E2 {2}		M=,4107					
E3 {3}			M=1,175					E3 {3}			M=1,050				
E4 {4}				M=,8965				E4 {4}				M=,7984			
E5 {5}					M=0,000			E5 {5}					M=0,000		
E6 {6}						M=1,828		E6 {6}						M=2,113	
E7 {7}							M=,9782	E7 {7}							M=,9480
E1 {1}		0,955279	0,661377	0,999697	0,030571	0,005878	0,986691	E1 {1}		0,955856	0,978932	1,000000	0,405119	0,026577	0,997755
E2 {2}	0,955279		0,198186	0,825332	0,160725	0,001185	0,623986	E2 {2}	0,955856		0,583725	0,925496	0,904981	0,004764	0,745899
E3 {3}	0,661377	0,198186		0,856862	0,001705	0,109507	0,967633	E3 {3}	0,978932	0,583725		0,990560	0,119245	0,112265	0,999942
E4 {4}	0,999697	0,825332	0,856862		0,015481	0,011539	0,999723	E4 {4}	1,000000	0,925496	0,990560		0,346571	0,032988	0,999467
E5 {5}	0,030571	0,160725	0,001705	0,015481		0,000180	0,007933	E5 {5}	0,405119	0,904981	0,119245	0,346571		0,000758	0,188739
E6 {6}	0,005878	0,001185	0,109507	0,011539	0,000180		0,022552	E6 {6}	0,026577	0,004764	0,112265	0,032988	0,000758		0,069067
E7 {7}	0,986691	0,623986	0,967633	0,999723	0,007933	0,022552		E7 {7}	0,997755	0,745899	0,999942	0,999467	0,188739	0,069067	
Tukey HSD test; Variable: Dia 18 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$								Tukey HSD test; Variable: Dia 21 (MC YR) Marked differences are significant at $p < ,05000$							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=,3784							E1 {1}	M=,1529						
E2 {2}		M=,3381						E2 {2}		M=,1656					
E3 {3}			M=1,738					E3 {3}			M=1,442				
E4 {4}				M=,9039				E4 {4}				M=,7299			
E5 {5}					M=0,000			E5 {5}					M=0,000		
E6 {6}						M=3,041		E6 {6}						M=3,444	
E7 {7}							M=1,114	E7 {7}							M=1,133
E1 {1}		1,000000	0,043336	0,817495	0,952070	0,000276	0,515678	E1 {1}		1,000000	0,002915	0,335162	0,996029	0,000174	0,024802
E2 {2}	1,000000		0,035999	0,765178	0,971678	0,000254	0,457942	E2 {2}	1,000000		0,003174	0,358129	0,993874	0,000174	0,027115
E3 {3}	0,043336	0,035999		0,380284	0,007484	0,056104	0,682348	E3 {3}	0,002915	0,003174		0,151630	0,001110	0,000191	0,882455
E4 {4}	0,817495	0,765178	0,380284		0,298202	0,001313	0,997625	E4 {4}	0,335162	0,358129	0,151630		0,136107	0,000174	0,704165
E5 {5}	0,952070	0,971678	0,007484	0,298202		0,000190	0,129292	E5 {5}	0,996029	0,993874	0,001110	0,136107		0,000174	0,008475
E6 {6}	0,000276	0,000254	0,056104	0,001313	0,000190		0,003189	E6 {6}	0,000174	0,000174	0,000191	0,000174	0,000174		0,000176
E7 {7}	0,515678	0,457942	0,682348	0,997625	0,129292	0,003189		E7 {7}	0,024802	0,027115	0,882455	0,704165	0,008475	0,000176	

Tabela 39. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E7, **MC-Total**, dias 0-21.

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC Total) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	60,3534	6	10,0589	198,348	14	14,1677	0,709988	0,647412
Dia 3	113,1886	6	18,8648	237,522	14	16,9659	1,111926	0,403619
Dia 6	20,3488	6	3,3915	103,547	14	7,3962	0,458544	0,827391
Dia 9	208,1314	6	34,6886	483,361	14	34,5258	1,004714	0,460196
Dia 12	74,6845	6	12,4474	218,457	14	15,6041	0,797702	0,587301
Dia 15	568,6163	6	94,7694	1848,695	14	132,0497	0,717680	0,642024
Dia 18	721,5227	6	120,2538	2141,770	14	152,9836	0,786057	0,595098
Dia 21	280,8118	6	46,8020	972,776	14	69,4840	0,673564	0,673180

Tabela 40. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC Total) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	25599,86	6	4266,643	324,154	14	23,1539	184,2735	0,000000
Dia 3	2173,64	6	362,273	431,297	14	30,8069	11,7595	0,000090
Dia 6	2057,21	6	342,869	147,853	14	10,5610	32,4657	0,000000
Dia 9	2949,25	6	491,542	808,029	14	57,7164	8,5165	0,000505
Dia 12	2927,53	6	487,922	497,994	14	35,5710	13,7168	0,000038
Dia 15	4157,59	6	692,932	2057,582	14	146,9701	4,7148	0,007938
Dia 18	11481,51	6	1913,584	2378,458	14	169,8899	11,2637	0,000114
Dia 21	15286,08	6	2547,679	1239,471	14	88,5337	28,7764	0,000000

Tabelas 41-48. Teste de Tukey para as médias dos grupos E1-E7 (MC-Total) dias 0-21. Mostram as diferenças estatisticamente significativas encontradas.

Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000								Tukey HSD test; Variable: Dia 3 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=12,62							E1 {1}	M=29,03						
E2 {2}		M=7,570						E2 {2}		M=6,784					
E3 {3}			M=1,205					E3 {3}			M=12,66				
E4 {4}				M=49,66				E4 {4}				M=8,645			
E5 {5}					M=0,000			E5 {5}					M=0,000		
E6 {6}						M=94,71		E6 {6}						M=28,30	
E7 {7}							M=68,88	E7 {7}							M=18,54
E1 {1}		0,846802	0,120390	0,000175	0,071278	0,000174	0,000174	E1 {1}		0,003448	0,035215	0,007099	0,000394	0,999998	0,302020
E2 {2}	0,846802		0,673201	0,000174	0,495773	0,000174	0,000174	E2 {2}	0,003448		0,842286	0,999499	0,742465	0,004560	0,199673
E3 {3}	0,120390	0,873201		0,000174	0,999907	0,000174	0,000174	E3 {3}	0,035215	0,842286		0,968852	0,145066	0,047001	0,842813
E4 {4}	0,000175	0,000174	0,000174		0,000174	0,000174	0,003551	E4 {4}	0,007099	0,999499	0,968852		0,506576	0,009479	0,361508
E5 {5}	0,071278	0,495773	0,999907	0,000174		0,000174	0,000174	E5 {5}	0,000394	0,742465	0,145066	0,506576		0,000472	0,014798
E6 {6}	0,000174	0,000174	0,000174	0,000174	0,000174		0,000338	E6 {6}	0,999998	0,004560	0,047001	0,009479	0,000472		0,375788
E7 {7}	0,000174	0,000174	0,000174	0,003551	0,000174	0,000338		E7 {7}	0,302020	0,199673	0,842813	0,361508	0,014798	0,375788	
Tukey HSD test; Variable: Dia 6 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000								Tukey HSD test; Variable: Dia 9 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=36,16							E1 {1}	M=34,64						
E2 {2}		M=21,43						E2 {2}		M=20,36					
E3 {3}			M=22,13					E3 {3}			M=39,09				
E4 {4}				M=15,16				E4 {4}				M=25,10			
E5 {5}					M=1,270			E5 {5}					M=1,092		
E6 {6}						M=21,19		E6 {6}						M=31,86	
E7 {7}							M=18,61	E7 {7}							M=23,21
E1 {1}		0,001204	0,001825	0,000187	0,000174	0,001046	0,000327	E1 {1}		0,307232	0,989154	0,719612	0,001176	0,999168	0,543717
E2 {2}	0,001204		0,999961	0,282737	0,000184	1,000000	0,929885	E2 {2}	0,307232		0,099583	0,984867	0,065234	0,537313	0,999045
E3 {3}	0,001825	0,999961		0,190038	0,000180	0,999791	0,829853	E3 {3}	0,989154	0,099583		0,327954	0,000452	0,895533	0,210468
E4 {4}	0,000187	0,282737	0,190038		0,000105	0,320145	0,840790	E4 {4}	0,719612	0,984867	0,327954		0,016538	0,921330	0,999111
E5 {5}	0,000174	0,000184	0,000180	0,001005		0,000186	0,000251	E5 {5}	0,001176	0,065234	0,000452	0,016538		0,002417	0,028679
E6 {6}	0,001046	1,000000	0,999791	0,320145	0,000186		0,952241	E6 {6}	0,999168	0,537313	0,895533	0,921330	0,002417		0,796701
E7 {7}	0,000327	0,929885	0,829853	0,840790	0,000251	0,952241		E7 {7}	0,543717	0,999045	0,210468	0,999111	0,028679	0,796701	
Tukey HSD test; Variable: Dia 12 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000								Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=26,22							E1 {1}	M=22,91						
E2 {2}		M=18,90						E2 {2}		M=12,22					
E3 {3}			M=32,24					E3 {3}			M=30,48				
E4 {4}				M=24,94				E4 {4}				M=22,50			
E5 {5}					M=0,319			E5 {5}					M=0,0561		
E6 {6}						M=40,68		E6 {6}						M=49,16	
E7 {7}							M=24,23	E7 {7}							M=24,58
E1 {1}		0,502211	0,869389	0,999961	0,001573	0,108846	0,999505	E1 {1}		0,924300	0,984940	1,000000	0,304555	0,182278	0,999997
E2 {2}	0,502211		0,079736	0,655172	0,045863	0,003606	0,737770	E2 {2}	0,924300		0,542802	0,935930	0,871263	0,028341	0,863787
E3 {3}	0,869389	0,079736		0,741607	0,000327	0,607310	0,659243	E3 {3}	0,984940	0,542802		0,980461	0,090867	0,517948	0,995929
E4 {4}	0,999961	0,655172	0,741607		0,002431	0,069138	0,999999	E4 {4}	1,000000	0,935930	0,980461		0,322370	0,170847	0,999990
E5 {5}	0,001573	0,045863	0,000327	0,002431		0,000180	0,003110	E5 {5}	0,304555	0,871263	0,090867	0,322370		0,003153	0,238447
E6 {6}	0,108846	0,003606	0,607310	0,069138	0,000180		0,053476	E6 {6}	0,182278	0,028341	0,517948	0,170847	0,003153		0,238447
E7 {7}	0,999505	0,737770	0,659243	0,999999	0,003110	0,053476		E7 {7}	0,999997	0,863787	0,995929	0,999990	0,238447	0,238447	
Tukey HSD test; Variable: Dia 18 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000								Tukey HSD test; Variable: Dia 21 (MC Total) Marked differences are significant at p < ,05000							
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
E1 {1}	M=10,15							E1 {1}	M=5,196						
E2 {2}		M=12,24						E2 {2}		M=10,87					
E3 {3}			M=53,18					E3 {3}			M=42,23				
E4 {4}				M=26,63				E4 {4}				M=20,98			
E5 {5}					M=0,424			E5 {5}					M=0,0544		
E6 {6}						M=70,97		E6 {6}						M=85,01	
E7 {7}							M=29,27	E7 {7}							M=23,52
E1 {1}		0,999993	0,016136	0,713900	0,957045	0,000937	0,570527	E1 {1}		0,987344	0,004012	0,425995	0,992431	0,000174	0,095867
E2 {2}	0,999993		0,023027	0,816995	0,902644	0,001266	0,684801	E2 {2}	0,987344		0,015033	0,834071	0,789110	0,000175	0,309646
E3 {3}	0,016136	0,023027		0,232467	0,002985	0,642987	0,331965	E3 {3}	0,004012	0,015033		0,151821	0,001322	0,001177	0,577113
E4 {4}	0,713900	0,816995	0,232467		0,231090	0,012903	0,999973	E4 {4}	0,425995	0,834071	0,151821		0,162594	0,000180	0,950149
E5 {5}	0,957045	0,902644	0,002985	0,231090		0,000314	0,156938	E5 {5}	0,992431	0,789110	0,001322	0,162594		0,000174	0,029703
E6 {6}	0,000937	0,001266	0,642987	0,012903	0,000314		0,020199	E6 {6}	0,000174	0,000175	0,001177	0,000180	0,000174		0,000212
E7 {7}	0,570527	0,684801	0,331965	0,999973	0,156938	0,020199		E7 {7}	0,095867	0,309646	0,577113	0,950149	0,029703	0,000212	

Capítulo III

Tabela 49. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E4, **MC-Total**, dias 0-20.

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC Total E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	74,6420	3	24,88065	184,0655	8	23,0082	1,081383	0,410445
Dia 5	108,6410	3	36,21365	264,9703	8	33,1213	1,093365	0,406140
Dia 10	63,7280	3	21,24266	965,4765	8	120,6846	0,176018	0,909665
Dia 15	144,6409	3	48,21362	760,7328	8	95,0916	0,507023	0,688274
Dia 20	24,6135	3	8,20451	943,5863	8	117,9483	0,069560	0,974595

Tabela 50. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC Total E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	6022,495	3	2007,498	397,608	8	49,7010	40,39150	0,000035
Dia 5	1067,898	3	355,966	552,912	8	69,1140	5,15042	0,028398
Dia 10	2627,079	3	875,693	1165,986	8	145,7482	6,00826	0,019072
Dia 15	2756,143	3	918,714	1485,911	8	185,7389	4,94627	0,031408
Dia 20	3341,333	3	1113,778	1400,490	8	175,0612	6,36222	0,016357

Tabelas 51-55. Teste de Tukey para para as médias dos grupos E1-E7 (**MCTotal**) dias 0-20. Mostram as diferenças estatisticamente significativas encontradas.

Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC Total E1-E4) Marked differences are significant at $p < ,05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=71,127	M=106,51	M=44,517	M=64,163
E1 {1}		0,001403	0,007515	0,638168
E2 {2}	0,001403		0,000238	0,000546
E3 {3}	0,007515	0,000238		0,037328
E4 {4}	0,638168	0,000546	0,037328	

Tukey HSD test; Variable: Dia 5 (MC Total E1-E4) Marked differences are significant at $p < ,05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=57,026	M=59,189	M=35,447	M=46,673
E1 {1}		0,988028	0,051771	0,467358
E2 {2}	0,988028		0,033187	0,321978
E3 {3}	0,051771	0,033187		0,404305
E4 {4}	0,467358	0,321978	0,404305	

Tukey HSD test; Variable: Dia 10 (MC Total E1-E4) Marked differences are significant at $p < ,05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=43,947	M=78,938	M=41,749	M=57,447
E1 {1}		0,030882	0,995824	0,549553
E2 {2}	0,030882		0,022764	0,208316
E3 {3}	0,995824	0,022764		0,433655
E4 {4}	0,549553	0,208316	0,433655	

Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC Total E1-E4) Marked differences are significant at $p < ,05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=48,971	M=82,576	M=43,241	M=62,827
E1 {1}		0,064760	0,953238	0,618417
E2 {2}	0,064760		0,031526	0,350408
E3 {3}	0,953238	0,031526		0,356660
E4 {4}	0,618417	0,350408	0,356660	

Tukey HSD test; Variable: Dia 20 (MC Total E1-E4) Marked differences are significant at $p < ,05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=47,616	M=82,881	M=50,609	M=81,943
E1 {1}		0,045936	0,992054	0,051878
E2 {2}	0,045936		0,067806	0,999761
E3 {3}	0,992054	0,067806		0,076643
E4 {4}	0,051878	0,999761	0,076643	

Tabela 56. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E4, **MC-LR**, dias 0-20.

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC LR E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	5,58761	3	1,862538	29,3498	8	3,66873	0,507680	0,687868
Dia 5	18,56631	3	6,188771	62,6304	8	7,82880	0,790513	0,532409
Dia 10	16,29644	3	5,432145	199,2392	8	24,90490	0,218115	0,881149
Dia 15	27,97280	3	9,324266	107,6804	8	13,46005	0,692736	0,581782
Dia 20	2,02123	3	0,673745	131,0938	8	16,38672	0,041115	0,988053

Tabela 57. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC LR E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	480,7697	3	160,2566	48,9748	8	6,12184	26,17783	0,000173
Dia 5	110,4623	3	36,8208	105,7450	8	13,21813	2,78563	0,109644
Dia 10	905,9568	3	301,9856	260,1392	8	32,51740	9,28689	0,005523
Dia 15	819,0849	3	273,0283	240,6122	8	30,07652	9,07779	0,005916
Dia 20	675,8560	3	225,2853	183,1212	8	22,89015	9,84202	0,004628

Tabela 58. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E4, **MC-RR**, dias 0-20

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC RR E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	44,41006	3	14,80335	71,6881	8	8,96101	1,651974	0,253314
Dia 5	27,93033	3	9,31011	62,7422	8	7,84278	1,187093	0,374193
Dia 10	12,52750	3	4,17583	235,3951	8	29,42439	0,141917	0,931998
Dia 15	43,59698	3	14,53233	284,9452	8	35,61815	0,408003	0,751612
Dia 20	25,04964	3	8,34988	349,2944	8	43,66181	0,191240	0,899443

Tabela 59. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC RR E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	2948,349	3	982,7829	179,5679	8	22,44599	43,78434	0,000026
Dia 5	480,926	3	160,3088	146,8216	8	18,35270	8,73489	0,006638
Dia 10	405,431	3	135,1437	274,4896	8	34,31121	3,93876	0,053726
Dia 15	501,997	3	167,3323	483,5940	8	60,44925	2,76815	0,110944
Dia 20	876,332	3	292,1106	536,0461	8	67,00576	4,35948	0,042571

Tabela 60. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E4, MC-YR, dias 0-20

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC YR E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	0,045992	3	0,015331	0,476612	8	0,059577	0,257328	0,854142
Dia 5	0,470587	3	0,156862	1,601573	8	0,200197	0,783541	0,535780
Dia 10	0,051401	3	0,017134	2,425356	8	0,303169	0,056515	0,981102
Dia 15	0,168108	3	0,056036	0,911365	8	0,113921	0,491887	0,697679
Dia 20	0,076221	3	0,025407	1,059703	8	0,132463	0,191805	0,899061

Tabela 61. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC YR E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	3,474202	3	1,158067	0,905145	8	0,113143	10,23542	0,004102
Dia 5	0,409833	3	0,136611	2,451729	8	0,306466	0,44576	0,726972
Dia 10	4,510817	3	1,503606	2,929608	8	0,366201	4,10596	0,048903
Dia 15	3,165324	3	1,055108	2,165610	8	0,270701	3,89768	0,055000
Dia 20	5,973893	3	1,991298	2,147643	8	0,268455	7,41761	0,010681

Tabela 62. Resultado do teste de homogeneidade de variância (Brown-Forsythe) para os dados referentes às triplicatas dos grupos E1-E4, **MC-TOTAL**, dias 0-20

Variable	Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (MC Total E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	74,6420	3	24,88065	184,0655	8	23,0082	1,081383	0,410445
Dia 5	108,6410	3	36,21365	264,9703	8	33,1213	1,093365	0,406140
Dia 10	63,7280	3	21,24266	965,4765	8	120,6846	0,176018	0,909665
Dia 15	144,6409	3	48,21362	760,7328	8	95,0916	0,507023	0,688274
Dia 20	24,6135	3	8,20451	943,5863	8	117,9483	0,069560	0,974595

Tabela 63. Resultado do teste one-way ANOVA para os dados anteriores.

