

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

GEORGETTE CRISTINA SALVADOR LÁZARO

**EFEITOS DE NÍVEIS DE FERRO E RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
MICROCISTINA EM *Microcystis aeruginosa* Kützing NPLJ-4**

VITÓRIA (ES)
2012

GEORGETTE CRISTINA SALVADOR LÁZARO

**EFEITOS DE NÍVEIS DE FERRO E RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
MICROCISTINA EM *Microcystis aeruginosa* Kützing NPLJ-4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental, Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. PhD Sérgio Túlio A. Cassini.

Coorientadores: Prof. Dr. Camilo Dias Junior

Prof^a. Dr^a. Regina de P.Keller

VITÓRIA (ES)

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L431e Lázaro, Georgette Cristina Salvador, 1980-
Efeito de níveis de ferro e radiação ultravioleta no
crescimento e produção de microcistina em *Microcystis
aeruginosa* Kützing NPLJ-4 / Georgette Cristina Salvador
Lázaro. – 2012.
112 f. : il.

Orientador: Sérgio Túlio Alves Cassini.
Coorientadores: Camilo Dias Junior, Regina de Pinho Keller.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Cianobactéria. 2. Stress (Fisiologia). 3. Ferro. 4. Radiação
ultravioleta. 5. Crescimento. 6. Microcistina. I. Cassini, Sérgio
Túlio Alves. II. Dias Júnior, Camilo. III. Keller, Regina de Pinho.
IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico.
V. Título.

CDU: 628



GEORGETTE CRISTINA SALVADOR LÁZARO

**EFEITO DE NÍVEIS DE FERRO E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NO
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MICROCISTINA EM *Microcystis*
aeruginosa Kützing NPLJ-4**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental, Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em 25 de junho de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº. PhD. Sérgio Túlio A. Cassini
Orientador - UFES

Profª. Drª. Edumar Ramos Cabral Coelho
Examinador Interno - PPGEA/UFES

Profº. Drº. Camilo Dias Junior
Co-Orientador - UFES

Profª. Drª. Alessandra Delazari-Barroso
Examinador Externo – FAESA

Profª. Drª. Regina de Pinho Keller
Co-Orientador – UFES

Vitória (ES), 25 de junho de 2012.

"A sabedoria que vem de Deus é pura, pacífica, condescendente, conciliadora, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade". (Tiago 13, 17)

♪ *Ao Mestre Jesus, pelo amor fiel e incondicional, por toda fortaleza, sabedoria e por ergue-me sempre!*

À minha amada mãe, Eneide: pelo amor paciente e incentivador! Pelas incontáveis orações!

Ao amigo e professor Camilo Dias Junior.

Aos Anjos da Guarda que zelaram pela minha vida e sonho. Por acreditarem sempre que eu podia ir muito mais além. ♪

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelas oportunidades, amor, paciência, sabedoria e pelas graças que todos os dias concede em minha vida. Por continuamente me dar forças para sempre seguir em frente e por acionar seus vários anjos durante esta jornada. Estes me ajudaram a seguir em frente diante das inúmeras adversidades e ter mais confiança na minha competência e dedicação. Obrigada Jesus por ser meu TUDO e por ser **meu grande Orientador!**

Aos meus pais amados, Eneide e Abnyr, e irmãos, Rafael e André, que não mediram esforços para eu pudesse alcançar os sonhos almeados. Pelo amor paciente e bondoso, e pela menina-mulher, solidária, persistente, responsável, ética e dedicada, na qual me tornei. Em especial à “mamis” que é meu maior exemplo de perseverança, humildade e superação! e.

À minha equipe querida: os alunos voluntários Bruno M. Farias e Telma R. Castôr, às alunas de iniciação científica Daisy Cardoso e Sara Francisco, à Elaine Pagung e Jairo de Oliveira por toda contribuição, ajuda, carinho, amizade, solidariedade e risadas, especialmente nos momentos de desânimo. Vocês são “the best”!

Aos orientadores, professores PhD Sérgio Túlio Alves Cassini e Dr^a. Regina de Pinho Keller pela oportunidade de realizar a pesquisa e pela confiança depositada. Ao professor Dr. Camilo Dias Junior pela orientação, amizade, disponibilização, confiança e por sempre acreditar no meu potencial e na concretização desse trabalho. Agradeço imensamente pelo carinho e ajuda na “fase de declínio” pela qual atravessei.

Às amigas (os), pelo companheirismo, solidariedade, ajuda e amizade nos momentos de aflições, alegrias, tristezas e vitórias. Pelas inúmeras orações! Por serem minhas zelosas anjas da guarda.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Alessandra Delazari-Barroso, Prof^a. Dr^a. Edumar Ramos Cabral Coelho, Prof. PhD Sérgio Túlio Alves Cassini, Prof. Dr. Camilo Dias Junior e Prof^a. Dr^a Regina de Pinho Keller, pelas sugestões, críticas e contribuições para a melhoria e enriquecimento desse trabalho.

Aos amigos (as) super-heróis Ana Régia Depoli, Alciana Rossi, Andréia Carvalho, Amanda do Amaral, Bruna Neumann, Bruno Farias, Cecília Martins, Fernanda Lodi, Flávia Raquel, Gislene Carvalho, Janayna Demoner, Leonardo Gotardi, Lorena Frasson, Monique Barcelos, Olívia Soares, Pollyanna Borgo, Tatiana Stanisiz e Telma Castôr por sempre disponibilizarem seus corações e tempo para me proporcionar alegria, acolhimento, sorriso e ajuda. O amor e o companheirismo incondicional de todos fortaleceram minha fé e persistência! Muito obrigada!

À professora Dr^a Junko Tsukamoto e ao aluno de doutorado Paulo W. Antunes pelos ensinamentos e ajuda nas análises cromatográficas. Ademais fica meu imenso agradecimento aos professores Dr. Celson Rodrigues (saudades do cafezinho com paçoca na cantina!) e Prof. Adelmo Bertolde.

Ao Lucas de Freitas (nosso estimado “Prof. Pardal”) pela ajuda na montagem da infra-estrutura para a incubação das culturas. À Karoline Barros de Souza pela contribuição na análise de dados de crescimento. Aos MSc. Tatiane Matuchack, J. Lima, Stefano Zorzal de Almeida pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Mindszenty J. Garozi pelas dúvidas esclarecidas e pelo incentivo a dar continuidade à pesquisa iniciada. Da mesma forma, ao professor e amigo Dr. Renato R. Netto pela concessão do uso do espectrofotômetro, centrífuga e demais materiais para as análises de clorofila-a.

À equipe de cultivo e às professoras Dr^{as} Sandra Maria F. de O. Azevedo (UFRJ), especialmente ao Pedro Lima, Priscila Koschek e Maria Elisângela dos Santos, por várias dúvidas respondidas nos incontáveis e-mails, sempre com gentileza e paciência, prestando apoio no que fosse preciso; à Dr^a Rosane Maria Aguiar (UFV) (in memoriam) e Dr^a Valéria de Oliveira Fernandes (UFES) e suas equipes por toda atenção, apoio, auxílio e solidariedade nos momentos de execução dessa pesquisa.