Variable	Analysis of Variance (MC Total E1-E4) Marked effects are significant at $p < ,05000$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	6022,495	3	2007,498	397,608	8	49,7010	40,39150	0,000035
Dia 5	1067,898	3	355,966	552,912	8	69,1140	5,15042	0,028398
Dia 10	2627,079	3	875,693	1165,986	8	145,7482	6,00826	0,019072
Dia 15	2756,143	3	918,714	1485,911	8	185,7389	4,94627	0,031408
Dia 20	3341,333	3	1113,778	1400,490	8	175,0612	6,36222	0,016357

Tabelas 64-78: Teste de Tukey para as médias dos grupos E1-E4 (MC-LR, MC-RR e MC-YR) dias 0-20. Mostram as diferenças estatisticamente significativas encontradas.

Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC LR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC RR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 0 (MC YR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=17,60	M=29,21	M=12,38	M=15,80		M=51,54	M=74,11	M=30,35	M=46,27		M=1,975	M=3,176	M=1,805	M=2,083
E1 {1}		0,002080	0,117790	0,810413	E1 {1}		0,001901	0,002760	0,552744	E1 {1}		0,010311	0,923994	0,977781
E2 {2}	0,002080		0,00344	0,00909	E2 {2}	0,001901		0,00235	0,00601	E2 {2}	0,010311		0,004811	0,017265
E3 {3}	0,117790	0,00344		0,380799	E3 {3}	0,002760	0,00235		0,014386	E3 {3}	0,923994	0,004811		0,747784
E4 {4}	0,810413	0,00909	0,380799		E4 {4}	0,552744	0,00601	0,014386		E4 {4}	0,977781	0,017265	0,747784	
Tukey HSD test; Variable: Dia 5 (MC LR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 5 (MC RR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 5 (MC YR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=23,06	M=21,95	M=15,27	M=18,79		M=31,821	M=35,104	M=18,483	M=25,802		M=2,1375	M=2,1291	M=1,5906	M=2,0747
E1 {1}		0,980931	0,112869	0,512424	E1 {1}		0,786006	0,021556	0,373815	E1 {1}		0,999998	0,759926	0,999014
E2 {2}	0,980931		0,189291	0,719245	E2 {2}	0,786006		0,006412	0,107649	E2 {2}	0,999998		0,769728	0,999367
E3 {3}	0,112869	0,189291		0,650915	E3 {3}	0,021556	0,006412		0,234161	E3 {3}	0,759926	0,769728		0,829840
E4 {4}	0,512424	0,719245	0,650915		E4 {4}	0,373815	0,107649	0,234161		E4 {4}	0,999014	0,999367	0,829840	
Tukey HSD test; Variable: Dia 10 (MC LR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 10 (MC RR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 10 (MC YR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=18,93	M=39,58	M=17,87	M=23,72		M=23,574	M=38,287	M=21,909	M=31,216		M=1,4339	M=3,0835	M=1,9701	M=2,5040
E1 {1}		0,009529	0,995444	0,738779	E1 {1}		0,108470	0,984521	0,431046	E1 {1}		0,041405	0,707640	0,212407
E2 {2}	0,009529		0,007139	0,037666	E2 {2}	0,108470		0,066407	0,723669	E2 {2}	0,041405		0,188778	0,658891
E3 {3}	0,995444	0,007139		0,611281	E3 {3}	0,984521	0,066407		0,283177	E3 {3}	0,707640	0,188778		0,710338
E4 {4}	0,738779	0,037666	0,611281		E4 {4}	0,431046	0,723669	0,283177		E4 {4}	0,212407	0,658891	0,710338	
Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC LR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC RR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 15 (MC YR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=20,75	M=39,05	M=17,35	M=26,66		M=26,507	M=40,462	M=23,941	M=33,814		M=1,7059	M=3,0620	M=1,9471	M=2,3437
E1 {1}		0,014982	0,869985	0,576713	E1 {1}		0,203360	0,976247	0,671148	E1 {1}		0,050815	0,939017	0,479536
E2 {2}	0,014982		0,005713	0,092733	E2 {2}	0,203360		0,116588	0,728529	E2 {2}	0,050815		0,113039	0,387222
E3 {3}	0,869985	0,005713		0,237845	E3 {3}	0,976247	0,116588		0,452121	E3 {3}	0,939017	0,113039		0,788547
E4 {4}	0,576713	0,092733	0,237845		E4 {4}	0,671148	0,728529	0,452121		E4 {4}	0,479536	0,387222	0,788547	
Tukey HSD test; Variable: Dia 20 (MC LR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 20 (MC RR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$					Tukey HSD test; Variable: Dia 20 (MC YR E1-E4) Marked differences are significant at $p < .05000$				
Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}	Grupos (MC)	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=20,455	M=36,564	M=21,108	M=34,912		M=25,64	M=43,40	M=27,32	M=43,66		M=1,5192	M=2,9130	M=2,1725	M=3,3670
E1 {1}		0,014243	0,998260	0,025104	E1 {1}		0,107939	0,993965	0,102161	E1 {1}		0,044022	0,457607	0,010384
E2 {2}	0,014243		0,017771	0,972979	E2 {2}	0,107939		0,153421	0,999978	E2 {2}	0,044022		0,360835	0,714374
E3 {3}	0,998260	0,017771		0,031574	E3 {3}	0,993965	0,153421		0,145364	E3 {3}	0,457607	0,360835		0,085435
E4 {4}	0,025104	0,972979	0,031574		E4 {4}	0,102161	0,999978	0,145364		E4 {4}	0,010384	0,714374	0,085435	

**ANEXO 3 - INTERCÂMBIO NA *FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITY OF JENA*,
ALEMANHA**

Projeto de tese de intercâmbio estudantil na Alemanha

O presente projeto foi desenvolvido no *Department of Food Chemistry* do *Institute for Nutrition* da *Friedrich-Schiller-University of Jena*, na Alemanha durante quatro meses (September - December, 2009).

1. Título

Investigação das cianotoxinas produzidas por cepas de cianobactérias brasileiras

2. Justificativa

Uma das principais preocupações atuais é a diminuição da contaminação das fontes de água. Por este motivo o monitoramento dos recursos hídricos responsáveis pelo abastecimento público, é de essencial importância, tanto para a manutenção da qualidade do meio ambiente, mas principalmente no tocante à saúde pública. Dentre os padrões avaliados, encontram-se as cianotoxinas e entre elas as microcistinas.

Algumas variantes de microcistinas já foram bastante estudadas, como as microcistinas (MC): MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, variantes desmetiladas, entre outras, incluindo-se técnicas para detecção. Até hoje foram relatadas 77 variantes de microcistinas. Portanto a investigação mais aprofundada e precisa das possíveis variantes dessa toxina produzidas por cepas de cianobactérias Brasileiras é de essencial importância para melhor caracterização da potenciabilidade tóxica destes organismos.

3. Objetivos

- Conhecimento de diferentes técnicas utilizadas para a detecção de cianotoxinas e seu emprego nas amostras brasileiras;
- Análise das cianotoxinas por HPLC (microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsina, anatoxina-a, saxitoxinas e suas variantes e BMAA) produzidas por cepas brasileiras;
- Investigação aprofundada na detecção e caracterização de variantes de microcistina em cepas Brasileiras produtoras de toxinas por LC-MS.
- Análise dos resultados.

4. Plano de trabalho no exterior

O projeto realizado até o momento permitiu o isolamento de 10 cepas de cianobactérias a partir de amostras da natureza coletadas em diferentes reservatórios Brasileiros. A investigação das toxinas produzidas foi iniciada, aplicando-se técnicas desenvolvidas por estudantes do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ernani Pinto. Sendo que três dessas cepas demonstraram serem produtoras de quatro variantes de microcistinas. Porém a investigação de outras variantes é de extrema importância para a melhor caracterização das toxinas encontradas em nosso território.

A investigação da presença de outras variantes de microcistinas nas cepas isoladas aprofunda o conhecimento sobre estes organismos comuns no mundo todo e representantes de potencial risco para a saúde humana.

O laboratório coordenado pelo Prof. Luckas na Universidade de Jena é de excelência em técnicas cromatográficas e espectroscópicas o que viabilizará a realização das análises propostas.

A viabilidade da execução do trabalho neste laboratório está em conformidade com o exigido para a realização das análises, conforme aprovação formal do orientador brasileiro Pr. Dr. Ernani Pinto no ofício de encaminhamento e consta na carta convite do orientador estrangeiros, Prof. Dr. Bernd Luckas.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

RELATÓRIO DE VIAGEM INTERNACIONAL

1. Órgão:

CAPES/ DAAD/ PROBAL

2. Identificação do Usuário:

Nome: Stella de Bortoli	Programa: Probal
Missão de estudos/Modalidade Doutorado sanduíche	Telefone: 11.7230.6585

3. Período de Afastamento:

Data de Saída: 01/09/2009	Data de Chegada: 20/01/2010
Trecho ida: Guarulhos /Frankfour	Trecho volta: Frankfour/Guarulhos

4. Destino do Afastamento:

Cidade(s): Jena	País(es): Alemanha
------------------------	---------------------------

5. Finalidade do Afastamento / Objetivos do Evento:

Realização do Doutorado Sanduíche.

Aprimoramento na investigação de cianotoxinas produzidas por cepas de cianobactérias brasileiras isoladas previamente durante a execução do projeto de doutorado, bem como amostras de Spirulinas comerciais disponíveis no mercado brasileiro e utilizadas como suplemento alimentar , além de amostras de água e blooms de reservatórios brasileiros. Conhecimento e aplicação de diferentes técnicas utilizadas para a detecção de cianotoxinas e emprego de novas técnicas de extração das amostras.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

RELATÓRIO DE VIAGEM INTERNACIONAL

6. Atividades / Fatos Transcorridos / Pessoas Contatadas:

Atividades realizadas:

- 1 Análise de multitoxinas nas amostras.
 - 1.1 Técnica de extração e análise para detecção de multitoxinas (Cillindropermopsina, anatoxina-A, microcistinas (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LF, MC-LW)) por HPLC-MS. – **Parte 1**
 - 1.2 Análise e quantificação das variantes de microcistinas detectadas em algumas nas amostras na etapa anterior. Microcistinas quantificadas: MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LF, MC-LW, Desmetil MC-LR e Desmetil MC-RR). – **Parte 2.**
 - 1.3 Técnica de extração para detecção de BMAA (β -N-metilamino-L-alanina) e DAB (ácido α -, γ - diamino butírico) nas amostras por HPLC-MS. – **Parte 3.**
 - 1.4 Técnica de extração para detecção e quantificação de PSPs (Paralytic Shellfish Poisoning), incluindo saxitoxina, decarbamoil saxitoxina, neosaxitoxina e as variantes de goniautoxinas (GTX1, GTX 2, GTX3, GTX 4, decarbamoil GTX) por HPLC. – **Parte 4.**
 - 1.5 A análise dos resultados, bem como das quantificações das toxinas constam dentro de cada anexo referido, e identificados no item 8 conclusões/resultados alcançados.
2. Investigação da ação da anatoxina-a(S) em membranas de células do sistema nervoso de ratos utilizando a técnica de Patch Clamp. (Experimento realizado no Instituto de Fisiologia) – **Parte 5.**

- Prof. Dr. Bernd Luckas – Instituto de Nutrição
- Prof. Dr. Hans-Georg Schaible – Instituto de Fisiologia
- Dr. Gabriel Naturo – Instituto de Fisiologia – Experimentos de Patch Clamp
- Dipl. Troph. Thomas Krueger (estudante de doutorado) - Análise de multitoxinas, microcistinas e BMAA.
- Dipl. Troph. Tina Helbig (estudante de doutorado) – Análise de PSPs
- Dipl. Troph. Katrin Erler (estudante de doutorado)
- Dipl. Troph Karin Roeder (estudante de doutorado)
- Steven Oppenhäuser (iniciação científica) – Análise de BMAA

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

RELATÓRIO DE VIAGEM INTERNACIONAL

7. Sugestões dos benefícios que podem ser auferidos em relação aos objetivos da viagem:

O intercâmbio entre os laboratórios e as práticas aprendidas e realizadas serviram para complementar o projeto desenvolvido no Brasil. Tudo transcorreu bem, os objetivos foram alcançados e a comunicação com a CAPES foi eficiente.

8. Conclusões/Resultados Alcançados:

Foram realizadas diferentes técnicas de extração, para a utilização de diferentes métodos de detecção e quantificação para várias classes de toxinas, bem como entre suas variantes. As amostras de cepas de cianobactérias e as amostras provenientes de reservatórios Brasileiros (Bloom e amostra de água) demonstraram presença de cianotoxinas.

Novos contatos foram realizados com pesquisadores do Instituto de Fisiologia desta mesma universidade e um experimento piloto foi iniciado.

A descrição de cada técnica utilizada e dos resultados obtidos para cada uma das análises constam nos **Partes 1, 2, 3, 4 e 5.**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

RELATÓRIO DE VIAGEM INTERNACIONAL

9. Observações:

O tempo dispensado para as análises propostas foi suficiente. Novos contatos foram realizados e a extensão do prazo do doutorado sanduíche para a realização destes novos experimentos foi imprescindível.

Este relatório deverá ser encaminhado ao Setor de Afastamento do País Capes/CGCI – Cooperação Internacional (cinco) dias úteis, contados da chegada (de acordo com o Parágrafo Único do Art. 5º da Portaria 2.016 de 07 de julho de 2004).

Data: 21-01-2010

Assinatura do bolsista

PARTE 1

Relação das amostras analisadas

As amostras enviadas do Brasil e analisadas neste projeto de Doutorado Sanduíche são:

- Amostras liofilizadas de cepas de cianobactérias Brasileiras, isoladas previamente durante a primeira etapa do projeto de doutorado no Brasil. E cepas gentilmente cedidas pelo Prof. Renato Molica. Todas permanecem em cultivo no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Onde o projeto é desenvolvido.
- Amostras de água e *bloom* provenientes de reservatórios Brasileiros. Reservatório de Salto Grande em Americana/SP- coletas em Outubro de 2006 e Março de 2007. Reservatório Billings - Braço de Taquacetuba (São Paulo/SP) – coleta em Fevereiro de 2007). Reservatório Governador Bento Munhoz da Rocha Netto, Rio do Foz do Areia, no município de Cruz Machado/PR.
- Suplemento alimentar protéico a base de *Spirulina sp* comercialmente disponíveis no mercado Brasileiro.

Tabela 1. Relação de cepas de cianobactérias isoladas

AMOSTRA	ORGANISMO
ITEP A1	<i>Cilindrospermopsis sp</i>
ITEP 18	<i>C. raciborskii</i>
ITEP 25 S	<i>Anabaena oumiana</i>
ITEP 26	<i>Anabaena oumiana</i>
ITEP 28	<i>C. raciborskii (espiralada)</i>
ITEP 28 MC	<i>Microcystis sp</i>
ITEP 30	<i>C. raciborskii (reta)</i>
JUCAZ	<i>Cilindrospermopsis sp</i>
LTPNA 01	<i>Microcystis protocystis</i>
LTPNA 02	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA 02 CC	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA 03	<i>Microcystis protocystis</i>
LTPNA 05	-contaminação-
LTPNA 06	<i>Pseudoanabaena sp</i>
LTPNA 07	<i>Geitlerinema sp</i>
LTPNA 08	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 09	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>

Tabela 2. Relação de amostras de água e *bloom* de reservatórios Brasileiros.

AMOSTRA	OBSERVAÇÃO
AME 10/2006 (p1)	<i>Bloom</i>
AME 03/2007 (p1)	<i>Bloom</i>
FOZ 01/2007	<i>Bloom</i>
TAQ 07/2007	Amostra de água

Tabela 3. Relação dos suplementos alimentares analisados.

AMOSTRA	ORGANISMO
Spirulina A	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina B	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina C	<i>Spirulina máxima</i>
Spirulina D	<i>Spirulina máxima</i>
Spirulina E	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina F	<i>Spirulina maxima</i>
Spirulina G	<i>Spirulina sp</i>

Tabela 4. Informações das amostras de suplemento alimentar.

	Marca	CNPJ	REGISTRO MS
A	NATIVE	54.603.618/0001-75	5.0970.0034
B	SCHRAIBER (fabricado por Ad Oceanum Ind e Com)	62.134.671/0001-00 03.562.487/0001-94	6.2358.0038.001-9
C	VITALAB (<i>Spirulina máxima</i>)	56.649.953/0001-86	4.8856.0051
D	OITO ERVAS (<i>Spirulina máxima</i>)	- RESOLUÇÃO 23/2000 DA ANVISA	
E	CHAMED	04.439.274/0001-32	5.2613.0041.001-5
F	HERBARIUM (<i>Spirulina máxima</i>)	78.950.011/0001-20	4.8697.0030
G	LABORTNATU'S	05.953.916/0001-80	---

Análise de multitoxinas

1. Introdução

A técnica empregada para análise de várias cianotoxinas numa única corrida analítica permite direcionar as demais técnicas utilizadas na melhor investigação e observação das variantes presentes nas amostras, bem como a quantificação das mesmas.

Esta técnica proposta por Hiller et al, permite a detecção de anatoxina-a, cillindrospermopsina, nodularina e microcistinas¹.(2007)(2007)(2007)(2007)(2007)(2007)

• Anatoxina-a

Alcalóide natural de baixo peso molecular. É uma amina secundária bicíclica, cuja estrutura é 2-acetil-9-azabiccílica[4.2.1]nos-2ene. Pode ser produzida pelos gêneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* and *Cylindrospermum*². Tem peso molecular igual a 165Da. Análogo estrutural da cocaína, sua ação é predominantemente neurotóxica, sendo um potente agonista nicotínico pos-sináptico^{3,4}.

Figura 1. Estrutura química da anatoxina-a.

• Cilindrospermopsina

Alcalóide guanidínico tricíclico, cujo mecanismo tóxico é a citotoxicidade. Possui peso molecular de 415 Da, Produzido principalmente pelas espécies *Cillindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* e *Aphanizomenon ovalisporum*².

Figura 2. Estrutura química da cillindrospermopsina.

- **Microcistina** – (MC-LA, MC-LW, MC-LF, MC-LR, MC-YR, MC-RR)

É um heptapeptídeo cíclico, produzida por diferentes gêneros e espécies de cianobactérias, tal como: *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* (cianobactéria terrestre), *Synechocystis* e *Lyngbya*^{5,6}.

A estrutura básica da microcistina é a sua forma mais comumente encontrada na natureza é denominada como: ciclo (D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), onde **D-MeAsp** é o ácido D eritro-β-metilaspártico (3), **Adda** é ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6dienóico (5) e **Mdha** é N-metildeidroalanina(3). Os aminoácidos das posições 2 e 4 são extremamente variados e isso confere a esta molécula grande número de variantes².

São conhecidas mais de 80 variantes desta molécula e o peso molecular pode variar entre 500 a 4000Da³.