À saudosa e querida Prof. Dr^a. Rosane M. Aguiar e sua maravilhosa equipe pelo aprendizado e momentos agradáveis durante o estágio no Laboratório de Ficologia (UFV).

*Ao Anderson de Assis Moraes do Laboratório de Controle de Qualidade de Água (UFV) e Adriana Sales de Magalhães do Laboratório de Ficologia (UFV) pela concessão de amostras da linhagem de *M. aeruginosa* (NPLJ-4) e por toda disponibilidade e atenção, sempre motivadora.*

Aos queridos Ademir Abdalla, Alexandre Agrizzi, Andréia do Rosário, Fabiana Justino, Helenice Torres, João Nali, Júlia Brum, Karoline Barros, Karoline Scarpati, Laila Vaz, Mariana Chagas, Patrícia Senos, Priscilla Zanchetta, Raphael Vasconcellos, Renata Pasini, Renata Chagas, Rodrigo Pratte, Sara Angelino, Suzanne Mariani e Tatiane Matuchack pelo apoio sempre que solicitado e encorajamento diante dos obstáculos! Clã LabFito e LaSan: reduto de pessoas fantásticas!

À Márcia e Paulo César (LabSan), pelo bondade gratuita e zelo com todos os pesquisadores e alunos, tornando nossos dias mais alegres e agradáveis. Foi um enorme prazer conviver com pessoas tão legais!

Como esquecer o trio superpoderoso da CESAN: Docinho (Karine Rubim – KaKa), Florzinha (Cinara Cipriano - Ci) e Lindinha (Catarina Pereira – Cata). Amigas Maravilhosas!!

Aos demais familiares pelo incentivo no contínuo crescimento profissional. Em especial, à tia Eliane Vieira e a prima Natalia que sempre me ofereceram aconchego, risos e carinho; quantas histórias! E a fofíssima M^{as} Eduarda e seus pais Otávio Simonelli (Tavinho) e Junia Garcia; além das famílias Lodi Peres e Rossi de Araújo e à “Grande Família” do Edifício San Raphael.

Aos queridos Irineu Chiappani e Tati Stanisz pela estadia, orientação e amizade. Obrigada Luciana Jesus e Laís Pompermayer pelos momentos de descontração, alegria e inúmeras risadas. Aos novos membros em minha vida: Fábio, Deusane, Janaína, Jairo, Luan e Letícia,

Aos professores, funcionários e colegas do LabSan (Departamento de Engenharia Ambiental - DEA/UFES), do LabFito (Departamento de Ecologia e Oceanografia - DOC/UFES) e da equipe da ETE (DEA/UFES); pelo auxílio e momentos de alegria e descontração. Valeu Wallace e Rose!

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), através do LabSan e do LabFito, que disponibilizaram infra-estrutura, material e equipamentos necessários à execução da pesquisa.

À bolsa de pesquisa do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao apoio financeiro concedido ao projeto pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (UFES) pela oportunidade concedida.

À Dr^a Camila Madalen (SAC/UFES) e a psicóloga-DJ Larissa Ambrósio pela contribuição da minha recuperação neurológica e psíquica, bem como do processo de autoconhecimento. Sedes muito queridas!

Ao Fernando d'Assunção Morgado Junior (Donan) pelo carinho, atenção e paciência! Fico imensamente grata e orgulhosa pelas correções criteriosas de um engenheiro MSc, em Automação e Robótica pelo Instituto Militar de Engenharia (IME). Por iluminar e aguçar minha inspiração e novos sonhos!

Ao biólogo amigo Danilo Camargo Santos (UNESP) pela ajuda com dúvidas e na montagem do abstract, bem como pela companhia, sempre carinhosa e gentil, dias e noites. Somos fascinados pela cianobactérias!

SENHOR, obrigada pela concretização de mais um sonho/meta, pelo crescimento intelectual e profissional e pelos laços de amizade que fortaleci e conquistei! Só em Ti repousa a minha alma e coração! Em Teus braços depósito a minha vida e jornada!

Antonie de Saint-Exupéry menciona em sua mais famosa obra, O Pequeno Príncipe: "Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante". Assim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e encorajaram-me incessantemente para que a execução dessa dissertação fosse finalizada.

OBRIGADA por acreditarem no meu potencial e competência, pelo carinho zeloso e pelas inúmeras orações, em especial pela intercessão de Nossa Senhora! Por todos que passaram pela minha vida nesses anos que, mesmo sem saber, me ensinaram mais do que posso dizer em palavras.

"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças. Perceber, adaptar-se, evoluir: o tripé do progresso."

Charles Darwin

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José Saramago

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos."

Isaac Newton

RESUMO

LÁZARO, G. C. S. **Efeito de níveis de ferro e radiação ultravioleta no crescimento e produção de microcistina em *Microcystis aeruginosa* Kützing NPLJ-4**. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental, Área de Concentração: Saneamento Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2012.

A presente pesquisa teve como objetivo simular e avaliar os impactos de variáveis ambientais (ferro e UV-C) sobre o crescimento e produção de MCY de *M. aeruginosa* (NPLJ-4). Para tanto, tal cepa foi cultivada sob condições controladas. No ensaio do ferro, não houve diferença significativa de densidade, biovolume e clorofila-*a* entre as diferentes concentrações de ferro, enquanto que taxa de crescimento, tempo de duplicação e concentração de toxina apresentaram tal diferença. Foram observadas mais divisões celulares (G) a uma menor taxa nas culturas com maior teor de Fe, causando aumento de densidade e biomassa (vice-versa). As divisões reduziram-se a uma taxa maior até que o Fe ficasse escasso (10, 4, 1 e 0,5 μM , respectivamente). Culturas com 0,5 μM registraram: maior taxa, menor tempo de duplicação, menor densidade e biovolume. Quanto a toxina, células da fase *log* (6^o ao 14^o dia) e estacionária (16^o ao 35^o dia) influenciaram nos altos valores de MCY-LR total das culturas com Fe. Os teores aumentaram do 10^o para o 20^o dia e caíram no 30^o dia nas culturas com 4 e 10 μM Fe. Ademais, o tratamento com 1 μM Fe obteve maior densidade, biovolume, picos de maior área e maiores concentrações de MCY-LR total em relação as culturas com 0,5, 4, e 10 μM Fe, respectivamente. Assim, o crescimento de MA nem sempre está atrelado aos maiores níveis de Fe e uma única célula pode ser responsável por produção de grande quantidade de toxina. Já no experimento de simulação de exposição à radiação UV-C, obteve-se remoção completa da MCY-LR total em meio ASM-1 com floração de *M. aeruginosa*, sendo que mais que 50% da toxina foi degradada nas 2 primeiras horas de exposição. Os valores de MCY-LR total, densidade, biovolume e clorofila-*a* declinaram à medida que o tempo de exposição à UV-C aumentava. Ademais, não ocorreu produção de microcistina LA e RR em nenhum dos experimentos.