Figura 3. Estrutura química geral das microcistinas. Principais variantes dessa molécula admitem diferentes aminoácidos nas posições 2 (X) e 4 (Y).

Tabela 5. Variantes de microcistina, analisadas por este método.

Variante	Aminoácido X	Aminoácido Y
MC-LA	Leucina	Alanina
MC-LW	Leucina	Triptofano
MC-LF	Leucina	Fenilalanina
MC-LR	Leucina	Arginina
MC-YR	Tirosina	Arginina
MC-RR	Arginina	Arginina

- **Nodularina**

É um pentapeptídeo monocíclico, com os dois aminoácidos terminais de um peptídeo linear sendo condensados de tal modo a formar um composto cíclico. Com massa de 824Da, admite algumas variantes naturais e também variantes não tóxicas. A estrutura geral desta toxina é: ciclo(D-MeAsp²-L-Arg³-ADDA⁴-D-glutamato⁵-Mdhb¹), onde o Mdhb é o ácido 2-metilamino – 2dehidrobútrico³.

Figura 4. Estrutura química da nodularina.

2. Métodos

2.1 Preparo das amostras:

Foram pesados 50mg de cada amostra e adicionado 1mL de solução extratora (0,1M ácido acético (1,43mL Ac. Acet/ 500mL H₂O): Metanol – (50:50)). Depois de homogeneizadas em Vortex[®] por 15s, foram submetidas a probe ultrassônica por 1min. Novamente foram agitadas no Vortex[®]. Centrifugadas por 10 min a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram recolhidos com seringa e agulha e filtrados em filtro Millipore[®] de 22µm. Guardados em vials identificados a temperatura de -20°C até análise.

2.2 Condições cromatográficas:

2.2.1 Fase móvel:

A – 100mL Solução estoque completar para 1000mL com água.

B – 100mL solução estoque completar com 1000mL de Acetonitrila.

Solução estoque: 53nM Ácido fórmico e 5mM formiato de amônio em água.

2.2.2 Coluna - Phenomenex Polar RP

2.2.3. Fluxo - 300µL/min

2.2.4. Gradiente de concentração

Tabela 6: Esquema do gradiente de concentração utilizado na corrida analítica

Minutos	Eluente A(%)	Eluente B(%)
0	80	20
5	70	30
8	80	20
25	80	20

2.2.5. Padrões analíticos utilizados:

Tabela 7: Padrões analíticos utilizados nas análises.

Toxina	[M+H] ⁺	Tempo de retenção	Concentração
Anatoxina - a	166,1	8.73 min	0,05; 0,1; 0,2; e 0,5ng/mL
Cilindrospermopsina	416,1	8.10 min	
Nodularina	825,5	14.6 min	
Microcistina-RR	519,7	13.27 min	0.005; 0.05; 1 e 2ng/mL
Microcistina-LA	910	14.86 min	0.005; 0.05; 1 e 2ng/mL
Microcistina-LF	986,5	17.07 min	0.005; 0.05; 1 e 2ng/mL
Microcistina-LR	995,5	13.84 min	0.005; 0.05; 1 e 2ng/mL
Microcistina-LW	1025,5	16.93 min	0.005; 0.05; 1 e 2ng/mL
Microcistina-YR	1045,5	13.70 min	0.005; 0.05; 1 e 2ng/mL
Desmetil MC-RR	512,7	13.40 min	*
Desmetil MC-LR	981,5	13.87 min	*

* Não existe padrão comercial, porém as respectivas massas foram investigadas.

3. Resultados

Tabela 8: Resultados obtidos para as amostras listadas através desta técnica.

Amostra	Peso (g)	Toxina
ITEP A1	0,0506	-
ITEP 18	0,1040	-
ITEP 28	0,0499	-
ITEP 28 MC	0,0539	-
ITEP 30	0,0557	-
JUCAZ	0,0556	-
AME 10/2006	0,051	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LR e MC-YR
AME 03/2007	0,0523	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LR e MC-YR
TAQ 07/2007	0,0528	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LR e MC-YR
FOZ 01/2007	0,0537	MC-LR
LTPNA 01	0,0633	-
LTPNA 02	0,052	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LF, MC-LR, MC-LW e MC-YR
LTPNA 02 CC	0,0547	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LF, MC-LR, MC-LW e MC-YR
LTPNA 03	0,0549	-
LTPNA 05	0,0548	-
LTPNA 06	0,0512	-
LTPNA 07	0,0523	-
LTPNA 08	0,0592	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LF, MC-LR, MC-LW e MC-YR
LTPNA 09	0,0532	DMC-RR, MC-RR, DMC-LR, MC-LF, MC-LR, MC-LW e MC-YR
LTPNA 10	0,0534	-
SPIRULINA A	0,0644	-

SPIRULINA B	0,0576	-
SPIRULINA C	0,0660	-
SPIRULINA D	0,0503	-
SPIRULINA E	0,0619	-
SPIRULINA F	0,0582	-
SPIRULINA G	0,0591	-

- DMC - (desmetil-microcistina) DMC-RR e DMC-LR ,
- MC- (Microcistinas) - MC-RR, , MC-LF, MC-LR, MC-LW e MC-YR

Em todas as amostras analisadas não foi detectada a presença de cillindrospermopsina, anatoxina-a e nodularina. Nas amostras AME I (10/2006), AMEII (03/2007), TAQ(07/2007), LTPNA 02, 02CC, 08 e 09 foram detectadas diferentes variantes de microcistinas, que por sua vez foram re-analizados por outra técnica a fim de serem quantificadas (**Parte 2**).

4. Referências

1. Hiller, S, Krock, Cembella, A e Luckas, B. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.42, p.1238-1250. 2007.
- 2- Chorus, I e Bartram, J. **Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3.ed.: Publisher on behalf of WHO – World Health Organization. 1998.
- 3- Van Apeldoorn, Van Egmond. H.P., Speijers, G.J. e Bakker, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutritional Food Research**. V.51, n.1, p.7-60.2007.
- 4- Rodriguez, V., Yonamine, M. e Pinto, E. Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solid-phase microextraction and gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 29, p 5. 2006.
5. Dawson, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36 (7). P. 953-962. 1998.
6. Msagati, T.A.M., Siame, B..A. e Shushu, D.D. Evaluation of methods for isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**,v. 78 (4). P.382-397. 2006.
7. Sivonen, K. Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, V. 35 (6). P.6. 2006.

PARTE 2

Análise e quantificação de microcistinas

1. Introdução

As microcistinas constituem uma família de cianotoxinas, que são hepatotóxicas e produzidas por diversos gêneros de cianobactérias, como *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* (cianobactéria terrestre), *Synechocystis* e *Lyngbya*^{1, 2}.

A primeira microcistina foi isolada em meados de 1978 por Elleman *et. al.* da espécie *Microcystis aeruginosa*. Descrita como um heptapeptídeo cíclico com massa molecular variando entre 800 a 1100³. Hoje, porém sabe-se que a massa molecular de cada uma das variantes desta molécula pode estar entre 500 e 4000Da⁴. A estrutura básica da microcistina é a sua forma mais encontrada na natureza e pode ser denominada como ciclo (D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), Conforme figura 2, onde **D-MeAsp** é o ácido D eritro-beta-metilaspártico (3), **Adda** é ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6dienóico (5) e **Mdha** é N-metildeidroalanina (7). Onde **X** e o **Z** são L-aminoácidos que podem variar. **R¹** e **R²** são H (hidrogênio) ou CH₃ (grupamento metil). A estrutura das microcistinas envolve cinco aminoácidos praticamente invariáveis, D-alanina(1), ácido D-metilaspártico(3), Adda(3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6dienóico)(5), ácido D-glutâmico (6) e N-metildeidroalanina (7); e também por dois aminoácidos variáveis (2 e 4)⁵(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)[16][16](SIVONEN, 2006)(SIVONEN, 2006)

Figura 2: A - Esquema da estrutura molecular da microcistina.

Existem 77 variantes diferentes de microcistinas isoladas e identificadas. Além das variações nos aminoácidos das posições 2 e 4, é bastante comum a ocorrência desmetilações nos aminoácidos das posições 3 e 7, além de outras variações como desmetilação ou acetilação no carbono 9 do aminoácido ADDA, substituição do D-alanina ou metildeidroalanina por D-serina e N-metilserina, respectivamente e outras alterações estruturais da molécula⁶.

A nomenclatura das variantes é feita acrescentando-se um sufixo de duas letras que correspondem aos aminoácidos das posições 2 e 4. Outras variações estruturais são representadas como prefixo. Como exemplo, a variante [D-Asp³,Dha⁷]MC-RR representa desmetilação nas posições 3 e 7 e duas argininas nas posições 2 e 4⁷.

A toxicidade das microcistinas representada em DL₅₀ fica entre 50µg/kg até 1200 µg/kg, dependendo da variante da molécula. A toxicidade da microcistina-LR pela via intraperitoneal é de 50µg/kg em ratos e por via oral é 5000µg/kg a 10000µg/kg dependendo da espécie de ratos. A toxicidade de outras microcistinas (MC), como MC-LA, MC-YR, e MC-YM é semelhante à MC-LR, mas outras como a MC-RR por via intraperitoneal o DL₅₀ é dez vezes maior que a -LR³.

A presença do aminoácido Adda é essencial para a expressão da atividade biológica dessa cianotoxina. Exceto algumas microcistinas hidrofóbicas, a maioria não penetra diretamente a membrana lipídica animal, vegetal ou das bactérias. Sua entrada nas células ocorre através dos transportadores de membrana, como exemplo o transportador de ácido biliar em hepatócitos. Este é o motivo pelo qual o fígado é o órgão primário para exposição e intoxicação por microcistinas⁸(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)[24][24](KUJBIDA *et al.*, 2008)(KUJBIDA *et al.*, 2008)

O mecanismo de ação da toxina em mamíferos se dá através da ligação covalente formada entre o resíduo Mdha da microcistina e a serina/treonina das proteínas fosfatases 1 e 2^a. A presença do Adda promove então a inibição da atividade destas enzimas. Ocorrem a hiperfosforilação, cuja consequência direta é a despolarização de filamentos intermediários e microfilamentos dos hepatócitos, que leva a desorganização do citoesqueleto, perda da integridade da membrana, dilaceração celular, necrose e sangramento intra-hepático, os quais podem levar a morte por choque hemorrágico. Outros eventos relacionados são peroxidação lipídica, fragmentação de DNA, estresse

oxidativo. A hiperfosforilação também é o mecanismo responsável pela promoção tumoral observada em baixas doses de exposição crônica, devido a formação de nódulos associados às mudanças morfológicas dos hepatócitos e também a inativação de produtos supressores de genes tumorais, como o retinoblastoma e P53 ⁹.

2. Metodologia

2.1 Amostras analisadas

As amostras analisadas na etapa anterior e positivas para microcistinas foram submetidas à nova análise com este diferente método.

Tabela 1. Relação das amostras analisadas

Amostra	Descrição
LTPNA01	<i>Microcystis protocystis</i>
LTPNA02	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA02 CC	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA 03	<i>Microcystis protocystis</i>
LTPNA 06	<i>Pseudoanabaena sp</i>
LTPNA 08	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 09	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>
AME I 2006	<i>Bloom</i>
AME II 2007	<i>Bloom</i>
FOZ 2007	<i>Bloom</i>
TAQ 2007	Amostra de água

2.2 Preparo das amostras

O preparo das amostras para esta técnica é o mesmo descrito na **Parte 1**.

2.3. Condições cromatográficas

2.3.1. Fase móvel:

A – 100mL Solução estoque completar para 1000mL com água.

B – 100mL solução estoque completar com 1000mL de Acetonitrila.

Solução estoque: 53nM Ácido fórmico e 5mM formiato de amônio em água.

2.3.2 Coluna – Luna (C18)(2)

2.3.3. Fluxo - 300µL/min

2.2.4. Padrões analíticos utilizados:

Tabela 2. Padrões analíticos utilizados nas análises.

Toxina	[M+H] ⁺	Tempo de retenção	Concentração
Microcistina-RR	519,7	8.15 min	0,05; 0,5; 1; 2; 10 e 20ng
Micorcistina-LF	986,5	14.34 min	0,05; 0,5; 1; 2; 10 e 20ng
Microcistina-LR	995,5	9.52 min	0,05; 0,5; 1; 2; 10 e 20ng
Microcisitina-LW	1025,5	14.04 min	0,05; 0,5; 1; 2; 10 e 20ng
Microcistina-YR	1045,5	9.42 min	0,05; 0,5; 1; 2; 10 e 20ng
Desmetil MC-RR*	512,7	8.02 min	*
Desmetil MC-LR*	981,5	9.21 min	*

* Não existe padrão comercial, porém as respectivas massas foram analisadas.

3. Resultados:

Tabela 4. Resultados das quantificações das amostras

Amostras	Concentração ngMC/mg amostra						
	MC-RR	MC-LF	MC-LR	MC-LW	MC-YR	Desm MC-RR	Desm MC-LR
LTPNA01	-	-	-	-	-	-	-
LTPNA02	680,48*	13,37	224,70*	10,6	46,58	11,8	13,13
LTPNA02 CC	599,47*	18,56	232,68*	20,04	58,24	16,3	15,23
LTPNA 03	-	-	-	-	-	-	-
LTPNA 06	-	-	-	-	-	-	-
LTPNA 08	276,68*	8,02	54,76*	32,15	24,59	5,65	7,53
LTPNA 09	359,07*	8,08	134,83*	6,98	49,09	12,58	18,55
LTPNA 10	-	-	-	-	-	-	-
AME I 2006	203,07*	-	38,94*	-	13,72	3,02	1,7
AME II 2007	226,79*	-	60,85*	-	19,65	2,94	6,42
FOZ 2007	-	-	0,56	-	-	-	-
TAQ 2007	0,4	-	3,34	-	5,6	1,29	5,49

*Resultado de amostras que foram diluídas para possibilitar a quantificação dentro do limite máximo de quantificação

Das amostras analisadas anteriormente, as que demonstraram presença de toxinas foram reanalisadas por este método. Assim como as amostras que apresentaram picos em tempos de retenção próximos aos picos dos padrões analíticos durante a análise de multitoxinas. Este método permitiu a quantificação e caracterização das variantes de microcistinas presentes em diferentes amostras, tanto nas cepas isoladas de cianobactérias, como nas amostras de Bloom e água de reservatórios brasileiros.

As cepas LTPNA 02, LTPNA 02CC, LTPNA 08, LTPNA 09 produzem sete variantes diferentes de microcistinas: MC-RR, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-YR, desmetilMC-LR e demetilMC-RR. As amostras de bloom (Americana, em ambas datas 2006 e 2007) e amostra de água do reservatório de Taquacetuba revelaram conter cinco variantes de microcistinas: MC-LR, MC-RR, MC-YR e as duas variantes –LR e –RR desmetiladas. O material proveniente do reservatório de Foz do Areia também revelou presença de MC-LR.

Com a análise dos padrões analíticos e a curva de calibração, foi possível realizar a quantificação das amostras.

4. Referências:

1. Dawson, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36 (7). P. 953-962. 1998.
2. Msagati, T.A.M., Siame, B..A. e Shushu, D.D. Evaluation of methods for isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**,v. 78 (4). P.382-397. 2006.
3. Chorus, I e Bartram, J. **Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3.ed.: Publisher on behalf of WHO – World Health Organization. 1998.
4. Van Apeldoorn, Van Egmond. H.P., Speijers, G.J. e Bakker, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutritional Food Research**. V.51, n.1, p.7-60.2007.
5. Sivonen, K. Cyanobactrrerial toxins and toxin production. **Phycologia**, V. 35 (6). P.6. 2006.
6. Furey, A., et al. Hepatotoxins: context and chemical determination, in: **Seafood and freshwater toxins**. L.M. Botana. Editor. 2008, CRC Press.
7. Carmichael, W.W., et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue green algae), **Toxicon**, V. 26(11). p 3. 1988.
8. Kujbida, P., Rodriguez, V.C.S. e Pinto, E. Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos, in: **Fundamentos de Toxicologia**. Editor: S. Oga. São Paulo: Atheneu, p. 225-240. 2008.
9. Dittman, E. e Wiegand, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, byosynthesis and impact on human affairs, **Molecular Nutrition Food Research**. V. 50 (1). P. 7-17. 2006.
10. Ellman, T.C., Falconer, I.R., Jackson, A.R.B. e Runnegar, M.T. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (=Anacystis cynea) bloom. **Australian Jounal of Biological Science**. V.31. p. 209-218. 1978.

PARTE 3

Análise de BMAA e DAB

1. Introdução

O ácido β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) é um aminoácido não proteínogênico, característico por ser neurotóxico. Possui um peso molecular de 118,13g/mol. Primeiramente isolado de sementes de *Cycas circinalis* em 1967, foi posteriormente encontrado em cepas de cianobactérias, porém esta descoberta tornou-se controversa uma vez que muitas outras pesquisas foram realizadas e não se obteve a confirmação deste composto nestes organismos¹.(KRUEGER *et al.*, 2009)(KRUEGER *et al.*, 2009)(KRUEGER *et al.*, 2009)(KRUEGER *et al.*, 2009)(KRUEGER *et al.*, 2009)

BMAA forma adutos carbamatos em organismos expostos e age como agonista de glutamato em diferentes receptores. Como resultado, eleva os níveis de cálcio intracelular em neurônios e induz a interrupção da atividade neuronal por hiperexcitação. Apesar de possuir características hidrofílicas, cruza a barreira hematoencefálica e está envolvido na etiologia do Parkinsonismo e também da esclerose lateral amiotrófica^{1,2}.

O método utilizado, conta com a etapa de hidrólise das amostras, para que possa ser também analisada a BMAA ligada à proteína. Esta etapa é feita com a adição de ácido clorídrico e aquecimento.

Figura 1. Estrutura química da BMAA

DAB é ácido 2,4 diaminobutírico, isômero da BMAA. É uma neurotoxina que foi isolada da planta *Lathyrus laifolius*². Este composto foi encontrado em cepas de cianobactérias, como *Calothrix*. Também está presente em alguns legumes e ligado a paredes celulares de bactérias. O efeito neurotóxico deste aminoácido se dá pela inibição da absorção do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) pelos neurônios e células da glia¹.

Figura 2. Estrutura química da DAB (m/z 119,1)

O fato do BMAA e DAB serem isômero contribuiu para a incerteza nas determinações anteriores dessas toxinas em cepas de cianobactérias. Por isso, novos métodos mais sensíveis e a utilização de equipamentos e técnicas mais modernas, como espectrometria de massas, auxiliarão na confirmação ou não dessas duas neurotoxinas em cepas de cianobactérias e outras amostras.

2. Métodos

2.1 Amostras analisada

Tabela 1. Relação das amostras analisadas por esta técnica.

Cepa / material	Organismo / Observação
ITEP A1	<i>Cilindrospermopsis sp</i>
ITEP 18	<i>Cilindrospermopsis raciborskii</i>
ITEP 28	<i>Cilindrospermopsis raciborskii (spiral)</i>
ITEP 30	<i>Cilindrospermopsis raciborskii (straight)</i>
JUCAZ	<i>Cilindrospermopsis sp</i>
AME I - 10/2006	Bloom – Americana Reservoir - SP
AME II - 03/2007	Bloom – Americana Reservoir - SP
TAQ - 07/2007	Amostra de água – Taquacetuba –SP
FOZ - 01/2007	Bloom – Foz do Areia - PR
Spirulina A*	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina B*	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina C*	<i>Spirulina máxima</i>
Spirulina D*	<i>Spirulina máxima</i>
Spirulina E*	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina F*	<i>Spirulina maxima</i>
Spirulina G*	<i>Spirulina sp</i>
LTPNA 01	<i>Microcystis protocystis</i>
LTPNA 02	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA 02 CC	<i>Microcystis aeruginosa</i>
LTPNA 03	<i>Microcystis protocystis</i>
LTPNA 05	- contamination -
LTPNA 06	<i>Pseudoanabaena sp</i>
LTPNA 07	<i>Geitlerinema sp</i>
LTPNA 08	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 09	<i>Microcystis sp</i>
LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>

* Produto disponível comercialmente no mercado brasileiro.

2.2 Protocolo de extração de BMAA livre

Cerca de 50mg de cada amostra liofilizada foram pesados e adicionado 1mL de Ácido Tricloroacético 0,1M. Homogeneizados em Vortex[®] por 30s, submetidos a probe ultrassônica por 1 min, novamente agitados em Vortex[®] por 30. Após estes procedimentos, as amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 15 min. Novamente agitadas no Vortex[®] por 30s. Centrifugadas a 14.000rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram separados dos pellets com seringa e agulha, e filtrados em filtro Millex[®] 45µm de poro. Os vials foram identificados e mantidos a -20°C até análise. Os pellets resultantes foram também armazenados a esta temperatura para procedimento de extração de BMAA ligada a proteína.

2.3 Protocolo de extração para BMAA ligada a proteína

Os pellets obtidos na etapa anterior, foram acondicionados por no mínimo 1h em freezer -20°C . Então foram transferir para tubo de vidro cônico. Adicionados 1mL de HCl 6M. Homogeneizados em Vortex[®] por 30s. Estas amostras foram deixadas em forno a temperatura de 110°C por 17h, devidamente tampados. Após o resfriamento das amostras, elas foram submetidas a fluxo de nitrogênio gasoso a temperatura de 40°C para secagem. Ao pellet seco, foi adicionado 1mL de metanol 100%. Foram então, homogeneizadas em Vortex[®] por 30s. O metanol adicionado foi novamente seco em nitrogênio gasoso a temperatura de 40°C. Após este procedimento, foi adicionado 1mL de água ultrapura, homogeneizado em Vortex[®] por 30s. Submetidas a banho de ultrassom por 15 min. Então foram centrifugadas por 15 min a 3.214 g. O sobrenadante foi separado com seringa e agulha e filtrado em filtro Millex[®] 45µm de poro. Acondicionadas em vials e mantidas em temperatura de -10°C até análise.

2.4 Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida, bombas LC_10AT, SIL-10AD VP autoinjeter (Shimadzu, Kyoto, Japão). O espectrometro de massas API365 operando no modo turbo íon-spray e ionização a pressão atmosférica.

2.4.1 Coluna: Luna HILic – Luna C18(2)

2.4.2 Fluxo: 1mL por minuto**2.4.3 Eluentes:**

Eluente A – 2mM formiato de amônio (pH3) em água

Eluente B – Acetonitrila/água (90/10; v/v)

2.4.4 Gradiente de concentração:

Tabela 2. Gradiente 1

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0 - 2,5	10	90
8 - 10	70	30
11 - 30	10	90

Tabela 3. Gradiente 2

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	80	20
2 - 10	50	50
11 - 30	20	80

2.4.5 Quantificação

Para a quantificação, padrões analíticos de BMAA e DAB foram utilizados nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 25 e 50ng/mL.

Esta determinação se dá por comparação das áreas dos picos nas amostras e dos padrões analíticos.

BMAA foi quantificada, utilizando a transição de massa de m/z 119.1>102.1.

DAB foi quantificada, utilizando a transição de massa de m/z 119.1>101.3.

3. Resultados

Não foi detectada a presença de BMAA em nenhuma das amostras analisadas.

Por outro lado, alguns picos compatíveis com tempo de retenção de DAB foram observados em algumas amostras. Para todas as outras amostras, os resultados foram negativos.

Tabela 4. Resultados preliminares da presença e quantificação de DAB nos extratos das amostras.

Amostras	DAB (ng/mg de amostra liofilizada)
ITEP 18	1,454*
AME I-2006	5,665
AME II - 2007	1,770
Spirulina A	3,843
Spirulina B	1,988
Spirulina C	2,673
Spirulina D	1,992
Spirulina E	3,412
Spirulina F	3,234
Spirulina G	3,237

* Abaixo do limite de quantificação

Tabela 5. Resultados preliminares da presença e quantificação de DAB nas amostras hidrolisadas.

Amostras	DAB (ng/mg de amostra liofilizada)
ITEP 18	4,302
AME I-2006	12,173

Os resultados não são conclusivos e não se pode afirmar a presença de DAB nas amostras. O método não se mostrou sensível o suficiente. Os tempos de retenção dos picos observados nas amostras foram um pouco diferente dos picos gerados pelos padrões analíticos. O que caracteriza a insensibilidade deste método. Foram adicionados padrões analíticos a algumas amostras, porém não se confirmou os resultados.

O método deve ser melhorado e as análises refeitas.

4. Referências

1. Kruger, T., Mönch, B., Oppenhäuser, S. Luckas, B. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) and DAB(2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revolute* and *Lathyrus latifolius*. **Toxicon**. V.55(2-3) p. 547-557. 2009.
2. Rosén, J. e Hellenäs, K.E. Determination of the neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). **Analyst**, V. 133(12). P.9. 2008.
3. Moura, S. , Ultramari, M.A., Paula, D.M.L., Yonamine, M. e Pinto, E. ¹H NMP determination of -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) in environmental and biological samples. **Toxicon**. V.53. p. 5. 2009.

PARTE 4

Análise de PSPs – Paralytic Shellfish Poisoning

1. Introdução

Paralytic Shellfish Poisoning (PSPs) é uma classe de toxinas que possuem uma estrutura tricíclica única com anéis de hidropurinas. Todas as toxinas que compõem esta classe, compartilham a característica de serem alcalóides carbamatos, podendo ser: alcalóides carbamatos não sulfatados – saxitoxinas e neosaxitoxinas, monossulfatados – goniatoxinas ou dissulfatados – toxinas-C. Ainda existem os derivados decarbamoil-dc(-), que podem estar presentes em nas variantes monossulfatadas e não sulfatadas. E várias novas toxinas, como Lyngbya-wollei toxins- LWTXs que também fazem parte desta classe e foram identificadas em cepas de cianobactérias¹.

O mecanismo de ação desta classe de cianotoxinas é o mesmo para todas as variantes. São consideradas neurotoxinas, pois a transmissão nervosa é bloqueada quando a toxina se liga ao sítio 1 dos canais de sódio nos neurônios, o que induz a paralisia muscular¹.

Elas são produzidas por diferentes espécies de cianobactérias: *Anabaena sp* (*A. circilanis*, *A. lemmermanie*, *A. perturbata*, *A. flos-aquae*, *A. spiroides*), *Cylindrospermopsis sp* (*C. raciborskii*), *Planktothrix sp*, *Lyngbya wollei*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *A. isatschenkoi*².

O valor médio para DL_{50} para Saxitoxina é de cerca de 263 µg/kg de peso corpóreo².

Alcalóides carbamatos não sulfatados Saxitoxina (STX)-, Neosax. (NEO),

Alcalóides carbamatos monossulfatados - Goniatoxina (GTX1 – GTX4),

Alcalóides carbamatos dissulfatados (C) /Toxina N-sulfocarbamail (B1),

Derivados decarbamoil - Toxinas decarbamail (dcGTX2,dc GTX3 e dcSTX)

Figura 1. Estrutura geral das PSPs¹.

Tabela 1. Esquema dos radicais que caracterizam cada variante desta classe de toxinas¹.

Toxina	Variação química				
	R1	R2	R3	R4	R5
STX	H	H	H	CONH ₂	OH
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
Neo STX	OH	H	H	CONH ₂	OH
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX6 (B2)	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
dcSTX	H	H	H	H	OH
dcneoSTX	OH	H	H	H	OH
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	OH

2. Métodos³

2.1 Amostras analisadas

Tabela 2. Relação das amostras analisadas

Amostras	Descrição
ITEP A1	<i>Cilindrospermopsis sp</i>
ITEP 18	<i>C. raciborskii</i>
ITEP 28	<i>C. raciborskii (espiralada)</i>
ITEP 30	<i>C. raciborskii (reta)</i>
JUCAZ	<i>Cilindrospermopsis sp</i>
TAQ 07/2007	Amostra de água
LTPNA 06	<i>Pseudoanabaena sp</i>
LTPNA 07	<i>Geitlerinema sp</i>
LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>
Spirulina A*	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina B*	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina C*	<i>Spirulina máxima</i>
Spirulina D*	<i>Spirulina máxima</i>
Spirulina E*	<i>Spirulina sp</i>
Spirulina F*	<i>Spirulina maxima</i>
Spirulina G*	<i>Spirulina sp</i>

*Amostras comercialmente disponíveis.

2.2 Extração das amostras

Foram pesadas cerca de 50mg das amostras liofilizadas e a elas, adicionado 1mL de Ácido tricloroacético 0,1M. Homogeneizadas em Vortex[®] por 30 s. Na sequência, foram submetidas por 1 min a probe ultrassônica. Novamente homogeneizadas em Vortex[®] por 30s. Então foram centrifugadas por 10 min a 14.000rpm. Os sobrenadantes foram separados com auxílio de seringas e agulhas e filtrados em filtro Millex[®] 45µm de poro.

Foi então realizado o processo de hidrólise dessas amostras. Foram separados 150µL do sobrenadante filtrado anteriormente em novo vial e a eles adicionados 37µL de HCl 1M. Homogeneizados em Vórtex[®] por 1 min. Essa solução foi colocada em bloco digestor por 90°C por 15 min. Após resfriarem, foram adicionados 75 µL de acetato de sódio 1M. Novamente homogeneizados em Vórtex[®] por 1 min. Os respectivos volumes foram colocados em Inserts[®] e posteriormente analisados em HPLC.

- O tratamento com HCl promove a conversão das toxinas N-sulfocabamoil nas correspondentes carbamoil não sulfatadas.

2.3 Condições cromatográficas

Sistema de HPLC com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência (Excitação a 330nm e emissão a 350nm).

2.3.1 Fases Móveis:

- **Eluente A:** 6mM Ácido octanossulfônico Na (2,8116g), 6mM Ácido Heptanossulfônico Na (2,6432g), 40mM fosfato de amônio (10,5648g) – Dissolver os sais em 1,8L de água MilliQ®. Ajustar pH para 7,00 com ácido fosfórico (20%(v/v)). Homogeneizar e colocar no balão volumétrico contendo 15mL de TFH. Completar volume para 2L.
- **Eluente B:** 6mM Ácido octanossulfônico Na (1,6401g), 6mM Ácido Heptanossulfônico Na (1,5419g), 40mM fosfato de amônio (6,3389g) – Dissolver os sais em 0,9L de água MilliQ®. Ajustar pH para 7,00 com ácido fosfórico (20%(v/v)). Homogeneizar e colocar no balão volumétrico contendo 10mL de TFH. Completar volume para 1L.

2.3.2 Reagentes de pré-derivatização:

- **Reagente 1** - 10 mmol/L ácido perclórico e 550 mmol/L de amônia em água (fluxo de 0,3L/min). Pesas 2,28g de Ac. Perclórico e completar para 1L.
- **Reagente 2** - Ácido nítrico - 0,75mol/L em água. Em balão volumétrico com um pouco de água MilliQ®, colocar 50mL de ácido nítrico (65%). Completar volume para 1L com água MilliQ®(fluxo de 0,4L/min)

2.4 Coluna: Luna 5u C18.

2.5 Gradiente de concentração:

Tabela 3: Gradiente de concentração dos eluentes utilizados na corrida analítica.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	100	0
15	100	0
16	0	100
50	0	100
51	100	0
72	100	0

3. Resultados

Tabela 6. Resultado da quantificação das extrações das amostras hidrolisadas.

Cepa/ Material	Quantificação (ng toxina/mg amostra)								
	GTX4	GTX1	dcGTX2	dcGTX3	GTX2	GTX3	NEO	dcSTX	STX
ITEP A1	-	-	-	-	-	-	4,827	27,338	5,356
ITEP 18	-	-	-	-	-	-	16,813	13,381	6,744
ITEP 28	-	-	-	-	-	-	19,323	83,071	22,454
JUCAZ	-	-	-	-	-	-	204,767	49,207	9,119

Para todas as amostras, foram realizados os procedimentos de hidrólise do extrato. Com a finalidade de aprofundar a investigação em outras possíveis variantes. Porém os resultados aqui demonstrados são referentes as amostras nas quais a presença da PSPs foi confirmada. Para todas as outras amostras não houve detecção de nenhuma variante.

Foram detectadas e quantificadas variantes de PSPs nas cepas ITEP A1, ITEP 18, ITEP 28 e JUCAZ . As amostras hidrolizadas não refletem a quantificação das variantes, pois neste método, as variantes N sulfocarbamoil são transformadas nas correspondentes não sulfatadas, causando desta forma uma extrapolação da quantificação dessas. A hidrólise é importante na investigação das variantes dissulfatadas, como toxina C1-4 (B1). Nestas amostras, essas toxinas não foram encontradas, portanto as quantificações das toxinas presentes nessas amostras são as correspondentes na extração sem hidrólise.

Um segundo método⁴ foi realizado para as mesmas amostras em outro equipamento de HPLC, o que confirmou os resultados obtidos neste primeiro método. A finalidade da repetição das análises foi a de confirmar e estender a investigação das variantes de PSPs em um equipamento mais sensível.

4. Referências

1. van Apeldoorn, M.E., et al., Toxins of cyanobacteria. **Mol Nutr Food Res**, 2007. 51(1): p. 7-60.
2. Chorus, I. and J. Bartram, **Toxic cyanobacteria in water - a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3.ed. ed. 2003: Publisher on behalf of WHO - World Health Organization.
3. Diener, M., et al., Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplement by application of a new HPLC/FD method. **European Food Research Technology**, 2006. 224: p. 4.
4. Diener, M., et al., Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Separation Science**, 2007. 30.

PARTE 5

Experimento de Patch Clamp

1. Introdução

Muito do que se sabe sobre as propriedades dos canais iônicos nas membranas celulares vêm de experimentos usando voltage clamp (grampo de voltagem). Em geral, o método permite o fluxo de íons pela membrana celular seja medido como corrente elétrica, enquanto a voltagem da membrana é mantida sob controle experimental com amplificação de resposta. O método foi primeiramente desenvolvido por Cole (1949) e Hodgkin et al (1952) usando o axônio gigante de lulas. Desde então muitas técnicas diferentes surgiram e as análises com voltage clamp foram extendidas para uma ampla variedade de tecidos¹.

A utilidade da técnica, e do suporte da voltage clamp primeiramente vem do fato que permite a separação da membrana iônica e a corrente gerada. E também, porque é muito mais fácil obter informações do comportamento dos canais usando medição de correntes de uma área da membrana uniforme, com voltagem controlada, do que quando a voltagem muda livremente com o tempo e em diferentes regiões da membrana. Isto ocorre especialmente com a abertura e fechamento da maioria dos canais iônicos que são afetados pelo potencial de membrana¹.

A toxina para este experimento é a anatoxina-a(S), produzida pelas cepas ITEP 25 e ITEP 26 mantidas em cultivo no banco de cianobactérias do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da FCF-USP.

A anatoxina-a(S) é um ester fosfato do ciclo N-hidroxiguanina². Produzido pelas cianobactérias *Anabaena flos-aquae* e outras espécies deste gênero, como *A. lemmermannii* e *A. oumiana*. É um alcalóide neurotóxico e blooms foram observados e reportados na América do Norte, Europa e Austrália².

A DL₅₀ da anatoxina-a(S) varia entre 20 a 50 µg kg⁻¹ peso corpóreo (i.p. camundongos)^{3,4}(MAHMOOD & CARMICHAEL, 1985; CHORUS & BARTRAM, 2003)(MAHMOOD & CARMICHAEL, 1985; CHORUS & BARTRAM, 2003)(MAHMOOD & CARMICHAEL, 1985; CHORUS & BARTRAM, 2003)(MAHMOOD & CARMICHAEL, 1985; CHORUS & BARTRAM,

2003)(MAHMOOD & CARMICHAEL, 1985; CHORUS & BARTRAM, 2003)(MAHMOOD & CARMICHAEL, 1985; CHORUS & BARTRAM, 2003)

O mecanismo de ação desta toxina se dá pela potente e irreversível inibição da acetilcolinesterase. É o único organofosforado natural que se conhece até hoje ⁵. Efeitos neurológicos observados em camundongos em doses agudas são fraqueza muscular, dispnéia e convulsões precedem a morte. A morte geralmente ocorre por depressão respiratória. Os principais sintomas da intoxicação por anatoxina-a(S) em ratos é a intensa salivação, incontinência urinária, convulsão e depressão respiratória. Estes sintomas são consequência da inibição da acetilcolinesterase periférica, o que demonstra a incapacidade da toxina atravessar a barreira hemato encefálica ⁵.

Figura 1. Estrutura química da Anatoxina-a(S) - $C_7H_{17}N_4O_4P$ (MW=252)

2. Métodos

2.1 Extração da Anatoxina-a(S)

Seguindo o método de extração sugerido por Dörr et al, a partir de material liofilizado proveniente de cepas previamente cultivadas e que tiveram sua biomassa aumentada, durante o desenvolvimento deste projeto. A cada 50mg de material liofilizado, adicionar 5mL de etanol/ácido acético 0,1M (20:80), sonicar por 1 minuto e centrifugar a 5000g por 15 minutos. O sobrenadante é eluído em cartucho C18 para a separação fase sólida, previamente condicionado com 5mL de metanol, seguido por 5mL de etanol/ácido acético 0,1M (20:80) para reter pigmentos. Secar o eluato em speed vac ⁵.

2.2 Técnica de Patch Clamp.

A técnica utilizada é a mesma descrita por Schaible et al. As células utilizadas foram neurônios de camundongos e ratos ⁶.

3. Resultados

Inúmeras tentativas foram realizadas, porém devido a problemas técnicos com o equipamento e a instabilidade das células em culturas não se pode observar nenhum efeito da toxina nos canais iônicos das membranas celulares.

Novos experimentos devem ser realizados nessa nova colaboração do projeto e aguardamos alguma resposta da continuação dos experimentos.