Palavras-Chave: Cianobactéria; Estresse; Ferro; Radiação Ultravioleta; Crescimento; Microcistina; CLAE.

ABSTRACT

LÁZARO, G. C. S. **Effect of levels of iron and UV exposure on the growth and production of microcystin in *Microcystis aeruginosa* Kützing NPLJ-4.** 2012. 112f. Dissertation (Master in Environmental Engineering, Area of Concentration: Environmental Sanitation) – Graduate Program in Environmental Engineering, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2012.

This research aimed to simulate and evaluate the impact of environmental variables (iron and UV-C) on *M. aeruginosa* (NPLJ-4) growth and MCY production. This strain was cultivated under controlled conditions. The iron assay did not show significant difference of cell density, biovolume and chlorophyll-a between different iron concentrations, while the growth rate, duplication time and toxin concentration showed that difference. More cell divisions (G) were observed with a lower rate at highest iron content cultures, inducing a cell density and biomass increase. The cell divisions were reduced to a lower rate until the iron become scarce (10, 4, 1 e 0.5 μM , respectively). 0.5 μM cultures registered higher growth rate and lower duplication time, cell density and biovolume. Log (6th to 14th day) and stationary (16th to 35th day) phase influenced the high total MCY-LR values of iron cultures. MCY-LR content increased from 10th to 20th day and reduced in 30th day in the 4 and 10 μM iron cultures. 1 μM iron treatment showed higher cell density, biovolume, biggest area peaks and total MCY-LR concentrations in comparison with 0.5, 4 and 10 μM cultures, respectively. Thus, *M. aeruginosa* growth is not always related to high iron levels and one cell, alone, can be responsible for the production of high toxin content. On the other hand, in the UV-C radiation exposure simulation experiment, complete total MCY-LR remotion was reached in ASM-1 medium with *M. aeruginosa* bloom, with more than 50% of the toxin degraded at the two initial hours of exposure. The total MCY-LR, cell density, biovolume and chlorophyll-a reduced as the UV-C exposure time increased. Finally, did not occurred MCY-LA and MCY-RR production in the experiments.

Keywords: Cyanobacteria; Stress; Iron; UV; Growth; Microcystin; HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura química da microcistina e exemplos da composição dos aminoácidos na formação das variantes de microcistinas. As letras X e Z são dois aminoácidos variáveis.	37
Figura 3.2	Esquema da organização estrutural dos genes <i>clusters</i> das microcistinas (<i>mcy</i>) produzidas pelo gênero <i>Microcystis</i> . As setas indicam a direção de transcrição dos sítios promotores (bi)-direcionais. A escala indica o comprimento dos agrupamentos de genes em pares de bases (kpb).	51
Figura 4.1	Fluxograma do experimento de avaliação dos efeitos da exposição de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4) à diferentes concentrações de ferro. O controle representa as condições ótimas de crescimento no meio de cultura ASM-1.	56
Figura 4.2	Sombrite e papel parafinado utilizados para atenuar a luminosidade até a faixa de luz utilizada nos experimentos. Metodologia de rotação das culturas adotada durante o experimento e disposição das réplicas em cada prateleira.	57
Figura 4.3	Fluxograma do experimento de avaliação dos efeitos da exposição de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4) à radiação ultravioleta C (UV-C).	59
Figura 4.4	(A) Corte frontal da câmara de fluxo laminar e posição dos refratários no tempo zero hora; (B) Corte lateral da câmara com medições e posição do refratário em relação à lâmpada UV-C; (C) Fotografia frontal com destaque para a coloração amarelada das culturas com idade de 35 dias; e (D) Fotografia frontal da câmara e posicionamento dos refratários no tempo zero (ausência de dosagem – D ₀ – de UV-C).	61
Figura 4.5	As duas zonas de contagem da câmara de Neubauer, separadas por um sulco horizontal e limitadas de cada lado por um canal vertical, e a colocação da lamínula sobre estas zonas.	63
Figura 4.6	Zonas de contagem da câmara de Neubauer (X), vista microscópica da área total de contagem na câmara de Neubauer, com destaque em vermelho para o quadrado central (Y) e dos 5 subquadrados (Z) onde foram efetuadas as contagens de <i>Microcystis aeruginosa</i> .	64
Figura 4.7	Fotografia do 6º dia de <i>Microcystis aeruginosa</i> (acervo pessoal) e esquema matemático e ilustrativo do cálculo de biomassa via volume celular.	65

Figura 4.8	Curva de linearidade e regressão linear entre a área do pico da toxina e sua concentração do padrão de microcistina LR (MCY-LR) utilizado para a calibração do método.	72
Figura 4.9	Curva de linearidade e regressão linear entre a área do pico da toxina e sua concentração do padrão de microcistina LA (MCY-LA) utilizado para a calibração do método.	73
Figura 4.10	Curva de linearidade e regressão linear entre a área do pico da toxina e sua concentração do padrão de microcistina RR (MCY-RR) utilizado para a calibração do método.	73
Figura 5.1	Curva logarítmica de crescimento ($\ln \cdot \text{mL}^{-1}$) de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4) sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, ao longo de 35 dias: 0,5 (círculo aberto), 1 (quadrado preto), controle ou 4 (triângulo aberto) e 10 (círculo preto) μM de ferro, respectivamente. Cada ponto representa a média de três réplicas ($n=3$).	76
Figura 5.2	Curva logarítmica da média do biovolume ($\ln \cdot \text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$), representante da biomassa de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, ao longo de 35 dias: 0,5 (círculo aberto), 1,0 (quadrado preto), controle ou 4,0 (triângulo aberto) e 10,0 (círculo preto) μM de íon ferro, respectivamente. Cada ponto representa a média de três réplicas ($n=3$).	78
Figura 5.3	<i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4) cultivada em meio ASM-1, modificado com diferentes concentrações de ferro: destaque para o 10 ^o , 20 ^o e 30 ^o dia de crescimento.	80
Figura 5.4	Taxa de crescimento e o tempo de geração de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4) sob o efeito de diferentes concentrações de ferro. Cada barra representa a média de três réplicas ($n=3$) de cada concentração de cloreto de ferro hexahidratado: 0,5, 1, 4 e 10 μM de ferro, respectivamente.	82
Figura 5.5	Densidade de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e exposição à radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas: 0,5 (círculo aberto), 1 (quadrado preto), controle ou 4 (triângulo aberto) e 10 (círculo preto) μM de ferro, respectivamente.	84
Figura 5.6	Biovolume de <i>Microcystis aeruginosa</i> (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e sob exposição da radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas: 0,5 (círculo aberto), 1 (quadrado preto), controle ou 4 (triângulo aberto) e 10 (círculo preto) μM de ferro, respectivamente.	85