4. Referências

1. Halliwell, J.V., et al., **Voltage Cmap techniques, in Microelectrode techniques. The Plymouth workshop handbook.**, D.C. OGDEN, Editor. 1994, Company of Biologists: Cambridge.
2. van Apeldoorn, M.E., et al., Toxins of cyanobacteria. **Mol Nutr Food Res**, 2007. 51(1): p. 7-60.
3. Chorus, I. and J. Bartram, **Toxic cyanobacteria in water - a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3.ed. ed. 2003: Publisher on behalf of WHO - World Health Organization.
4. Mahmood, N.A. and W.W. Carmichael, The phamacology of anatoxin-a(S), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC525-17. **Toxicon**, 1985. 24(5): p. 10.
5. Dörr, F.A., et al., Methods for detection of anatoxin-a(S) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, 2009. article in press(xxx): p. 7.
6. SCHAIBLE, H.G., et al., Joint pain. *Exp. Brain. Research*, 2009. 196: p. 9.

5. Conclusão dos trabalhos realizados (Partes 1 a 5)

Nas amostras de cepas de cianobactérias brasileiras, bem como das amostras de água e bloom foram identificadas várias cianotoxinas por diferentes métodos.

É interessante observar que, com exceção das técnicas realizadas para detecção da BMAA e DAB os resultados obtidos nessas análises corroboram os resultados obtidos pelos métodos descritos no trabalho realizado no Brasil, em nosso laboratório. Todas as outras amostra confirmam as toxinas detectadas.

A detecção de outras variantes de microcistina, além das detectadas nas análises realizadas no Brasil foi possível graças a utilização de outros padrões analíticos disponíveis no laboratório da Universidade de Jena.

Também a presença de diferentes toxinas do grupo das saxitoxinas, observadas durante as análises do intercâmbio aprofunda mais o conhecimento das cepas disponíveis no laboratório. Era sabido, pelas análises realizadas anteriormente que essas cepas produziam saxitoxinas, porém o aprofundamento das análises, utilizando outros métodos proporcionou a identificação dos grupos de saxitoxinas produzidas por cada cepa analisada.

ANEXO 4 - INTERCÂMBIO NA PONTIFÍCIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE.

Projeto CNPq / CONICYT

**Universidade de São Paulo
Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas**

&

**Pontificia Universidad Católica de Chile
Laboratorio de Ecología Microbiana y Toxicología Ambiental**

Stella de Bortoli

**Fevereiro
2011**

Projeto CNPq & CONICYT

Projeto 490941/2008-7

Título do projeto: Identificação e caracterização de cianobactérias tóxicas presentes nos reservatórios do Brasil e do Chile

Instituições:

- Universidade de São Paulo

Responsável: Prof. Dr. Ernani Pinto

- Universidad Catolica de Chile

Responsável: Profa. Dr^a. Luz Mónica Vásquez Pérez

Descrição: O objetivo deste projeto é identificar, isolar e caracterizar cianobactérias tóxicas presentes em amostras de reservatórios do Estado de São Paulo (Billings, Guarapiranga e Americana) e também de reservatórios Chilenos. Desenvolver métodos analíticos e/ou bioquímicos viáveis para a detecção dessas toxinas. Além disso, realizar a identificação dos principais genes envolvidos na síntese de toxinas a fim de conhecer o perfil genético das cianobactérias sul americanas.

Duração da participação: 04/02/ 20011 a 19/02/2011

1. Experimentos desenvolvidos no Chile

1.1 Extração de DNA de cepas de cianobactérias Brasileiras, Chilenas e Argentina

1.2 Reações de PCR (*Polymerase chain reaction*) dos genes: ITS; *mcyE*, 16 S; *mcy A*; *mcyB* and *mcy AB*.

1.3 Realização de DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*) dos produtos de amplificação das reações de PCR dos genes ITS e *mcyE* .

2. Lista de amostras

	Amostra	Cepa	Organismo	Toxina
Chile	B1	RC-B1	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-YR
	B2	RC-B2	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-YR
	C1	RC-C1	<i>Anabaena-sp</i>	-
	C2	RC-C2	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-RR; MC-YR
	C3	RC-C3	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-YR
	C4	RC-C4	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-RR; MC-YR
	C5	RC-C5	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-RR; MC-YR
	C6	RC-C6	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-RR; MC-YR
	D2	RC-D2	<i>Microcystis sp</i>	MC-LR; MC-YR
	D3	RC-D3	?	-
Brazil	L1	LTPNA 01	<i>Microcystis sp</i>	-
	L2	LTPNA 02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	MC-RR, MC-YR e MC-LR, dMC-LR, dMC-RR, MC-LF and MC-LW
	L3	LTPNA 03	<i>Microcystis sp</i>	-
	L6	LTPNA 06	<i>Pseudoanabaena sp (?)</i>	-
	L7	LTPNA 07	<i>Pseudoanabaena sp (?)</i>	-
	L8	LTPNA 08	<i>Microcystis sp</i>	MC-RR, MC-YR e MC-LR, dMC-LR, dMC-RR, MC-LF and MC-LW
	L9	LTPNA 09	<i>Microcystis sp</i>	MC-RR, MC-YR e MC-LR, dMC-LR, dMC-RR, MC-LF and MC-LW
	L10	LTPNA 10	<i>Oscillatoria sp</i>	-
	L11	LTPNA 11	<i>Microcystis sp</i>	MC-RR, MC-YR e MC-LR, dMC-LR, dMC-RR, MC-LF and MC-LW
	I 18	ITEP 18	<i>Cilindrospermopsis raciborskii</i>	STX, NeoSTX, dcSTX
	I 18 N3	ITEP 18 N3	<i>Cilindrospermopsis raciborskii</i>	STX, NeoSTX, dcSTX
	I 30	ITEP 30	<i>Cilindrospermopsis raciborskii</i>	-
Argentina	Mc A	Argentina	<i>Microcystis sp</i>	???

3. Métodos e Resultados:

3.1 Extração de DNA segundo protocolo CTAB

A extração do DNA das amostras brasileiras seguiu o procedimento do protocolo de extração de *E. coli* modificado pelo Laboratorio de Ecología Microbiana y Toxicología Ambiental – PUC – Chile.

Foram centrifugados 20mL de cultura em etapa exponencial de crescimento, a 7500 rpm durante 8 min. O material resultante da centrifugação foi ressuspenso com 1 mL de água bidestilada estéril e centrifugado novamente por 1400 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi descartado.

As células foram rompidas por uma sequência de congelamento e resfriamento. Ao material celular foram adicionados 567 µL de TE 1X / NaCl 0,15M e 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL, centrifugado por 15 s. e incubado em 37°C por 1 h. Foram então adicionados 750 µL de fenol:clorofórmio:álcool isopropílico (25:24:1) e agitado no vortex por 20s. Novamente centrifugado por 5 min a 8000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo esterilizado e a ele adicionado 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitado no vórtex por 20s e centrifugado por 5 min a 8000 rpm. O sobrenadante desta etapa foi transferido para um novo tubo esterilizado. À este sobrenadante foram adicionados 450µL de isopropanol, delicadamente homogeneizado e deixado em repouso para precipitar por 15 min a -20°C. Depois deste tempo o tubo foi centrifugado a 13600 rpm a 5°C por 40 min. Desprezou-se o isopropanol e o tubo foi vertido em papel absorvente. O excedente de isopropanol foi seco em speed vac – centrifugação a vácuo em 37°C por 20 min. O material restante no tubo foi hidratado com 50 µL de água bidestilada e permaneceu em banho maria por 20 min a 45°C.

Este produto, que corresponde ao DNA extraído foi colocado em gel de agarose 1% em TAE, para atestar a presença e qualidade do DNA.

3.1.1 Qualidade e integridade do DNA isolado

Foi preparado gel de agarose 1% em TAE. 3 μ L amostra com 1 μ L de tampão ladder foi colocada em cada poço. O gel foi submetido à corrente de 100 V por 25 min em cuba de eletroforese, submerso em TAE.

Para visualização das bandas no transiluminador, foi preparado corante Red Gel 1X (100 mL H₂O + 10 μ L corante Red Gel), colocado num recipiente plástico e coberto com papel alumínio. Este recipiente permaneceu sobre delicada agitação por 12 minutos. Após isso, o gel foi observado no transiluminador.

Figura 1: Gel de agarose 1% com o DNA das amostras brasileiras.

3.2 PCRs

3.2.1 Reação de PCR – ITS¹

- *Primers* de ITS

Amplicon com tamanho bastante variável, porém cerca de 550pb.

Primer	Sequência
CSI F GC	5'-GYC ACGCCC GAA GTC RTT AC-3'*
340 R	5'-CTA ACC ACC TGA GCT AAT-3'

* seguido de uma sequência de 40 nucleotídeos GC que servirão de grampo para reações de DGGE.

- PCR

Reagente	MIX (24,5 rx)	1 RX
Buffer 10x	73,5	3
MgCl ₂ 2M	29,4	1,2
dNTPS	36,75	1,5
Primer F	36,75	1,5
Primer R	36,75	1,5
TAQ	5,88	0,24
H ₂ O	491,47	20,06

- Parâmetros da PCR – ITS

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	5 min	1
94	1 min	2
60	1 min	
72	40 s	2
94	1 min	
59	1 min	2
72	40 s	
94	1 min	2
58	1 min	
72	40 s	2
94	1 min	
57	1 min	2
72	40 s	
94	1 min	2
56	1 min	
72	40 s	2
94	1 min	
55	1 min	2
72	40 s	
94	1 min	2
54	1 min	
72	40 s	2
94	1 min	
53	1 min	2
72	40 s	
94	1 min	2
52	1 min	
72	40 s	12
52	1 min	
72	10 min	1

- **Gel de Agarose**

Gel de agarose 2%. 90 V e 30 min. Corado em solução de Red Gel por 15 min sob agitação. (Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µL de tampão DNA Ladder)

- **Resultados:**

Os fragmentos esperados foram amplificados e visíveis. Os ITS de *Microcystis sp* se mostram em uma banda, enquanto os ITS de *Anabaena sp* e *Oscillatoria sp*, com 2 ou mais bandas. Como podem ser vistos no gel abaixo. Controle negativo não amplificou. As amostras B2 e L7 não amplificaram.

Figura2: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com iniciadores do gene ITS.

3.2.2 Reação de PCR – *mcyE*^{2,3}

- Primers de *mcy E***

HEP – Domínio aminotransferase - amplicon de 472 pb

Primer	Sequência
HEP F GC*	5'-TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC-3'
HEP R	5'-AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT-3'

* seguido de uma sequência de 40 nucleotídeos GC que servirão de grampo para reações de DGGE.

- PCR**

Reagente	MIX (24,5 rx)	1 RX
Buffer 10x	73,5	3
MgCl ₂ 1,5M	22,05	0,9
dNTPS	36,75	1,5
Primer F	36,75	1,5
Primer R	36,75	1,5
TAQ	5,88	0,24
H ₂ O	513,52	20,96

- Parâmetros PCR**

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	2 min	1
92	50 s	35
52	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	HOLD

- Gel de Agarose**

Gel de agarose 2% 90 V e 30 min. Corado em solução de Red Gel por 15 min sob agitação. (Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µL de tampão DNA Ladder).

- Resultados:**

-

Pode ser visto a amplificação dos fragmentos do gene *mcyE* nas amostras B1, B2, C1, C2, C3, C4, C5, C6, D2, D3. Também nas amostras L2, L6 (não esperado), L8, L9 e L11. Também na amostra Mcy 2 Argentina. A amplificação da amostra L6 provavelmente é proveniente de uma contaminação da amostra com material de *Microcystis sp.* As amostras LTPNA que não amplificaram, realmente não são produtoras de microcistinas e a observação destes resultados corrobora as análises de toxina e mostram que as cepas estão bem isoladas. O gel de agarose pode ser visto na figura 3.

Figura 3: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com iniciadores do gene *mcyE*.

3.2.3 Reação de PCR – 16S^{2,4}

- Primers de 16s**

Primer	Sequência
CYA 781 a	5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3'
CYA 781 b	5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'
CYA 106 F GC	5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'

- PCR**

Reagente	MIX (19,5 rx)	1 RX
Buffer 10x	58,5	3
MgCl ₂ 1,5M	17,55	0,9
dNTPS	29,25	1,5
Primer 1	29,25	1,5
Primer 2	29,25	1,5
Primer 3	29,25	1,5
TAQ	4,68	0,24
H ₂ O	397,02	20,36

- Parâmetros PCR**

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	5 min	1
92	1 min	35
52	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	HOLD

- Gel de agarose:**

2%; 90V, 30 min – corar em solução de Red Gel por 15 min sob agitação.

(3 µL de Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µgota de tampão DNA Ladder)

- **Resultados:**

As amplificações foram visíveis após corar o gel. A amostra LTPNA 02 não amplificou e novo PCR foi realizado, usando como parâmetros do termociclador o Touch Down (conforme descrito na sequência). O gel referente às reações pode ser visto abaixo, na figura 4.

A intenção deste experimento foi amplificar a sequência 16S rRNA das amostras a fim de obter produto para um experimento DGGE. Um DGGE destes produtos foi realizado, porém o gel demonstrou bandas disformes não condizentes com os produtos esperados, por isso esses resultados não foram incluídos neste anexo. Infelizmente, por falta de tempo hábil, não foi possível repetir estes experimentos.

Figura 4: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com iniciadores do gene *16S rRNA*.

3.2.4. PCR 16s – touch Down para amostra LTPNA 02

- **Primers de 16s** – mesmos descritos anteriormente
- **PCR** – mesma descrita anteriormente
- **Parâmetros PCR**

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	5 min	1
94	1 min	2
60	1 min	
72	50 s	
A temperatura de anelamento diminui 1°C a cada 2 ciclos até 52°C		
72	50 s	12
94	1 min	
52	1 min	
72	50 s	1
52	1 min	
72	10 min	

- **Amostras:**

LTPNA 02 – 3 concentrações: (A) 1 µL (dil 1 µL DNA : 9 µL água); (B) 1 µL e (C) 2 µL.

- **Gel de agarose:**

Gel de agarose 2%; 90V, 30 min – corar em solução de Red Gel por 15 min sob agitação. (3 µL de Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µgota de tampão DNA Ladder).

- **Resultados:**

Houve amplificação na amostra mais diluída. Demonstra que o excesso de DNA pode inibir a reação de amplificação em alguma de suas etapas. O gel pode ser visualizado a seguir:

Figura 4: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR da amostra LTPNA 02 em diferentes diluições com iniciadores do gene *16S rRNA*.

3.2.4 Reação de PCR – *mcyA*⁵

- Primers de *mcy A***

Amplicon de 300 pb

Primer	Sequência
<i>mcy A</i> cd 1 F	5'- AAAATTAAAAGCCGTATCAAA-3'
<i>mcy A</i> cd 1 R	5'- AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'

- PCR**

Reagente	MIX (15,8 rx)	1 RX
Buffer 10x	47,4	3
MgCl ₂ 1,5M	14,22	0,9
dNTPS	23,7	1,5
Primer F	23,7	1,5
Primer R	23,7	1,5
TAQ	3,792	0,24
H ₂ O	331,168	20,96

- Parâmetros PCR**

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	5 min	1
95	1 min	30
50	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	HOLD

- Gel de Agarose:**

Gel de agarose 2% - 90 V e 30 min. Corado em solução de Red Gel por 15 min sob agitação. (Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µgota de tampão DNA Ladder)

- Resultados:**

A visualização dos fragmentos amplificados ficou um pouco comprometida na foto deste gel, demonstrado na figura 6. A observação do gel no transiluminador permitiu a identificação do produto de amplificação nas amostras L2, L6, L8, L9, L11 e C6. Com exceção da L6, todas as outras são produtoras de microcistinas, o que possivelmente confirma a presença deste fragmento do gene *mcyA*.

Figura 5: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com iniciadores do gene *mcyA*.

3.2.5 Reação de PCR – *mcvB*⁵

- Primers de *mcvB***

Amplicon de 955 pb

Primer	Sequência
2156 F	5'-ATCACTTCAATCTAACGACT-3'
311 R	5'-AGTTGCTGCTGTAAGAAA-3'

- PCR**

Reagente	MIX (15,8 rx)	1 RX
Buffer 10x	47,4	3
MgCl ₂ 1,5M	14,22	0,9
dNTPS	23,7	1,5
Primer F	23,7	1,5
Primer R	23,7	1,5
TAQ	3,792	0,24
H ₂ O	331,168	20,96

- Parâmetros PCR**

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	5 min	1
95	1 min	30
50	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	HOLD

- Gel de Agarose:**

Gel de agarose 2%. 90 V e 30 min. Corado em solução de Red Gel por 15 min sob agitação. (Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µL de tampão DNA Ladder).

- Resultados:**

As amostras LTPNA 02, 06, 08, 09 e 11, mc Arg e C6 demonstram claramente a presença desta parte do gene. As bandas respectivas podem ser vistas no gel abaixo:

Figura 5: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com iniciadores do gene *mcvB*.

3.2.6 Reação de PCR – *mcyAB*⁵

- Primers de *mcy AB***

Amplicon de 541 pb

Primer	Sequência
135 F	5'- GACTTATAGCCATCTCATCT-3'
676 R	5'- TTGACGCTCTGTTTGTAA-3'

- PCR**

Reagente	MIX (15,8 rx)	1 RX
Buffer 10x	47,4	3
MgCl ₂ 1,5M	14,22	0,9
dNTPS	23,7	1,5
Primer F	23,7	1,5
Primer R	23,7	1,5
TAQ	3,792	0,24
H ₂ O	331,168	20,96

- Parâmetros PCR**

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	5 min	1
95	1 min	30
50	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	HOLD

- Gel de Agarose:**

Gel de agarose 2% - 90 V e 30 min. Corado em solução de Red Gel por 15 min sob agitação. (Ladder 100bp; 5 µL amostra + 1 µL de tampão DNA Ladder)

- Resultados:**

As cepas LTPNA 08,09 e 11, bem como a C6 apresentam este fragmento de gene. Como pode ser visto no gel abaixo:

Figura 5: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com iniciadores do gene *mcyab*.

3.3 DGGE

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) é um método de caracterização molecular, como uma impressão digital única da amostra. Este método separa os produtos de DNA provenientes de uma reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase chain reaction*)^{6,7}.

O DGGE é um método mais descritivo que o PCR, pois separa os produtos de PCR baseado nas diferenças das sequências amplificadas, resultantes de uma denaturação diferencial, característica do DNA analisado. Durante a DGGE, os produtos de PCR enfrentam concentrações crescentes de denaturantes químicos enquanto migram através do gel de poliacrilamida. Quando encontram o limite da concentração do denaturante, os domínios mais fracos da dupla fita do produto da PCR começarão denaturar enquanto o tempo de migração diminui drasticamente. Sequências diferentes de DNA (de cepas diferentes) irão denaturar a concentrações de denaturação também diferentes, resultando num padrão de bandas distinto. Uma vez gerado este padrão, as impressões digitais estabelecidas podem formar uma base de dados que determina as diferenças nas estruturas dos DNA entre ambientes diferentes ou tratamento diferentes. Além disso, a quantidade de *primers* de PCR disponíveis podem ser usadas para investigar relações filogenéticas ou alvos específicos como patógenos ou xenobióticos^{6,7}.

3.3.1 Preparo das soluções denaturantes e do gel de acrilamida.

- **Solução 0% denaturante:** 20 mL Acrilamida (30% acrilamida/Bis 37,5/1), 5 mL 20X TAE, 75 mL água.
- **Solução 80% denaturante:** 20 mL Acrilamida (30% acrilamida/Bis 37,5/1), 5 mL 20X TAE, 33,6g urea, 32 mL formamide deionizada, QSP 100mL água (Colocar 10mL de água antes dos outros reagentes).

As soluções foram filtradas em filtros estéreis de 20µm de poro, para eliminar os cristais de uréia.

3.3.2 Preparo do gel para as PCR ITS e PCR *mcvE*

Para ITS (~550 pb) – Gradiente de denaturante – 40% a 60%

Para *mcv B* (~472 pb) – Gradiente de denaturante – 45% – 75%

- Corrida em cuba específica: 60°C ; 75V ; 16h

ITS	High (60%)	Low (40%)	Topo (0%)
80% denaturante	9 mL	6 mL	-
0% denaturante	3mL	6 mL	15 mL
TEMED	12 µL	12 µL	15 µL
APS	60 µL	60 µL	75 µL

Mcy E	High (75%)	Low (45%)	Topo (0%)
80% denaturante	10,38 mL	6,75 mL	-
0% denaturante	2,65mL	5,25 mL	15 mL
TEMED	12 µL	12 µL	15 µL
APS	60 µL	60 µL	75 µL

O gel foi preparado instantaneamente ao se adicionar o APS, que solidifica a acrilamida. O TEMED age como catalisador dessa reação. Para formar o gel gradiente usou-se agitador magnético no misturador dos denaturantes e bomba peristáltica para permitir o preenchimento das câmaras entre placas de vidro especial.

Depois de se preparar o gel as quantidades de produto resultantes da PCR foram calculadas para não sobrecarregar o gel. No ladder, a banda relativa a 500pb equivale a 57,5ng. Foram adicionados a 5 µL de buffer de carga para gel de acrilamida, os seguintes volumes das reações de PCR respectivamente:

ITS PCR			
RC C1	5 µL	LTPNA 03	20 µL
RC C2	7 µL	LTPNA 06	20 µL
RC C3	20 µL	LTPNA 08	20 µL
RC C4	10 µL	LTPNA 09	20 µL
RC C5	20 µL	LTPNA 10	20 µL
RC C6	10 µL	LTPNA 11	20 µL
RC D2	10 µL	ITEP 18	20 µL
RC D3	7 µL	ITEP 18 N3	20 µL
LTPNA 01	10 µL	ITEP 30	20 µL
LTPNA 02	20 µL	MCY Argentina	20 µL

* Ladder de 1Kb

MCY E PCR	
RC B1	20 µL
RC C1	20µL
RC C3	20 µL
RC C4	20 µL
LTPNA 02	20 µL
LTPNA 06	20 µL
LTPNA 08	10 µL
LTPNA 09	10 µL
LTPNA 11	10 µL
MCY 2 Arg	20 µL

O gel foi retirado da câmara e corado com Syber Gold, colocado no transiluminador e as bandas formadas foram comparadas. As bandas são cortadas e colocadas em 20 µL de água para PCR. Para serem enviadas ao serviço de seqüenciamento.

3.4 Resultados

3.4.2 ITS

Figura 6: gel de acrilamida com os produtos de reação da PCR com iniciadores do gene ITS.

Neste experimento foi possível perceber visualmente que algumas cepas são muito semelhantes. Para este gene o produto de amplificação da cepa da Argentina é bastante similar às cepas brasileiras LTPNA 01 e 03, que não são produtoras de microcistinas. O fragmento observado também é muito parecido com a cepa Chilenas C1, uma *Anabaena* sp.

Também há similaridade entre as cepas Brasileiras produtoras de microcistinas (LTPNA 02, 08, 09 e 11). As cepas *Cillindrospermopsis* sp (ITEP 18, 18N3 – produtoras de saxitoxina) parecem ser o mesmo organismo, porém diferentes da outra cepa *Cillindrospermopsis* sp, ITEP 30, que não é produtora de toxinas.

Para confirmar estes resultados e obter uma precisão na comparação das sequências, algumas bandas formadas neste gel foram enviadas para serviços de seqüenciamento

3.4.3 *mcyE*

Figura 7: DGGE em gel de acrilamida com os produtos de reação da PCR com iniciadores do gene *mcyE*.

Este gel com gradient denaturante em acrilamida mostra que a amplificação dos produtos de PCR do gene *mcyE* com uma calda CG são do mesmo tamanho nas cepas Brasileiras produtoras de microcistinas (LTPNA02, 08, 09 e 11).

A mesma similaridade é vista nas cepas Chilenas produtoras de microcystinas (RC-B1, RC-C1 e RC-C3). Para este gene, a cepa argentina parece ser mais parecida com as cepas do Chile.

É possível que o DNA da cepa LTPNA 06 esteja contaminado. É uma cepa de *Pseudoanabaena sp* que já foi testada várias vezes para diversas toxinas e nunca foi produtora.

Para confirmar a similaridade dos produtos de amplificação, algumas bandas foram enviadas para seqüenciamento.

Tabela 1: Tamanho aproximado em pares de base dos produtos de amplificação gerado nas reações de PCR

Produtos de amplificação da PCR							
Amostra	Cepa	ITS	<i>mcyE</i>	16s	<i>mcy A</i>	<i>mcy B</i>	<i>mcy ab</i>
B1	RC-B1	1000bp e 600bp	500 bp	-		-	-
B2	RC-B2	NA*	500 bp	-		-	-
C1	RC-C1	800bp e 500bp	500 bp	700 bp		-	-
C2	RC-C2	600 bp	500 bp	700 bp		-	-
C3	RC-C3	600bp	500 bp	-		-	-
C4	RC-C4	600 bp	500 bp	-		-	-
C5	RC-C5	600 bp	500 bp	-		-	-
C6	RC-C6	600 bp	500 bp	700 bp		OK	OK
D2	RC-D2	600 bp	500 bp	700 bp		-	-
D3	RC-D3	400bp e 700bp	500 bp	700 bp		-	-
L1	LTPNA 01	600 bp	NA	700 bp		NA	NA
L2	LTPNA 02	600 bp	500 bp	(10X dil) 700 bp		OK	NA
L3	LTPNA 03	600 bp	NA	700 bp		NA	NA
L6	LTPNA 06	600 bp	500 bp	700 bp		NA	NA
L7	LTPNA 07	NA	NA	700 bp		NA	NA
L8	LTPNA 08	600 bp	500 bp	700 bp		OK	OK
L9	LTPNA 09	600 bp	500 bp	700 bp		OK	OK
L10	LTPNA 10	400bp e 700 bp	NA	700 bp		NA	NA
L11	LTPNA 11	600 bp	500 bp	700 bp		OK	OK
I 18	ITEP 18	600bp e 400bp	NA	700 bp		NA	NA
I 18 N3	ITEP 18 N3	600bp e 400bp	NA	700 bp		NA	NA
I 30	ITEP 30	600bp e 400bp	NA	700 bp		NA	NA
Mc A	Argentina	600bp	500 bp	700 bp		OK	NA

*NA – Não amplificou

4. Referências Bibliográficas:

1. Janse, I., Kardinaal, W.E.A., Meima, M., Fastner, J., Visser, P.M. e Zwart, G. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. **Applied and Environmental Microbiology**. V.70 (7). p 3979-3987. 2004.
2. Amer, R., Díez, B. e El-Shehawy, R. Diversity of hepatotóxica cyanobacteria in the Nile Delta, Egypt. **Journal of Environmental Monitoring**. V.11. p.126-133. 2009.
3. Jungblut, A-D. e Neilan, B. A.Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. **Archives of Microbiology**. V.185.p. 107-114. 2006.
4. Nübel, U., Garcia-Pichel, F. e Muyzer, G. PCR *primers* to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. V.63. (8). p. 3327-3332. 1997.
5. Valério, E., Chambel, L. Paulino, S. Faria, N. Pereira, P. e Tenreiro, R. Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. **Environmental Toxicology**. 2009.
6. Ercolin, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiology Methods**. V. 56. .p 297-314, 2004.
7. Muyzer, G. e Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**. V. 73. P. 127-141. 1998.

ANEXO 5 – DISCIPLINAS CURSADAS

Faculdade de Ciências Farmacêuticas**ATESTADO**

Atestamos, para os devidos fins que, até o dia 04/06/2011, o(a) senhor(a) Stella de Bortoli, de número USP 5843441, cursou a(s) disciplina(s) abaixo na qualidade de aluno(a) regular do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Disciplina: Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas

Sigla: FBC5813-2/1 Carga Horária: 60 Conceito: A Frequência: 85 Créditos: 4

Início: 26/02/2007 Término: 01/04/2007

Disciplina: Seminários Gerais em Toxicologia I

Sigla: FBC5802-1/1 Carga Horária: 30 Conceito: A Frequência: 100 Créditos: 2

Início: 14/03/2007 Término: 27/06/2007

Disciplina: Aprimoramento Didático

Sigla: FBA5728-2/5 Carga Horária: 60 Conceito: A Frequência: 86 Créditos: 4

Início: 05/06/2007 Término: 02/07/2007

Disciplina: Metodologias "Omics" para Estudos Toxicológicos

Sigla: FBC5815-1/2 Carga Horária: 30 Conceito: A Frequência: 100 Créditos: 2

Início: 22/04/2008 Término: 28/04/2008

Documento emitido às 14:59:07 horas do dia 04/06/2011 (hora e data de Brasília).

Código de controle: 49WN - J8NE - JPWZ - E691

Código de controle válido até: 04/06/2012

Página 1 de 2

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Aluno: Stella de Bortoli, número USP 5843441

Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Disciplina: Toxicologia Forense

Sigla: FBC5747-1/4 Carga Horária: 75 Conceito: A Frequência: 90 Créditos: 5

Início: 15/04/2008 Término: 19/05/2008

Disciplina: Fundamentos de Biologia Molecular Bacteriana

Sigla: BMM5803-2/1 Carga Horária: 60 Conceito: A Frequência: 91 Créditos: 4

Início: 06/05/2009 Término: 17/06/2009

Disciplina: Tópicos em Análises Clínicas I

Sigla: FBC5793-9/1 Carga Horária: 30 Conceito: A Frequência: 87 Créditos: 2

Início: 23/03/2009 Término: 05/07/2009

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo:
<http://sistemas.usp.br/webdoc>

Documento emitido às 14:59:07 horas do dia 04/06/2011 (hora e data de Brasília).

Código de controle: 49WN - J8NE - JPWZ - E691

Código de controle válido até: 04/06/2012

Página 2 de 2

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO DE BOTÂNICA

Av. Miguel Estéfano, 3687 - Água Funda - 04301-012 - SP
 Fone: (0xx11) 5073-2860 - Pabx: (0xx11) 5073-6300 - Fax: (0xx11) 5073-3678

Curso Reconhecido
 de acordo com o disposto
 na Portaria MEC n.º 2.879
 de 24/06/2007, D.O.U. de
 26/06/2007.

**CERTIFICADO DE ESTUDOS REALIZADOS SOB REGIME DE ESTUDANTE
 ESPECIAL
 DISCIPLINAS CURSADAS EM NÍVEL DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

Nome: Stella de Bortoli
 R.G. 4.948.827-0
 Nacional: Brasileira

Data de Nasc: 11/11/1979
 Natural de: Paraná

Sexo: Fem

Período	Código	Descrição	Conceito	CH	Crd
16/07 a 27/07/07	PAF 03	Cyanobacteria biologia e ecologia - Dra. Célia L. Sant'Ana	A	120	8

Carga Horária total completada: 120 horas/ aula, correspondentes a 8 créditos

CH = Carga Horária 120

Crd = Número de Créditos 8

Significado dos conceitos:

A= excelente; B= bom; C= regular; D= insuficiente; P= Aprovado; E= reprovado; I= incompleto; J= abandono justificado; T= transferência; F=: disciplina freqüentada em outro curso reconhecido (nome do curso).

PG. IBt., aos 3 de setembro de 2007.

 Marcia Regina Angelo
 Secretária Geral

 Dra. Sonia M. C. Dietrich
 Coordenadora da Comissão de Pós-Graduação

ANEXO 6 - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil)

Viviane Moschini-Carlos^{1,*}, Stella Bortoli³, Emani Pinto³, Paula Yuri Nishimura², Leandro Gomes de Freitas¹, Marcelo L. M. Pompêo², and Felipe Dörr³

¹ São Paulo State University-UNESP, Department of Environmental Engineering, 3 de Março Avenue n. 511, PO Box: 18087-180, Sorocaba, São Paulo State, Brazil.

² University of São Paulo, Institute of Biociências, Department of Ecology, Rua do Matão, Trav. 14, n° 321, PO Box 05508-900, São Paulo-SP, Brazil

³ University of São Paulo, Laboratory of Toxin and Algae Natural Products, School Pharmaceutical Sciences, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, PO Box 05508-900, São Paulo-SP, Brazil.

* Corresponding author: viviane@sorocaba.unesp.br

Received: 19/12/08

Accepted: 7/9/09

ABSTRACT

Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil)

The Billings Complex and the Guarapiranga System are important strategic reservoirs for the city of São Paulo and surrounding areas because the water is used, among other things, for the public water supply. They produce 19,000 liters of water per second and supply water to 5.4 million people. Crude water is transferred from the Taquacetuba branch of the Billings Complex to the Guarapiranga Reservoir to regulate the water level of the reservoir. The objective of this study was to evaluate the water quality in the Taquacetuba branch, focusing on cyanobacteria and cyanotoxins. Surface water samples were collected in February (summer) and July (winter) of 2007. Analyses were conducted of physical, chemical, and biological variables of the water, cyanobacteria richness and density, and the presence of cyanotoxins. The water was classified as eutrophic-hypereutrophic. Cyanobacteria blooms were observed in both collection periods. The cyanobacteria bloom was most significant in July, reflecting lower water transparency and higher levels of total solids, suspended organic matter, chlorophyll-a, and cyanobacteria density in the surface water. Low richness and elevated dominance of the cyanobacteria were found in both periods. *Cylindrodorspermopsis raciborskii* was dominant in February, with 352 661.0 cel mL⁻¹, and *Microcystis panniformis* was dominant in July, with 1 866 725.0 cel mL⁻¹. Three variants of microcystin were found in February (MC-RR, MC-LR, MC-YR), as well as saxitoxin. The same variants of microcystin were found in July, but no saxitoxin was detected. Anatoxin-a and cylindrodorspermopsin were not detected in either period. These findings are of great concern because the water in the Taquacetuba branch, which is transferred into the Guarapiranga Reservoir, is not treated nor managed. It is recommended that monitoring be intensified and more effective measures be taken by the responsible agencies to prevent the process of eutrophication and the consequent development of the cyanobacteria and their toxins.

Key words: Reservoirs, eutrophication, cyanobacteria, cyanotoxins.

RESUMEN

Cianobacterias y Cianotoxinas en el Embalse Billings (São Paulo, Brasil)

El Complejo Billings y el Sistema Guarapiranga son embalses estratégicos importantes para la ciudad de São Paulo (Brasil) y áreas circundantes porque, entre otras cosas, el agua es utilizada para el abastecimiento público. Este sistema produce 19 mil litros de agua por segundo, que es suministrado a 5.4 millones de personas. El agua bruta es transferida por el afluente Taquacetuba desde el Complejo Billings hacia el Embalse Guarapiranga, para regular el nivel de agua del embalse. El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad del agua en el tramo del Taquacetuba, teniendo como foco las cianobacterias y cianotoxinas. El muestreo de agua bruta superficial fue realizado en febrero (verano) y julio (invierno 2007). Fueron analizadas variables físicas, químicas y biológicas, cianobacteria, riqueza, densidad y la presencia de cianotoxinas. El tramo fue clasificado como eutrófico-hipereutrófico. Las cianobacterias fueron observadas en ambos periodos de colecta. El crecimiento más

significativo de algas fue observado en julio, reflejando baja transparencia del agua y niveles más altos en el agua superficial de sólidos totales, materia orgánica, clorofila-a y densidad de cianobacterias en el agua superficial. Una baja riqueza y un elevado dominio de cianobacteria fueron encontrados en ambos períodos. *Cylindrocapsa raciborskii* fue dominante en febrero, con 352 661.0 cel mL⁻¹, y *Microcystis panniformis* fue dominante en julio, con 1 866 725.0 cel mL⁻¹. Tres variedades de microcistina fueron encontradas en febrero (MC-RR, MC-LR, MC-YR), así como saxitoxina. Las mismas variedades de microcistina fueron encontradas en julio, pero ninguna saxitoxina fue observada. Anatoxina-a y cylindropemopsina no fueron observadas en ningún período. Estas conclusiones son preocupantes porque el agua del tramo del Taquacetuba, que es transferida al Embalse Guarapiranga, no es tratada o manejada. Se recomienda intensificar el monitoreo y medidas más eficaces deben ser tomadas por parte de las agencias responsables para prevenir el proceso de eutrofización y el desarrollo consiguiente de cianobacterias y sus toxinas.

Palabras clave: Embalses, eutrofización, cianobacterias, cianotoxinas.

INTRODUCTION

Cyanobacteria blooms in reservoirs, resulting from the accelerated process of eutrophication, causes the water to have an unpleasant appearance, an increase in turbidity, and it changes the flavor and smell of the water. Some of the main effects due to cyanobacteria blooms comprise a decrease in water transparency, heavy fluctuation of oxygen levels and the release of toxins (Vasconcelos, 2006). Nowadays, cyanobacteria blooms and its toxins are the main problem related to the treatment of public supply water, which can lead to serious public health problems.

In Brazil, the number of cases of cyanobacteria blooms in reservoirs designated for public supply is increasing each year (Andrade, 2005; Azevedo & Vasconcelos, 2006; Chellappa & Costa, 2003; Komarek *et al.*, 2002; Sant'Anna & Azevedo, 2000; Tucci & Sant'anna, 2003; Yunes *et al.*, 2003). The most severe case of intoxication due to cyanobacterial toxin occurred in 1996 in Caruaru, Pernambuco State, when around 60 people died following treatment hemodialysis sessions done with not well-treated water from a reservoir which had shown cyanobacterial dominance in the previous years (Azevedo *et al.*, 1994).

Considering that urban reservoirs used for water supply in Brazil have been subjected to frequent cyanobacteria blooms due to several variables, such as ecological, physiological, and environmental, research in this area must be encouraged (Calijuri *et al.*, 2006). Therefore, the aim

of this study was to evaluate the water quality in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir, focusing on the cyanobacteria and cyanotoxins.

The Billings Reservoir (Fig. 1) is located west of the city of São Paulo at 23°47'S, 46°40'W, an altitude of 746 m a.s.l. and its watershed covers an area of 560 km². Its uses include leisure, fisheries, flow control, domestic and industrial wastewater reception, power generation, and water supply. The reservoir's limnological features changed substantially since 1940, when part of the polluted water from the Tietê River (São Paulo city) started to flow into the Billings Reservoir, aiming to increase the water flow and consequently, the electric power generation. This operation, along with the disorganized occupation of the watershed, contributed to increase the eutrophication and consequently, the cyanobacterial blooms (Beyruth & Pereira, 2002; Carvalho *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 1998).