- Figura 5.7 Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e sob exposição da radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas. Cada barra representa um horário, que aumenta de forma gradativa de zero hora ou sem exposição (branca) a 8 horas (preta). 86
- Figura 5.8 Concentração de feopigmentos de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e sob exposição da radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas. Cada barra representa um horário, que aumenta de forma gradativa de zero hora ou sem exposição (branca) a 8 horas (preta). 86
- Figura 5.9 Alterações na divisão celular de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) depois da exposição ao UV-C. Esta cianobactéria foi cultivada em meio ASM-1, modificado com diferentes concentrações de ferro. Observação das células expostas à UV-C por 2h (A), 4h (B) e 6h (C) no microscópio óptico (aumento 400x). 88
- Figura 5.10 Concentração média de microcistina-LR total produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) avaliada a partir dos teores do 10^o, 20^o e 30^o dia de cultivo sob diferentes concentrações de ferro. As barras representam as médias dos três dias avaliados em termos de concentração de toxina, de cada tratamento e do controle: 0,5, 1, 4 e 10 μ M de ferro, respectivamente. 89
- Figura 5.11 Concentração de microcistina-LR total, produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4), avaliada no 10^o, 20^o e 30^o dia de cultivo, sob o efeito de diferentes concentrações de ferro. As barras representam as médias de três réplicas (n = 3) da concentração de toxina de cada tratamento e do controle: 0,5, 1, 4 e 10 μ M de ferro, respectivamente. O asterisco* significa que a concentração é superior ao limite de quantificação da curva de calibração. 90
- Figura 5.12 Concentração de microcistina-LR total, produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) avaliada durante o tempo de exposição de culturas, com diferentes concentrações de ferro, à radiação UV-C. As barras representam as concentrações de toxina de cada horário do controle e dos tratamentos, 0, 2, 4, 6 e 8 horas, respectivamente. O asterisco* significa que a concentração é superior ao limite de quantificação da curva de calibração. 93
- Figura 5.13 Efeito da dosagem da radiação UV-C, ao longo de 8 horas, sobre a área do pico cromatográfico da microcistina-LR total, produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) e submetida a diferentes concentrações de ferro. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Classificação geral das principais cianotoxinas, ação, órgãos-alvo e gêneros produtores	28
Tabela 3.2	Resumo das normativas da Portaria MS nº 518/2004 quanto ao monitoramento de cianobactérias e análise de cianotoxinas	40
Tabela 3.3	VMP's e tipos de análises das cianotoxinas em águas potáveis destinadas ao consumo humano segundo as Portarias do Ministério da Saúde nº 518/2004 e nº 2.914/2011	42
Tabela 3.4	VMP dos padrões biológicos (clorofila- <i>a</i> , densidade e biovolume) para classes de água doce segundo CONAMA nº 357/2005 (alterada pelas Resoluções nº 410/2009 e 430/2011)	43
Tabela 4.1	Composição das quatro soluções estoque do meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964) e suas proporções para a preparação de um litro de meio de cultura, utilizado como substrato ao cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i>	54
Tabela 4.2	Concentrações do inóculo (densidades médias de cada tratamento e do controle (n=3) utilizadas no experimento de exposição à radiação UV-C e as concentrações iniciais obtidas no volume final de 600 mL	58
Tabela 4.3	Medidas estruturais da capela, dos refratários e do delineamento experimental	60
Tabela 4.4	Esquema de rodízio das culturas de <i>Microcystis aeruginosa</i> (NPLJ-4) nos refratários de vidro expostos à UV-C a cada 2 horas	62
Tabela 4.5	Gradiente linear dos solventes A (água e TFA 0,1%) e B (acetonitrila e TFA 0,1%), sob fluxo de 0,8 mL por minuto, utilizado para análise de microcistinas por CLAE-PDA, de acordo com método validado por Martins (2010)	71
Tabela 4.6	Limite de Detecção (LD) e de quantificação (LQ) das variantes de microcistina (MCY) conforme método validado por Martins (2010)	72
Tabela 5.1	Teores de clorofila- <i>a</i> de uma linhagem da cepa tóxica NPLJ-4 de <i>M. aeruginosa</i> sob o efeito de diferentes concentrações de ferro	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1	Metodologias de detecção de cianotoxinas: usos, vantagens e desvantagens.	45
------------	---------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	CIANOACTÉRIAS.....	21
3.2	CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS DE CIANOACTÉRIAS	26
3.3	IMPACTOS DAS CIANOTOXINAS NA SAÚDE PÚBLICA	31
3.4	<i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> E MICROCISTINAS	33
3.5	LEGISLAÇÃO, PADRÕES E LIMITES DE CIANOTOXINAS.....	39
3.6	MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS: CLAE	44
3.7	IMPACTOS E TECNOLOGIAS PARA REMOÇÃO DE CIANOACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....	47
4	METODOLOGIA	52
4.1	MANUTENÇÃO DAS VIDRARIAS E MATERIAIS	52
4.2	MANUTENÇÃO DAS CULTURAS ESTOQUES	52
4.3	EXPERIMENTOS DE ESTRESSE FISIOLÓGICO	55
4.3.1	<i>Efeito de diferentes níveis de ferro sobre <i>Microcystis aeruginosa</i></i>	55
4.3.2	<i>Efeitos da exposição de <i>Microcystis aeruginosa</i> à radiação ultravioleta</i>	58
4.4	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> (NPLJ-4)	62
4.4.1	<i>Densidade numérica, biovolume celular e curva de crescimento</i>	62
4.4.2	<i>Concentrações de clorofila-a: estimativa da biomassa</i>	66
4.5	ANÁLISES QUANTITATIVAS DE MICROCISTINAS POR CLAE-PDA.....	68
4.5.1	<i>Padrões cromatográficos, solventes e reagentes</i>	68
4.5.2	<i>Extração, determinação e quantificação de microcistina em CLAE-PDA</i>	69
4.5.3	<i>Construção das curvas analíticas da microcistina</i>	72
4.6	TRATAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	74
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO E BIOMASSA DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	75
5.1.1	<i>Exposição a diferentes concentrações de íon ferro</i>	75
5.1.2	<i>Exposição à radiação ultravioleta C (UV-C)</i>	83
5.2	EFEITOS QUALITATIVO E QUANTITATIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MICROCISTINA	88
5.2.1	<i>Exposição a diferentes concentrações de íon ferro</i>	88
5.2.2	<i>Exposição à radiação ultravioleta C (UV-C)</i>	92
6	CONCLUSÕES	95
7	RECOMENDAÇÕES	96
8	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE Aa – Biovolume ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) de <i>Microcystis aeruginosa</i> (NPLJ-4) sob o efeito das concentrações de 0,5 μM e 1 μM de ferro	111
	APÊNDICE Ab – Biovolume ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) de <i>Microcystis aeruginosa</i> (NPLJ-4) sob o efeito das concentrações de 4 μM e 10 μM de ferro	112
	APÊNDICE B – Dados fisiológicos e de microcistina-LR de <i>Microcystis aeruginosa</i> (NPLJ-4) sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e exposição à radiação UV-C por 8 horas	113

1 INTRODUÇÃO

A intensificação das atividades antropogênicas e o manejo inadequado dos recursos hídricos tem acarretado o aumento e a aceleração da eutrofização dos ambientes aquáticos superficiais, resultando na deteriorização da qualidade da água e na proliferação excessiva (floração ou “*bloom*”) de algas, principalmente as cianobactérias, que ocasionam efeitos deletérios ao longo da cadeia alimentar, prejuízos ecológicos e socioeconômicos, e riscos a saúde pública e biota aquática.

Dentre as modificações provocadas pelas florações tem-se o comprometimento dos usos dos ecossistemas aquáticos através da mortandade de peixes, perda das qualidades cênicas, limitação do uso recreacional, elevação dos custos e redução da eficiência do tratamento de água para abastecimento público, alterações organolépticas à água (cor, odor e sabor), condições anaeróbicas no fundo e/ou em toda coluna d’água, alterações quali-quantitativa sobre as comunidades biológicas, além do perigo iminente provocado pelas cianotoxinas que coloca em risco a saúde humana (VON SPERLING, 2005; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; PÁDUA, 2006; SANT’ANNA *et al.*, 2006).

As cianofíceas dominam em corpos d’água lênticos (baixa turbulência) e poluídos e podem produzir e liberar esses metabólitos secundários tóxicos, mutagênicos, genotóxicos, alergênicos e carcinogênicos na massa líquida (CHORUS; BARTRAM, 1999; CODD, 2000). Pesquisas demonstram que 52% dos ecossistemas continentais brasileiros apresentam altas percentagens de cianobactérias e ocorrência de intensas florações, sendo essa dominância marcante em lagunas costeiras (HUSZAR; SILVA, 1999).

Nesse contexto, as cianobactérias e cianotoxinas são frequentemente utilizadas em programas de monitoramento, controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, visando atender as exigências da Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (MS), que preconiza a quantificação destas microalgas e a análise das hepatotoxinas (microcistinas e cilindrospermopsinas) e anatoxina-a, cujo limite máximo permitido em água potável é de $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para ambas toxinas. Anteriormente, a Portaria MS nº 518/2004 estabelecia valor máximo permitido (VMP) de $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para cilindrospermopsinas e não mencionava o controle da anatoxina-a.

A Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) – alterada pelas Resoluções CONAMA nº 410/2009 e 430/2011 (BRASIL – MMA, 2012) – prevê apenas análise quantitativa de cianobactérias e determinação do biovolume das mesmas. Parte das normas da Portaria MS e desta Resolução ainda não foi adotada por várias companhias de saneamento brasileiras.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS (OMS, 2011) e Chorus e Bartram (1999), os dados existentes em literatura sobre a toxicidade das florações em corpos d'água ainda são insuficientes para determinar valores-guia seguros em água potável. No Brasil, a Portaria MS nº 2.914/2011, em substituição à Portaria 518/2004, incluiu, dentre outros parâmetros, as saxitoxinas no padrão de potabilidade, cujo VMP é de $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalente de STX (saxitoxina), assegurando maior eficiência no controle de qualidade da água potável.

A grande diversidade metabólica e adaptativa das cianobactérias permite tolerar e adaptar-se a situações ambientais adversas (WHITTON; POTTS, 2000). Em contrapartida, a formação de florações é favorecida por fatores ambientais, tais como águas neutro-alcálinas, temperaturas acima de 20°C; concentrações de oxigênio baixas e nutrientes em abundância (especialmente nitrogênio, fósforo e ferro); estabilidade da coluna d'água; pela razão N:P, intensidade de luz e ação da herbivoria (DAWSON, 1998; CHORUS; BARTRAM, 1999; AZEVEDO; MARINHO; MAGALHÃES, 2003; FERNANDES *et al.*, 2009).

As mudanças climáticas globais também estão interferindo na ocorrência das florações (DAVIS *et al.*, 2009), os quais podem apresentar cepas tóxicas e não-tóxicas dentro de uma mesma espécie, sendo difícil separá-las fenotipicamente (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Dentre as várias cianotoxinas, a ocorrência de hepatotoxinas já foi notificada em todos os continentes, sendo microcistina, a mais registrada em todo planeta (SIVONEN; JONES, 1999; MOLICA; AZEVEDO, 2009) e a primeira identificada, com isolamento pioneiro em *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL *et al.*, 1988); todavia, outros gêneros já foram citados como produtores desta toxina.

O tempo de degradação das microcistinas é variável e dependente de fatores como presença de microrganismos, temperatura da água, pH, disponibilidade de fontes de carbono orgânico e concentração inicial da toxina (BRASIL - FUNASA, 2003; GOMES *et al.*, 2009)

Diversas publicações simularam durante anos o impacto dos fatores ambientais em cepas tóxicas. Esses testes são importantes ferramentas para se determinar o papel de tais fatores na biossíntese de microcistina, que é específica de cada espécie (AMÉ; WUNDERLIN, 2005; MOLICA; AZEVEDO, 2009), e tentar criar e aplicar tecnologias na eliminação da toxina da água potável e na recuperação de mananciais eutrofizados. *Microcystis aeruginosa* é o organismo-teste mais utilizado pelos pesquisadores, uma vez que esta espécie pode produzir microcistina, apresenta ampla ocorrência geográfica e está associada com florações sazonais.

Além disso, cultivo e estudos em laboratório tem permitido um melhor conhecimento sobre as estratégias e fatores que estimulam a resposta adaptativa das espécies frente às inúmeras situações que podem ocorrer nos ecossistemas aquáticos, tornando as extrapolações para estes ambientes o mais realistas (ZEVENBOOM, 1987 *apud* FERREIRA, 2007).

A distribuição generalizada de cianobactérias potencialmente tóxicas tem promovido estudos intensivos em campo e em condições de laboratório. Na detecção e quantificação das cianotoxinas são empregados vários métodos como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), imunoenaios (ELISA), inibição da proteína fosfatase e técnicas moleculares, além de bioensaios com camundongos (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999; PÁDUA, 2006; YUAN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006). A CLAE é o método analítico frequentemente utilizado na determinação de microcistinas (NICHOLSOM; BURCH, 2001), seja em mananciais ou em cultivos.

Sendo assim, a presente pesquisa simulou e avaliou os impactos de uma variável química e uma física sobre o crescimento e produção de microcistina por uma cepa tóxica de *M. aeruginosa*, cultivada em condições controladas. Tais dados contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos ecofisiológicos e do papel dos fatores ambientais na produção das toxinas, já que estes ainda não são claros. Ademais, este estudo fornecerá subsídios para pesquisas futuras no que tange ao estabelecimento de estratégias e intervenções (corretivas e preventivas), tanto no controle da eutrofização como das florações, assim como no monitoramento, controle e recuperação da qualidade da água.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência de efeitos químico (ferro) e físico (radiação ultravioleta) sobre o crescimento e produção de microcistina por uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (Kützing).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar respostas fisiológicas estabelecendo parâmetros associados ao crescimento e à produção de microcistina por uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) submetida a diferentes concentrações de ferro e da exposição à radiação ultravioleta.
- Determinar as curvas de crescimento a partir da densidade numérica, biovolume celular e das concentrações de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) submetida a diferentes situações de estresse.
- Determinar as taxas de crescimento (experimento nutricional) e de inibição do crescimento (experimento de radiação ultravioleta) a partir da densidade numérica de *Microcystis aeruginosa*.
- Realizar avaliação quantitativa de microcistina-LA, LR e RR total das culturas de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) submetida aos experimentos de estresse fisiológico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias (cianofíceas ou cianoprocariontes) são organismos procarióticos (sem núcleo celular definido), gram-negativos, aeróbicos, uni ou pluricelulares, solitários ou coloniais e com reprodução apenas assexuada, contidos na comunidade fitoplanctônica. Além disso, podem ter sido responsáveis pela evolução da vida no planeta (WHITTON; POTTS, 2000), uma vez que tiveram papel fundamental na formação e manutenção do oxigênio na atmosfera ao longo da história evolucionária (SAMPAIO; CARNEIRO; PINTO, 2011).