Due to its peculiar shape, the Billings Reservoir is divided into eight units called branches. The Taquacetuba branch has a particular use. In August of 2000, the Basic Sanitation Company of the State of São Paulo (SABESP) began to operate a system of transporting crude water from the Taquacetuba branch to the Guarapiranga Reservoir, with a license for 2.0 m³ s⁻¹. Currently it operates at a volume of 3.0 to 4.0 m³ s⁻¹, contributing 29% of the total water produced in the Guarapiranga Reservoir, which supplies water to southeastern São Paulo at a rate of 1.2 billion L day⁻¹ (Whately & Cunha, 2006).

Figure 1. Location of the Billings Reservoir watershed (Taquacetuba branch), State of São Paulo, Brazil. *Localización del Embalse de Billings (rama de Taquacetuba), São Paulo, Brasil.*

Therefore, the study of the Taquacetuba branch's water quality along with the cyanobacteria community and its toxins, will contribute to understand the actual state of degradation of the water that is transferred into the Billings-Guarapiranga system, which are important strategic reservoirs for the São Paulo city and its surrounding areas, as they produce $19\,000\text{ L s}^{-1}$ of water to supply 5.4 million people.

METHODOLOGY

Surface water samples were collected in February (summer) and July (winter) of 2007. Analyses of dissolved oxygen, total and dis-

solved nutrients, suspended matter, total solids, chlorophylls *a*, *b*, and *c*, and phaeopigments (Table 1) were performed. Water transparency was also determined using a Secchi disk, as well as water temperature, electrical conductivity (values corrected to $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), and pH with YSI multi-parameter sensor, model 63/100 FT.

Classification of the trophic state of the bodies of water was carried out according to the Trophic State Index (TSI) (Carlson, 1977), modified by Toledo *et al.* (1983), as follows: oligotrophic $\text{TSI} < 44$; mesotrophic $44 < \text{TSI} < 54$; eutrophic $54 < \text{TSI} < 74$; hypertrophic $\text{TSI} > 74$.

Species composition was analyzed using a JENAVAL/ZEISS binocular microscope. Counting was carried out using the sedimentation method

Table 1. Variables analyzed and their respective detection limits (when applicable), unit, method, and reference. *Variables analizadas y sus límites de detección respectivos (cuando aplicable), unidad, método, y referencia.*

Variable	Detection limit of the method	Unit	Method	Reference
Total, organic, and inorganic suspended matter (TSM, OSM, ISM)		mg · L ⁻¹	Gravimetric	Wetzel & Likens (1991)
Total solids (TS)		mg · L ⁻¹	Gravimetric	
Total nitrogen (TN)	< 5.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Valderrama (1981)
Total phosphorous (TP)	< 10.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Valderrama (1981)
Nitrite (N – NO ₂ ⁻)	< 8.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Mackereth <i>et al.</i> (1978)
Nitrate (N – NO ₃ ⁻)	< 5.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Mackereth <i>et al.</i> (1978)
Dissolved ammonium (N – NH ₄ ⁺)	< 4.2	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Koroleff (1976)
Orthophosphate (Pi)	< 10.0	µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Strickland & Parsons (1960)
Dissolved oxygen		mg · L ⁻¹	Titulometric	Golterman <i>et al.</i> (1978)
Chlorophyll <i>a, b, c</i> , phaeopigments		µg · L ⁻¹	Spectrophotometry	Jeffrey & Humphrey (1975), Lorenzen (1967), Strickland & Parsons (1960)

according Utermöhl. The number of chamber cells counted in each individual sample varied according to the species accumulation curve. To quantify cyanobacterial density in ind mL⁻¹, an individual was considered a filament, a trichome, a colony, a cenobium or a cell (for unicellular individuals). To quantify cyanobacterial density in cell mL⁻¹, the density based on ind mL⁻¹ was multiplied by the mean number of cells per individual (calculated for 30 individual specimens of each species).

For cyanotoxin analysis, water samples were centrifuged (5000 rpm, 10 min at 4 °C) and the resulting pellet stored at –20 °C. Microcystin determination was carried out after sample clean-up, using solid phase extraction (SPE). Briefly, 100 mg of the pellet were re-suspended in 10 mL of water, vortexed for 15 s and subjected to an ultrasonic probe for 1 min in an ice bath. After centrifugation (5,000 rpm, 10 min at 4 °C), the supernatant was loaded into a C18 cartridge (Sep-Pak, Waters) previously conditioned with MeOH (3 mL) and H₂O (3 mL). After the sequential washing with water (3 mL) and MeOH/H₂O 30 % (3 mL), toxins were eluted with MeOH (3 mL). The eluate was dried in a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 200 µL of MeOH for

LC-MSn Ion Trap analysis. The method proposed by Hiller *et al.*, 2007 was employed for saxitoxin, anatoxin-a and cilindrospermopsin analyses. Briefly, 100 mg of the pellet were re-suspended in 1 mL MeOH:Acetic acid 0.1 % (1:1), subjected to an ultrasonic bath for 30 min and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The resulting supernatant was filtered and analyzed.

RESULTS

Physical, chemical, and biological variables of the water

The physical, chemical, and biological variables of the water are shown in Table 2. The water temperature was higher in February (summer) than in July (winter), 25.2 °C and 19.5 °C, respectively. The water transparency was low in both periods. Electrical conductivity, pH, and dissolved oxygen were 145.1 µS cm⁻¹, 7.8 and 7.4 mg L⁻¹ in February, respectively, and 204.1 µS cm⁻¹, 7.6 and 6.2 mg L⁻¹ in July, respectively. Total nitrogen concentrations were high in both periods, measuring 473.6 µg L⁻¹ in February and

Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (Brasil)

277

Table 2. Values for the physical, chemical, and biological variables of the water in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil) in February and July, 2007. *Valores de las variables físicas, químicas, y biológicas del agua en la rama de Taquacetuba del Embalse de Billings (São Paulo, Brasil) en febrero y julio de 2007.*

Variables	February	July
Water temperature (°C)	25.2	19.5
Secchi disc (m)	1.1	0.95
Electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	145.1	204.1
pH	7.8	7.6
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	7.4	6.2
Total solids (mg L^{-1})	114.0	339.5
Suspended particulate matter (mg L^{-1})	8.8	164.0
Suspended particulate organic matter (%)	88.7	95.1
Suspended particulate inorganic matter (%)	11.2	4.9
Total nitrogen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	473.6	431.6
Nitrate ($\mu\text{g L}^{-1}$)	336.8	288.9
Nitrite ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25.7	8.1
Ammonium ($\mu\text{g L}^{-1}$)	20.1	—
Total phosphorous ($\mu\text{g L}^{-1}$)	54.6	402.2
N:P ratios	19:1	2:1
Inorganic phosphorous ($\mu\text{g L}^{-1}$)	—	11.7
Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	33.2	867.0
Chlorophyll <i>b</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.9	586.4
Chlorophyll <i>c</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.3	29.9
Phaeophytin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12.0	310.0

—: below the detection limit of the method

431.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in July. Among dissolved nitrogen forms, nitrate levels were higher than nitrite and ammonium in both periods. Total phosphorous was considerably higher in July (402.2 $\mu\text{g L}^{-1}$) compared to February (54.6 $\mu\text{g L}^{-1}$). In February, inorganic phosphate was below the analytic method limit ($< 10 \mu\text{g L}^{-1}$), while levels in July were found to be 11.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Values of total solids, suspended particulate matter, and its organic fraction were much higher in July compared to those in February. Algae biomass, represented by concentrations of chlorophyll *a*, *b*, and *c* and phaeophytin and the density of cyanobacteria also followed this same pattern of higher values in July and lower values in February. This pattern was due to an increased cyanobacterial bloom in July.

Trophic state index

According to the Trophic State Index (TSI) for chlorophyll, the waters of the Taquacetuba branch were classified as eutrophic in both periods (February with TSI=63 and July with TSI=72), whereas according to the TSI for total phosphorous, they were classified as eutrophic in February (TSI=57) and hypereutrophic (TSI=83) in July.

Cyanobacteria composition and density

A total of 13 taxa of cyanobacteria were identified, 8 in February and 10 in July (Table 3). Higher densities of cyanobacteria were found in July (2 914 035.0 cel mL^{-1}) compared to Fe-

Table 3. Cyanobacteria taxa and densities in February and July, 2007, in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil). *Taxa de cianobactérias y densidades en febrero y julio de 2007, en la rama de Taquacetuba del Embalse de Billings (São Paulo, Brasil).*

Cyanobacteria taxa	Density (cel mL ⁻¹)	
	February	July
<i>Anabaena</i> sp.	0	1 328
<i>A. spiroides</i>	0	416 511
<i>Aphanocapsa</i> sp.	0	1 287
<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	6 240	0
<i>C. raciborskii</i>	352 661	9 082
<i>Merismopedia tenuissima</i>	12 849	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	14 053	68 840
<i>M. panniformis</i>	0	1 866 725
<i>Microcystis</i> sp.	21 397	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	23 391	147 665
<i>Pseudanabaena</i> sp.	7 804	3 361
<i>P. galeata</i>	9 004	29 508
<i>Woronichinia naegeliana</i>	0	369 729
Total	447 399	2 914 035

bruary (447 399 cel mL⁻¹). In February, the taxa with higher densities were *Cylindrospermopsis raciborskii* (352 661 cel mL⁻¹), *Planktothrix agardhii* (23 391.0 cel mL⁻¹), *Microcystis* sp (21 397 cel mL⁻¹), and *Microcystis aeruginosa* (14 053 cel mL⁻¹). In July, a high density of *Microcystis panniformis* was found (1 866 725 cel mL⁻¹), followed by *Anabaena spiroides* (416 511 cel mL⁻¹), *Woronichinia naegeliana* (369 729 cel mL⁻¹), *Planktothrix agardhii* (147 665 cel mL⁻¹), and *Microcystis aeruginosa* (68 840 cel mL⁻¹) (Table 4).

Cyanotoxin analyses

Microcystin analysis showed the presence of three different variants in both sampling periods, MC-RR, MC-LR and MC-YR, in different concentrations (Table 4). In February, three different microcystin variants were found (MC-RR, MC-LR and MC-YR) in concentrations ranging from 0.26-0.47 µg L⁻¹ (7.83-14.15 ng MC/µg Chl *a*).

Table 4. Results of the microcystin analysis in February and July, 2007, in the Taquacetuba branch of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil). *Resultados de análisis microcystin en febrero y julio de 2007, en la rama de Taquacetuba del Embalse de Billings (São Paulo, Brasil).*

	µgMC L ⁻¹			ngMC µgChl <i>a</i> ⁻¹		
	MC-RR	MC-LR	MC-YR	MC-RR	MC-LR	MC-YR
February	0.47	0.28	0.26	14.15	8.43	7.83
July	0.55	0.57	0.29	0.64	0.66	0.33

In July, the same microcystin variants were found, ranging in concentration from 0.29-0.57 µg L⁻¹ (0.33-0.66 ng MC/µg Chl *a*).

Saxitoxin was detected only in February. Neither cylindrospermopsin nor anatoxin-a were detected in either of the samples.

DISCUSSION

Analyses of the physical, chemical, and biological variables of the water from the Taquacetuba branch in February (summer) and July (winter) revealed a marked seasonality.

In this study, the cyanobacterial bloom was more intense in July (winter) than in February (summer), reflecting major electrical conductivity, higher levels of total solids, suspended particulate matter, total phosphorus, chlorophyll *a, b, c*, phaeophytin, and cyanobacteria density. The dominance of cyanobacteria in nutrient-rich environments has been associated with a variety of factors. Environmental factors, such as low turbulence (Reynolds, 1987), low light (Smith, 1986), low ratio of euphotic zone to mixing zone (Jensen *et al.*, 1994), high temperature (Shapiro, 1990), low CO₂/high pH (Caraco & Miller, 1998), high total-P (Falconer, 2005; Watson *et al.*, 1997), low total-N (Smith, 1983), and phosphorus storage strategy (Pettersson *et al.*, 1993), have all been referred to as being able to promote or allow cyanobacterial dominance.

According to Tilman's (1982) resource-ratio hypothesis, cyanobacterial dominance had also been attributed to low N:P ratios (Bulgakov & Levich, 1999; Hoyos *et al.*, 2004; Smith, 1983; Tilman *et al.*, 1986). Indeed, in this study, we observed higher cyanobacterial density in July,

when the N:P ratios were very low. According to Falconer (2005), phosphorus availability is a major determinant of growth rate for cyanobacteria and has a substantial effect on toxin production. However, this pattern was not reflected in a higher cyanotoxin production in July. It may suggest that environmental factors (water temperature and light, for instance) in this period didn't favor the production of toxins, despite of the more intense bloom. The irregularity of the toxicity of cyanobacteria is not yet defined (Carmichael, 1992). Environmental factors such as light, temperature, and nutrients have a large influence on the production of cyanotoxins.

Sant'Anna *et al.* (2007) yield a study of cyanobacteria biodiversity and distribution in reservoirs of the upper Tietê River, in which the Billings Reservoir is located. The authors concluded that within the results of the physical and chemical conditions of the reservoirs, Billings Reservoir proved to be the most favorable environment for the development of these organisms.

The abundance and persistent predominance of cyanobacteria species observed in this study are probably linked to the high levels of eutrophication in the Taquacetuba branch, as indicated by the TSI (eutrophic-hypereutrophic), which reflected elevated algae biomass, low water transparency, very high concentrations of nutrients (total nitrogen and phosphorous) and, consequently, seriously compromised the use of the water for the public's water supply, as well as other uses.

Sant'Anna & Azevedo (2000) and Komarek *et al.* (2002) reported cyanobacteria blooms in Brazil resulting from the increase in nutrients. According to Tucci & Sant'Anna (2003), *Cylindrospermopsis raciborskii* blooms have been increasingly frequent in Brazilian reservoirs because of its high competitiveness in eutrophic tropical environments. In an eutrophic reservoir in Rio Grande do Norte State with high concentrations of inorganic matter, reduced transparency, anoxic hypolimnion, and high electrical conductivity, Chellappa & Costa (2003) detected a large presence of cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Raphidiopsis curvata*, *Microcystis aeruginosa*, and *Oscillatoria* sp) in the dry season. Azevedo & Vasconcelos (2006) detected

toxic strains of cyanobacteria in bodies of water including reservoirs used for public water supply, artificial lakes, salt lakes, and rivers in the states of São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Bahia, and Pernambuco, and in the Federal District. At these locales, approximately 82 % of the strains isolated were found to be toxic, with 9.7 % being neurotoxic and the rest hepatotoxic. Minillo *et al.* (2000) detected the presence of microcystins in an estuary in Rio Grande do Sul, Lagoa dos Patos, in the summer and fall months. Carvalho *et al.* (2007) detected greater biodiversity of potentially toxic cyanobacteria in the Billings Reservoir compared to the Guarapiranga Reservoir. They found 67 % of the species collected in the Billings Reservoir to be potentially toxic and 50 % in the Guarapiranga Reservoir. Analyses of microcystin confirmed these results, as microcystin was detected in the Billings Reservoir throughout the entire study period, whereas in the Guarapiranga Reservoir, microcystin was only detected in the samples containing *Microcystis*.

Brazilian studies have shown that the most common toxic cyanobacteria blooms are those that produces microcystins and saxitoxin, the same toxins found in the Taquacetuba branch in this study (Molica & Azevedo, 2009).

Microcystins are produced by several cyanobacterial genera, such as *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Haplosiphon*, and *Anabaenopsis* while saxitoxins are produced by *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, and *Cylindrospermopsis* (Chorus & Bartram, 1999). A *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in February, associated with the presence of saxitoxin, suggests the production of this toxin by this species, as already demonstrated in other freshwater environments in Brazil (Lagos *et al.*, 1999; Molica *et al.*, 2002). However, further research is necessary in order to confirm the origin of this toxin and to quantify it. The presence of microcystin in both periods was probably due to high densities of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* in February and *Microcystis panniformis* and also *Planktothrix agardhii* in July. A more intense bloom with higher cyanobacterial densities in July was related to higher microcystins concentrations in this period.

In an eutrophic Brazilian reservoir (Armando Ribeiro Gonçalves Reservoir, Rio Grande do Norte State), Costa *et al.* (2006) detected microcystins concentrations as high as $8.8 \mu\text{g L}^{-1}$. Andrade (2005) found lower concentrations of microcystins ($3.5 \mu\text{g L}^{-1}$) at the Guarapiranga Reservoir (São Paulo State) and Yunes *et al.* (2003) found much lower concentrations of this toxin ($0.03 \mu\text{g L}^{-1}$) in the Duro reservoir (Rio Grande do Sul State) and $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ of saxitoxin in the Taiaçupeba reservoir (São Paulo State). Most Brazilian reservoirs are in exceptionally good conditions for the development of toxic cyanobacteria: light availability, high temperatures, water column stability, high water retention time and high nutrient concentrations (N and P) (Fernandes *et al.*, 2009).

Cyanobacteria density during this study exceeded the levels for drinking water ($> 2 \cdot 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) recommended by the WHO-World Health Organization (Chorus & Bartram, 1999), and also the limit set by the Brazilian Health Ministry ($20 \cdot 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) (Brasil, 2004). Due to the high toxicity of microcystins, WHO established the value $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ as the maximum microcystin-LR concentration in drinking water (Chorus & Bartram, 1999).

Although water from Taquacetuba is not directly used for water supply, microcystin-LR level at $0.57 \mu\text{g L}^{-1}$ in July is a cause of concern because of the difficult removal of this toxin with conventional water treatment process (Lambert *et al.*, 1996). Additionally, raw water containing 1.01 and $1.41 \mu\text{g L}^{-1}$ of total microcystins in February and July, respectively, mean exposures to doses near the guideline value for the local population that uses the reservoir as a recreation site. This situation should be considered as a serious public health threat, since prolonged exposure to microcystins can lead to a higher incidence of liver cancer (Azevedo, 1998; Chorus & Bartram, 1999). Exposure of the local population through cyanotoxin accumulation in fish musculature must also be considered (Magalhães *et al.*, 2001).

The findings of the present study are of great concern. The water in the Taquacetuba branch is not treated nor managed, and it is channeled into the Guarapiranga Reservoir. Thus, it is recom-

mended that monitoring be intensified, and more effective measures be taken by the agencies responsible for the elimination of the causes of the eutrophication process and the consequent development of cyanobacteria and its toxins.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funded by: CNPQ (NUM. 475166/2006-6)-FAPESP (NUM. 0213376-4). FUNDUNESP: (NUM. 00675/08-DFP).