Ainda, estas são capazes de fixar carbono através da fotossíntese e obter elétrons da água (fotoautotróficos obrigatórios), contribuindo, deste modo, na produtividade primária e no fluxo de energia em ecossistemas aquáticos (FERRÃO-FILHO; MOLICA; AZEVEDO, 2009). As cianobactérias também realizam fotossíntese anóxica, ou seja, sem oxigênio (típica das bactérias fotossintetizantes), cujo doador de elétrons é o H₂S (ácido sulfídrico); e habilidade de sintetizar a matéria orgânica sob condições anaeróbicas ou crescer no escuro à custa de substrato orgânico (heterotróficas) (GRAHAM; WILCOX, 2000; BRASIL – FUNASA, 2003).

Ademais, as cianofíceas estão presentes em todos os biótopos aquáticos (interface água/ar, coluna d'água e sedimento) segundo Esteves (1998), e podem ser fitoplanctônicas (vivem em suspensão na coluna d'água), bentônicas (aderidas no fundo de ambientes aquáticos), ficoperifíticas (aderidas à diversas superfícies), e aerofíticas (WHITTON; POTTS, 2000; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Cianobactérias perifíticas são observados em ecossistemas lênticos, lóticos e marinhos e ocorrem em habitats epipélicos, episâmicos, epilíticos ou epifíticos. Massas perifíticas (*Aphanothece*, *Oscillatoria* e *Phormidium*) podem se desenvolver nas rochas e sedimentos, em águas paradas e, posteriormente, formar densas massas flutuantes, que podem produzir toxinas (KOMÁREK; KLING; KOMÁRKOVÁ, 2003).

A maioria das espécies cresce preferencialmente em águas neutro-alcálinas (pH entre 6 e 9), em temperaturas entre 15°C e 30°C; e com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Embora as cianobactérias apresentem simplicidade organizacional, elas resistem às variações ambientais drásticas (naturais ou antrópicas), devido às adaptações bioquímicas, fisiológicas, genéticas, morfológicas e reprodutivas (WHITTON; POTTS, 2000; AZEVEDO, 2001; BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SANT'ANNA *et al.*, 2006).

As cianobactérias realizam a fotossíntese nos ficobilissomos, que são moléculas complexas nos quais estão organizadas as ficobiliproteínas, também chamadas de ficobilinas. Esses ficobilissomos são encontrados nos tilacóides ao invés dos cloroplastos observados nas plantas superiores. Entretanto, o processo fotossintético em cianobactérias e plantas superiores são similares (WHITTON; POTTS, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Ademais, as cianobactérias possuem clorofila-a e pigmentos acessórios hidrossolúveis como as ficobilinas, que são formadas pela ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina. A ficocianina confere às células coloração azul brilhante, a ficoeritrina concede cor avermelhada e aloficocianina (verde-azul). Carotenóides e xantofilas, também são pigmentos acessórios, aos quais são atribuídas às tonalidades pardas (CHORUS; BARTRAM, 1999; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SONI *et al.*, 2006).

Essas ficobilinas são componentes de um sistema de antena que auxilia na captação de luz para o processo fotossintético e proteção da clorofila-a da fotoxidação. Tais pigmentos ao absorver a irradiação solar em comprimentos de onda diferentes, possibilitam a sobrevivência destas algas em ambientes com pouca luz (WHITTON; POTTS, 2000; SANT'ANNA *et al.*, 2006). As absorções máximas para ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina estão entre 610-640 nm, 540-575 nm e 650-655 nm, respectivamente (SONI *et al.*, 2006).

Paerl e Millie (1996) destacam a vantagem eco-evolutiva das cianobactérias de utilizar a energia luminosa em ambos os extremos do espectro visível, ou seja, no comprimento de onda azul, que pode penetrar até o fundo da coluna de água, e no de onda vermelho, que se extingue em menor profundidade, ou seja, próxima da superfície d'água (LEMASSON; DE MARSAC; COHEN-BAZIRE, 1973). Esta vantagem não é observada na maioria dos espécimes da comunidade fitoplanctônica.

A elevada diversidade metabólica e ecológica das cianobactérias contribui para o sucesso competitivo e ocupação de diferentes nichos e ecossistemas aquáticos (dulcícolas, salobros e marinhos) e ambientes terrestres (vivem sobre rochas ou solo úmido), com ocorrência, inclusive, em habitats extremos e inóspitos, caso de locais com baixas e altas temperaturas (fontes termais e gêiseres, desertos), águas ácidas, hiper-salinas, com concentrações baixas de oxigênio e elevadas de metais pesados (GRAHAM; WILCOX, 2000; WHITTON; POTTS, 2000; SANT'ANNA *et al.*, 2006).

A salinidade pode inibir o desenvolvimento de florações tóxicas em mananciais eutróficos ao diminuir o crescimento e produção de cianotoxinas, caso de cianobactérias de águas estuarinas, que dependem da habilidade nas rápidas mudanças osmóticas (SAMPAIO, 2008).

Também são encontradas em áreas expostas à alta irradiação de ultravioleta do tipo UV-B e UV-C (regiões polares – Ártico e Antártica) (VICENT; MUELLER; BONILLA, 2004), além de sobreviverem em baixas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) (WHITTON; POTTS, 2000; SAMPAIO, 2008). Ademais, cianofíceas são tolerantes a dessecação (WHITTON; POTTS, 2000; SAMPAIO, 2008).

Além disso, esses microrganismos podem colonizar folhas de plantas vasculares como o café e o maracujá (aerofíticas) (MACHADO, 2011), aparecer na formação de biofilmes em solos contaminados com derivados do petróleo (CORRÊA, 2007) e efluentes, onde estas cianofíceas podem atuar tanto na biodegradação quanto na bioindicação de poluentes.

Jančula e colaboradores (2007) investigaram os efeitos após aplicação de extratos de raízes da Família Papaveraceae sobre o crescimento de cianobactérias e outros organismos para avaliar a possível utilização como algicidas no ambiente aquático e constataram a eficácia destas microalgas. Publicação de Codd, Morrison e Metcalf (2005) levanta a hipótese de que bactérias heterotróficas associadas estariam envolvidas na produção de cianotoxinas ou na sua modulação, o que poderia refutar pesquisas anteriormente propostas (herbivoria, efeito alelopático, quelante, dentre outros).

Estudos reforçam que há diferenças genótípicas individuais dentro da mesma espécie, onde algumas possuem genes para produzir determinada toxina e outras não (MOLICA; AZEVEDO, 2009; SOARES, 2009). Desta forma, a diferença entre as populações tóxicas e atóxicas de *Microcystis* estaria na presença de um ou mais genes *mycB*, que codificam para a enzima microcistina sintetase, responsável pela produção de microcistina (NISHIZAWA *et al.*, 2000; BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003). De acordo com Carmichael (1994), em 50 a 75% das florações, a toxicidade associa-se a produção simultânea de diversas cianotoxinas.

Ressalta-se que muitos caracteres morfológicos como espessura da mucilagem, tamanho e distribuição das células na colônia sofrem alterações quando as células são submetidas a diferentes condições de cultivo. As mudanças morfológicas que quase sempre ocorrem durante cultura prolongada, geralmente são acompanhadas por mudanças fisiológicas (WHITTON; POTTS, 2000).

Branco (1986) e diversos pesquisadores argumentam que cianofíceas são excelentes sensores e defende a utilização das mesmas como indicadores da qualidade ambiental. Elliott (2012) destaca que a sensibilidade às mudanças ambientais está relacionada ao tempo de geração muito curto, todavia com expressiva contribuição à produtividade. Além disso, cianobactérias não são palatáveis ao zooplâncton.

Vale ressaltar que cianobactérias e demais grupos de algas tem sido alvo de pesquisas pelos setores farmacêutico, agrícola, alimentício e de energia, em função do possível potencial farmacológico, pelo seu alto valor nutritivo, pela influência que exercem sobre a fertilidade de solos e águas, bem como na produção de biodiesel, respectivamente.

Além disso, cianopeptídeos com potencial antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, fungicida, de inibição enzimática, com atividade imunossupressora, efeitos citotóxicos e algicida foram isolados de cianobactérias (SAMPAIO; CARNEIRO; PINTO, 2011).

Algumas espécies ainda são capazes de fixar e reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) a amônia (espécies diazotróficas) através dos heterocitos; e de entrar em estado de latência, transformando-se em células de resistência (acinetos), que acumulam proteínas quando o ambiente é desfavorável à sua sobrevivência (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Ademais, as cianofíceas apresentam capacidade de armazenar polifosfatos; de regular a flutuabilidade (bainha de mucilagem e aerótopos) para proteger-se dos predadores; elevada velocidade reprodutiva; reduzir a sedimentação; migração vertical na coluna d'água, que permite posicionar-se em regiões com maior iluminação (quantidade e qualidade) e com melhor disponibilidade de nutrientes (OLIVER; GANF, 2000; WHITTON; POTTS, 2000; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SANT'ANNA *et al.*, 2006). Ainda, a mucilagem ajuda a reter o dióxido de carbono quando em concentrações relativamente baixas de acordo com vários pesquisadores.

Florações de cianobactérias são favorecidas pelas condições eutróficas de ecossistemas aquáticos eutrofizados; contudo, florações já foram registradas em mananciais oligotróficos e mesotróficos (FERNANDES *et al.*, 2009). Em recursos hídricos circundados por áreas urbanas e industriais, as florações atingem percentuais acima de 80% do total da biomassa da comunidade fitoplanctônica (HUSZAR; SILVA, 1999; BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003). Lembrando que zonas rurais e fenômenos hidrológicos e edáficos também são expressivos para a entrada de nutrientes.

Cita-se que cianobactérias podem apresentar uma taxa de crescimento relativamente alta quando comparada a outros organismos da comunidade fitoplanctônica, principalmente em ambientes com luminosidade baixa (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Essas florações provocam alterações das propriedades organolépticas da água e das condições estéticas, causando impactos ecológicos, sanitários, sócioeconômicos e à saúde pública, uma vez que estas algas podem causar intoxicações agudas ou crônicas às populações humanas e à biota aquática, embora esta seja mais rara. Segundo Codd (2000), a ingestão de cianotoxinas ocorre através do consumo de água, peixes ou outros animais bioacumulativos e pelo contato direto com a água.

Inúmeros registros de florações de cianobactérias foram realizados no Brasil, sendo que uma expressiva parcela (maior que 50%) tem reconhecido potencial tóxico (YUNES *et al.*, 1996). De acordo com Sivonen e Jones (1999) e Sant'Anna e Azevedo (2000), *Microcystis aeruginosa* Kützing é reconhecida como a espécie mais comum nas florações nocivas e possui distribuição ampla em todo o mundo, chegando a representar mais de 50% da biomassa total de algas em alguns lagos (ZOHARY; BREEN, 1999 citado por FERNANDES *et al.*, 2009). Em contrapartida, o gênero *Anabaena* tem o maior número de espécies potencialmente tóxicas (CARMICHAEL, 1994; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000).

3.2 CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS DE CIANOBACTÉRIAS

As cianotoxinas são metabólitos secundários¹, com estrutura química e propriedades toxicológicas diversas (SIVONEN; JONES, 1999), que estão presentes no interior das células, sendo liberadas na água em situações de *lise*² das células senescentes, mudanças na permeabilidade da parede celular, e/ou indução de agentes que controlam o crescimento (algicidas). Pesquisas relatam que linhagens (cepas³) de uma mesma espécie podem ou não produzir essas toxinas (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; CYBIS *et al.*, 2006; PÁDUA, 2006; MOLICA; AZEVEDO, 2009; SOARES, 2009).

¹ Compostos não essenciais para o metabolismo primário, sintetizados em condições em que o crescimento cessa.

² A cianotoxina produzida dentro da célula é conhecida como toxina intracelular ou endotoxinas. Quando ocorre rompimento da membrana, a toxina liberada no meio aquoso passa a denominar-se toxina extracelular ou dissolvida.

³ Cepa tóxica: uma população de determinada espécie produtora de cianotoxina que apresenta a mesma descendência, ou então proveniente da mesma cultura em termos laboratoriais.

As toxinas podem persistir no meio aquático por dias a várias semanas e sua degradação é dependente de condições específicas do meio, como pH, temperatura da água, intensidade luminosa, concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, presença de elementos traço, variação genética e herbivoria (CHORUS; BARTRAM, 1999; ZURAWELL *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2009).

As toxinas supracitadas provocam morte ou prejudicam a biota aquática (zooplâncton, invertebrados, moluscos, peixes) através da biomagnificação ao longo da cadeia trófica (CHORUS; BARTRAM, 1999; CODD, 2000; MOLICA; AZEVEDO, 2009).