REFERENCES

- ANDRADE, A. A. S. 2005. *Análise da eficiência da várzea do Ribeirão Parelheiros na melhoria de qualidade das águas que afluem a represa do Guarapiranga*, São Paulo. Tesis Doctoral, EESC. University of São Paulo. 91 pp.
- AZEVEDO, S. M. F. O., W. R. EVANS, W. W. CARMICHAEL & M. NAMIKOSHI. 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 6: 261-5.
- AZEVEDO, S. M. F. O. 1998. Toxinas de cianobactérias: Causas e consequências para a saúde pública. *Medicina on line*, 3: 1-19.
- AZEVEDO, S. M. F. O. & V. VASCONCELOS. 2006. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. In: *Ecotoxicologia aquática. Princípios e Aplicações*. P. A. Zagatto & E. Bertolotti (Eds.): 433-452. Ed. Rima.
- BEYRUTH, Z. & H. A. D. S. L. PEREIRA. 2002. O isolamento do Rio Grande da represa Billings, São Paulo: Efeitos sobre o fitoplâncton durante um ciclo hidrológico completo. *B. Inst. Pesca*, 28: 111-123.
- BRASIL. 2004. Portaria 518, de 25 de março de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*. Brasília (DF).
- BULGAKOV, N. G. & A. P. LEVICH. 1999. The nitrogen:phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. *Arch. Hydrobiol.*, 146: 3-22.
- CALIJURI, M. C. C., M. S. A. ALVES & A. C. A. DOS SANTOS. 2006. *Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais*. 109 pp. Ed. Rima.

- CARACO, N. & R. MILLER. 1998. Factors influencing the abundance of blue-green algae in Florida lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1232-1237.
- CARMICHAEL, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-The Cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, 72: 445-459.
- CARVALHO, L. R., C. SANT'ANNA, M. C. P. GELMEGO & M. T. P. AZEVEDO. 2007. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga reservoir. *Revta. Brasil. Bot.*, 30(1): 141-148.
- CHELLAPPA, N. T. & M. A. M. COSTA. 2003. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica*, 24: S3-S10.
- CHORUS, I. & J. BARTRAM. 1999. *Toxic cyanobacteria in water-a guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, Spon Press, London.
- COSTA, I. A. S., S. M. F. O. AZEVEDO, P. A. C. SENNA, R. R. BERNARDO, S. M. COSTA & N. T. CHELLAPPA. 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.*, 66: 211-219.
- FALCONER, I. R. 2005. *Cyanobacterial toxins of drinking water supplies-cylindrospermopsins and microcystins*. CRC Press, U.S. 299 pp.
- FERNANDES, V. D. O., B. CAVATI, L. B. D. OLIVEIRA & B. D. A. D. SOUZA. 2009. Ecologia de cianobactérias: Fatores promotores e consequências das florações. *Oecol. Bras.*, 13: 247-258.
- GOLTERMAN, H. L., R. S. CLYMO, & M. A. M. OHNSTAD. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*: Oxford. Blackwell Scientific Publications, I.B.P. Handbook. 1978.v. 8. 213 pp.
- HILLER, S., B. KROCK, A. CEMBELLA & B. LUCKAS. 2007. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 1238-1250.
- HOYOS, C., A. I. NEGRO & J. J. ALDASORO. 2004. Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during thermal stratification. *Limnetica*, 23: 119-132.
- JEFFREY, S. W. & G. F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Physiol. Pflanzen (BPP)*, 167: 191-194.
- JENSEN, J. P., E. JEPPESEN, K. OLRICK & P. KRISTENSEN. 1994. Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1692-1699.
- KOMAREK, J., J. KORMAKOVA-LEGNEROVA, C. L. SANT'ANNA, M. C. T. AZEVEDO & P. S. SENNA. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. Panniformis* sp. nov. *Cryptogamie. Algologie*, 23(2): 159-177.
- KOROLEFF, F. 1976. Determination of nutrients. In: *Methods of seawater analysis*. K. GRASSHOFF (ed.): 117-181. Verlag Chemie Weinheim.
- LAGOS, N., H. ONODERA, P. A. ZAGATTO, D. ANDRINOLO, S. M. F. Q. AZEVEDO & Y. OSHIMA. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 37: 1359-1373.
- LAMBERT, T. W., HOLMES, C. F. B. & HRUDEY, S. E. 1996. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Res.*, 30: 1411-1422.
- LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12: 343-346.
- MAGALHÃES, V. F., R. M. SOARES & S. M. F. O. AZEVEDO. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39: 1077-1085.
- MACKERETH, F. J. H., J. HERON, & J. F. TALLING. 1978. *Water analysis: some revised methods for limnologists*. Freshwater Biological Association. Scientific Association. n. 36. Titus Wilson & Son Ltda. Kendall. 117 pp.
- MINILLO, A., A. H. F. FERREIRA, G. T. YOGUI & J. S. YUNES. 2000. Concentrações de microcistinas e toxicidade na formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da lagoa dos Patos, RS. In: *Ecotoxicologia. Perspectivas para o Século XXI*. E.L.G. Espíndola, C.M.R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M.B.C. Bohrer, A.L. Oliveira-Neto (eds.): 521-536. São Carlos, Ed. Ri-ma.
- MOLICA, R. & S. AZEVEDO. 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecol. Bras.*, 13: 229-246.
- MOLICA, R., H. ONODERA, C. GARCIA, M. RIVAS, D. ANDRINOLO, S. NASCIMENTO, H.

- MEGURO, Y. OSHIMA, S. AZEVEDO & N. LAGOS. 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, 41: 606-611.
- PETTERSSON, K., E. HERLITZ & V. ISTVÁNOVICS. 1993. The role of *Gloeothrixia echinulata* in transfer of phosphorus from sediments to water in lake Erken. *Hydrobiologia*, 253: 123-129.
- REYNOLDS, C. S. 1987. Cyanobacterial waterblooms. In: *Advances in botanical research*. Callow, J. (ed.): 67-143. Academic Press. London.
- SANT'ANNA, C. L., M. T. D. AZEVEDO. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, 71: 359-385.
- SANT'ANNA, C., S. M. SILVA, M. C. CARVALHO, M. C. P. GELMEGO & M. T. P. AZEVEDO. 2007. Planktic cyanobacteria from upper Tiête basin reservoir, SP, Brasil. *Revta. Brasil. Bot.*, 30: 1-17.
- SHAPIRO, J. 1990. Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Vehr. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 24: 38-54.
- SMITH, V. H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science*, 221: 669-671.
- SMITH, V. H. 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 48-153.
- SOUZA, R. C. R., M. C. CARVALHO & A. C. TRUZZI. 1998. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings reservoir, Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13: 73-81.
- STRICKLAND, J. D. & T. R. PARSONS. 1960. A manual of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board. Can.*, 125: 1-185.
- TILMAN, D., R. KIESLING, R. STERNER, S. S. KILHAM & F. A. JOHNSON. 1986. Green, blue green and diatom algae: Taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.*, 106: 473-485.
- TUCCI, A. & C. L. SANT'ANNA. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): Variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 26: 97-112.
- TOLEDO Jr., A. P. DE, N. TALARICO, S. J. CHINEZ & E. G. AGUDO. 1993. Aplicação de modelos simplificados para a avaliação de processo de eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. *Anais 12º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. CETESB: 1-34.
- TUCCI, A. & C. L. SANT'ANNA. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revta. Brasil. Bot.*, 26(1): 97-112.
- VASCONCELOS, V. 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: When ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25: 425-432.
- VALDERRAMA, J. C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.*, 10: 109-122.
- WATSON, S. B., E. MCCAULEY & J. A. DOWNING. 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 487-495.
- WHATELY, M. & P. CUNHA. 2006. *Seminário Guaraquiranga - Proposição de ações prioritárias para garantir água de boa qualidade para abastecimento público*. Instituto Socioambiental. São Paulo, 171 pp.
- WETZEL, R. G. & G. E. LIKENS. 1991. *Limnological Analyses*. 2nd ed. Springer-Verlag. 391 pp.
- YUNES, J. S., N. T. CUNHA, L. P. BARROS, L. A. O. PROENÇA & J. M. MONSERRAT. 2003. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. *Comments on Toxicology*, 9: 103-115.

ANEXO 7 - CURRÍCULO LATTES

Stella de Bortoli

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2002). Atualmente é doutoranda do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo onde desenvolve o projeto "Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias". Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Análise Toxicológica. (Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 06/04/2011
Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/4632763685152716>

Certificado
pelo autor em
05/04/11

Dados pessoais

Nome Stella de Bortoli

Nome em citações bibliográficas BORTOLI, S.

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Lineu Prestes, 580 Bloco 17
Cidade Universitária
05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30912192
URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br/Departamentos/FBC/HP_Professores/Emami/index.html

Formação acadêmica/Titulação

2007 Doutorado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 4).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias, Orientador: Emami
Pinto Junior.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: cianobactérias; cianotoxinas.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica.

1997 - 2002 Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Brasil.

Formação complementar

2001 - 2011 Projeto CNPq / CONICYT. (Carga horária: 80h).
Pontificia Universidad Católica de Chile.

2010 - 2010 Aplicações e Fundamentos da PCR em Tempo Real. (Carga horária: 30h).
Life Technologies.

2009 - 2010 Doutorado sanduíche. (Carga horária: 500h).
Friedrich-Schiller University of Jena.

2009 - 2009 II Latin America Risk Assessment Workshop. (Carga horária: 52h).
Sociedade Brasileira de Toxicologia.

2008 - 2008 XVI Curso de Edição Científica da ABEC. (Carga horária: 16h).
Instituto Biológico.

2008 - 2008 Interpretação e elaboração de FISPQ. NBR14725:2005. (Carga horária: 24h).
InterTox.

2003 - 2004 Extensão universitária em Profis. Responsável pela segurança - Socorrista. (Carga horária: 200h).
Centro de Ensino Superior de Campos Gerais.

2003 - 2003 Boas práticas de farmácia. (Carga horária: 7h).
Conselho Regional de Farmácia do Paraná.

2002 - 2002 Aplicação de metodologias de análise de DNA e RNA. (Carga horária: 5h).

	Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Brasil.
2002 - 2002	Habilitação em Análises Clínicas. (Carga horária: 200h). Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Brasil.
2001 - 2001	Iniciando a Atenção Farmacêutica. (Carga horária: 6h). Conselho Regional de Farmácia do Paraná.
2000 - 2000	Qualificação e atuação do farmacêutico - genéricos. (Carga horária: 6h). Sindicato dos Farmacêuticos no Estado de Santa Catarina.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo Institucional

2007 - Atual Vínculo: Estudante de Pós-Graduação, Enquadramento Funcional: Doutoranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras Informações Pós graduação em Análises Toxicológicas - Toxicologia

Atividades

02/2007 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Projetos de pesquisa

[Investação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias](#)

2008 - 2011 Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Projetos de pesquisa

[CNPq / CONICYT - 490941/2008-7 Identificação e caracterização de cianobactérias tóxicas presentes nos reservatórios do Brasil e Chile.](#)

2005 - 2010 Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Projetos de pesquisa

[233/G - CQCI PROBRAL Brasil/Alemanha/05 - Projeto de Cooperação Internacional entre Brasil e Alemanha - CAPEQ/DAAD](#)

Farmácia e Drogeria Nissel, NISSEL, Brasil.

Vínculo Institucional

2003 - 2005 Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Farmacêutica, Carga horária: 40

Atividades

06/2003 - 04/2005 Serviços técnicos especializados, Farmácia e Drogeria Nissel, -

Serviço realizado

Farmacêutica Responsável.

Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Brasil.

Vínculo Institucional

2000 - 2000 Vínculo: Estudante de Graduação, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 90

Outras Informações Monitoria realizada na disciplina de Farmacognosia ministrada ao 2º ano do curso de Farmácia da UEPG.

Vínculo Institucional

1999 - 1999 Vínculo: Estudante de Graduação, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 120

Outras Informações Monitoria durante o "Curso de Capacitação para Alfabetização de Jovens e Adultos - Programa de Alfabetização Solidária" (PROEX)

Projetos de Pesquisa

2008 - 2011 CNPq / CONICYT - 490941/2008-7 Identificação e caracterização de cianobactérias tóxicas presentes nos reservatórios do Brasil e Chile.

Descrição: O objetivo deste projeto é identificar, isolar e caracterizar cianobactérias tóxicas presentes em amostras de reservatórios do Estado de São Paulo (Bilings, Guarapiranga e Americana) e também de reservatórios Chilenos. Desenvolver métodos analíticos e/ou bioquímicos viáveis para a detecção dessas toxinas.

Além disso, realizar a identificação dos principais genes envolvidos na síntese de toxinas afim de conhecer o perfil genético das cianobactérias sul americanas..
 Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
 Alunos envolvidos: Doutorado (2) .
 Integrantes: Ernani Pinto - Coordenador / Fabiana Maria dos Anjos - Integrante / Mônica Vázquez - Integrante / Nabile Delherbe - Integrante / Vania Cristina Rodriguez - Integrante / Stella de Bortoli - Integrante.
 Financiador(es): Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica - Auxílio financeiro / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro..

2007 - Atual Investigações da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias

Descrição: O objetivo central do projeto é estudar amostras de florações algais coletadas em diversos reservatórios, a fim de isolar cepas tóxicas de cianobactérias e investigar alguns fatores relacionados à biossíntese e à expressão gênica da microcistina..
 Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
 Alunos envolvidos: Doutorado (1) .
 Integrantes: Stella de Bortoli - Coordenador.
 Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Bolsa..

2005 - 2010 233/S - CIGCI PROBRAL Brasil/Alemanha/05 - Projeto de Cooperação Internacional entre Brasil e Alemanha - CAPES/DAAD

Descrição: Essa colaboração entre a Universidade de São Paulo e a Universidade de Jena pretende desenvolver técnicas confiáveis e rápidas para o controle de toxinas na água de represas e lagos brasileiros e alemães. Além disso, a parceria entre as universidades de São Paulo e de Jena trará aspectos importantes para a pós-graduação, pois permitirá o intercâmbio de estudantes e pesquisadores, e a internacionalização do programa através de análises clínicas. Os coordenadores envolvidos já desenvolvem colaboração no tema mencionado e possuem um acordo formal entre a Universidade de Jena e Universidade de São Paulo, assinado pelos reitores das instituições, para o intercâmbio de estudantes e pesquisadores..
 Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
 Alunos envolvidos: Doutorado (5) .
 Integrantes: Ernani Pinto - Coordenador / Vanessa Gressler - Integrante / Vania Cristina Rodriguez - Integrante / Bernd Luckas - Integrante / Thomas Krueger - Integrante / Paula Kujbida - Integrante / Stella de Bortoli - Integrante.
 Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Cooperação / Deutscher Akademischer Austauschdienst - Cooperação..

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica.
2. Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Química Analítica.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MOSCHINI-CARLOS, V. ; BORTOLI, S. ; PINTO, E. ; NISHIMURA, P. Y. ; FREITAS, L. G. ; POMPEO, M. L. M. ; DÖRR, F. . Cyanobacteria and Cyanotoxin in the Billings Reservoir (São Paulo, SP, Brazil). *Limnética* (Madrid), v. 28, p. 273-282, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1. BORTOLI, S. ; OLIVEIRA-SILVA, D. ; PINTO, E. . Growth and microcystin production by *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different medium cultivation. In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo. XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010.
2. BORTOLI, S. ; NATUMI, R. S. ; GRESSLER, V. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Antimicrobial activity of cyanobacterial extracts. In: XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009.
3. BORTOLI, S. ; PINTO, E. . Comportamento do crescimento de *Microcystis aeruginosa* cultivada em diferentes concentrações de nitrato em meio ASM-1. In: II Workshop - NOVOS BIOATIVOS DE MACROALGAS, 2009, Ithabela. II Workshop - NOVOS BIOATIVOS DE MACROALGAS, 2009. v. 1. p. 29-29.
4. OLIVEIRA-SILVA, D. ; ANJOS, F. M. ; BORTOLI, S. ; DÖRR, F. ; COLEPICOLO, P. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; PINTO, E. . Multi-mode LC-MS/MS method for screening, identification and quantification of microcystins. In: 18th International Mass Spectrometry Conference, 2009, Bremen. 18th International Mass Spectrometry Conference, 2009.
5. MOSCHINI-CARLOS, V. ; BORTOLI, S. ; PINTO, E. ; POMPEO, M. L. M. . Reservatórios Billings e Guarapiranga (São Paulo, Brasil):

Análise da qualidade da água com ênfase nas cianobactérias e cianotoxinas. In: XIV Congresso de la Asociación Ibérica de Limnología, 2008, Huelva. XIV Congreso de la Asociación Ibérica de Limnología, 2008.

6. BORTOLI, S. ; PINTO, E. . Isolamento de cepas de cianobactérias planctônicas e determinação da produção de toxinas. In: XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP, 2008, São Paulo. XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008.
7. BORTOLI, S. ; MÓLICA, R. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; POMPEO, M. L. M. ; MOSCHINI-CARLOS, V. ; DÖRR, F. ; PINTO, E. . Isolation and cultivation of cyanobacterial strains to produce analytical standards. In: VII International Conference on Toxic Cyanobacteria, 2007, Rio das Pedras. Official Program and Abstract Book of VII International Conference on Toxic Cyanobacteria, 2007. p. 119-119.
8. BORTOLI, S. ; DÖRR, F. ; PINTO, E. . Análise de microcistinas e isolamento de cepas de cianobactérias do reservatório de São Grande na cidade de Americana, São Paulo. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, Buzios. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo : Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2007. v. 20. p. 210-210.
9. BORTOLI, S. ; DÖRR, F. ; POMPEO, M. L. M. ; MOSCHINI-CARLOS, V. ; PINTO, E. . Análise de Microcistinas em alguns reservatórios do Estado de São Paulo. In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP, 2007, São Paulo. XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP, 2007.

Produção técnica

Demais tipos de produção técnica

1. BORTOLI, S. . Saúde - doenças infecto contagiosas. 2001. (Aula).

Eventos

Participação em eventos

1. Workshop provocações e discussões sobre coleta e destino de fármacos. Contaminam água e solo. Caso de saúde pública?. 2011. (Oficina).
2. XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. 2010. (Congresso).
3. Oficina Estadual Extraordinária da Revisão da Portaria MS 518/04. 2010. (Oficina).
4. Curso "Proteomics Methods and Approaches for Protein Identification and quantitation. 2010. (Outra).
5. II Workshop: Novos Bioativos de Macroalgas. 2009. (Oficina).
6. II Seminário de editores Científicos da USP. 2008. (Seminário).
7. Estresse oxidativo: envolvimento no envelhecimento e como mecanismo de ação de xenobióticos. 2008. (Seminário).
8. VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. 2007. (Congresso).
9. XV Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2007. (Congresso).
10. VII Simpósio de Biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa. 2007. (Simpósio).
11. Workshop Photosynthetic Organisms: Biotechnology, Environment and Bio Energy. 2007. (Oficina).
12. IV Congresso de Farmácia e Análises Clínicas. 2002. (Congresso).
13. II Semana de Farmácia Professora Tereza Czechar. 2001. (Congresso).
14. I Jornada Clínico Laboratorial do Hospital Vicentino - dislipidemias. 2001. (Seminário).
15. CRF/PR - 40 anos de Luta pela Saúde. 2001. (Encontro).
16. Aconselhamento Farmacêutico na Hipertensão Arterial. 2001. (Outra).
17. VII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos. 2000. (Congresso).
18. IX Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos. 2000. (Encontro).
19. I Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul. 2000. (Encontro).
20. Semana Acadêmica de Farmácia. 2000. (Encontro).
21. Semana Acadêmica de Farmácia. 2000. (Encontro).

22. I Semana de Farmácia - Professor Oscar Rosa Lima, 2000. (Encontro).

23. III Simpósio de Farmácia e Análises Clínicas de Ponta Grossa, 1999. (Simpósio).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 25/04/2011 às 17:39:54