As cianotoxinas são produzidas por algumas espécies em todos os estágios do crescimento celular e em determinadas condições ecofisiológicas ainda não bem esclarecidas. Estas toxinas podem ser incluídas em três grandes grupos químicos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos (LPS) (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Já em termos farmacológicos as toxinas são classificadas em quatro grupos: hepatotoxinas (microcistina, nodularinas e cilindrospermopsinas); neurotoxinas (anatoxina-a(s), anatoxina-a, homoanatoxina-a, beta-N-metilamino-L-alanina (BMAA) e saxitoxina); dermatotoxinas (endotoxinas ou LPS); e inibidores da síntese proteica, chamadas citotoxinas (cilindrospermopsinas, debromoaplisiotoxina e lyngbyatoxina-a). Ainda, as cianotoxinas classificam-se conforme o modo de ação destas nos órgãos e tecidos alvos, principalmente em animais superiores (Tabela 3.1) (CARMICHAEL, 1992; CHORUS; BARTRAM, 1999; BRASIL - MS; 2004; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; MOLICA; AZEVEDO, 2009; SOARES, 2009). Há cianobactérias com perfil eco-toxicológico ainda desconhecidos.

A cilindrospermopsina é um alcalóide com potencial genotóxico que causa alterações citológicas essencialmente no fígado (ação hepatotóxica) (SIVONEN; JONES, 1999; MANKIEWICZ *et al.*, 2003). Já as dermatotoxinas produzem alergias, irritações na pele e olhos e atuam no trato intestinal e são representadas pela aplosiotoxinas e lyngbyatoxinas (SIVONEN; JONES, 1999; BRASIL – FUNASA, 2003).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas pirogênicas que compõem a parede celular de todos os gêneros de cianobactérias e bactérias gram-negativas (SIVONEN; JONES, 1999). Contudo, a toxicidade nas cianofíceas é menor que as produzidas por bactérias, caso do gênero *Salmonella* (CHORUS; BARTRAM, 1999; KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1999 *apud* CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Tabela 3.1 – Classificação geral das principais cianotoxinas, ação, órgãos-alvo e gêneros produtores

Metabólito	Ação Biológica	Alvo da Toxina	Gênero Produtores
Microcistinas	Hepatotóxica (inibe as enzimas fosfatase 1 e 2A)	Fígado (hepatócitos)	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Radiocystis</i> , espécies picoplanctônicas
Nodularinas	Hepatotóxica (inibe as enzimas fosfatase 1 e 2A)	Fígado (hepatócitos)	<i>Nodularia</i>
Cilindrospermopsinas	Hepatotóxica e Citotóxico	Fígado, rins, coração, baço, etc; e inibe a síntese de proteínas	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i>
Anatoxina-a	Neurotóxica (liga-se ao receptor da acetilcolina)	Nervo sináptico (superestimulação e paralisação muscular)	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Planktothrix</i>
Anatoxina-a(s)	Neurotóxica (inibição da acetilcolinesterase)	Nervo sináptico (superestimulação e paralisação muscular)	<i>Anabaena</i>
Saxitoxinas	Neurotóxica (liga-se e bloqueia os canais de sódio)	Membrana do axônio (inibição da condução nervosa)	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i>
Aplisiotoxina	Dermatotóxica	Pele	<i>Lyngbya</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Schizothrix</i>
Lyngbyatoxina-a	Dermatotóxica	Pele e trato gastrointestinal	<i>Lyngbya</i>
LPS ou Endotoxinas	Dermatotóxica	Potencial irritante em qualquer tecido exposto	Todas cianobactérias

Fonte: Chorus e Bartran (1999); Bittencourt-Oliveira e Molica (2003); modificado de Pádua (2006).

É importante advertir que neurotoxinas (alcalóides ou organofosforados) são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte de mamíferos por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Já as hepatotoxinas atuam mais lentamente (BEVILACQUA; AZEVEDO; CERQUEIRA, 2009).

Os pesquisadores supracitados, ademais, sugerem que a BMAA possa ser responsável pela esclerose amiotrófica lateral (ALS), grave doença neurológica que se caracteriza por paralisia progressiva associada ao Mal de Parkinson e à Doença de Alzheimer, atualmente designada pela sigla ALS-PDC (complexo ALS-Parkinson-Demência). As cianobactérias estão também associadas à produção de metabólitos não tóxicos que conferem gosto e odor à água: geosmina e 2-metilisoborneol (MIB).

Sampaio, Carneiro e Pinto (2011) comparam a toxicidade do ofídio *Naja* sp., uma das serpentes mais letais, com as toxinas das cianobactérias. Eles observaram que a DL50⁴ do veneno do gênero *Naja* (20 µg•kg⁻¹ de peso corpóreo) é menor que as DL50 das cianotoxinas listadas na Tabela 1, exceto para saxitoxina (10 µg•kg⁻¹) e β-N-metilamino-L-alanina (ausente). Sendo que a anatoxina-a, com ação neurotóxica, é mil vezes mais letal que o veneno do ofídio supracitado (SAMPAIO; CARNEIRO; PINTO, 2011).

Ainda não há um consenso sobre a função das cianotoxinas, mas estudos apontam que estas substâncias possuem efeito alelopático (CYBIS *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2009) e são produzidas como defesa contra a herbivoria pelo zooplâncton, no entanto, esta ideia coexiste com pesquisas que a contradizem (SANTOS, 2009).

Outra possibilidade é que esteja relacionada à comunicação intercelular, seja intra ou interespecífica (DITTMANN *et al.*, 2001), ou ainda, que as toxinas poderiam atuar como quelantes de metais pesados (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Publicações mais recentes relatam que as microcistinas poderiam desempenhar um papel relacionado ao controle da concentração de carbono inorgânico intracelular (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

⁴ DL50 é a dose letal que mata 50% da população que entra em contato com a toxina (AZEVEDO, 1998; CHORUS; BARTRAM, 1999).

Santos (2009) sugere em sua pesquisa que *Microcystis sp.* (cepa MILJ-48) promove a liberação de um sinal ainda desconhecido que interfere na sua própria divisão celular e levanta a hipótese da participação da microcistina nesta sinalização célula-célula (*quorum sensing* ou autoindução), controlando as funções fisiológicas, inclusive de organismos tóxicos, antes da expressão do fenótipo. Logo, esta toxina não seria um metabólito secundário, uma vez que desempenha um papel essencial em cianobactérias toxigênicas (SANTOS, 2009).

Paerl e Millie (1996), Dittmann e coparticipantes (2001) também defendem a ideia das cianotoxinas como potenciais moléculas mediadoras em interações de cianobactérias com outros componentes do habitat, como bactérias heterotróficas, fungos, protozoários e demais microalgas.

Segundo Chu e coautores (2010), o aumento da densidade populacional provocaria a emissão de sinais químicos através de pequenas moléculas sinalizadoras, estabelecendo comunicação intercelular (*quorum sensing*) entre cianobactérias e respondendo às mudanças ambientais. Portanto, essas microalgas monitoram a densidade antes da expressão fenotípica através desta autoindução (CHU *et al.*, 2010).

Cordeiro-Araújo (2012) obteve resultados que comprovaram a hipótese de que a liberação ativa de microcistina intracelular de *M. aeruginosa* para o meio extracelular é controlada por um ritmo endógeno, sem que ocorra rompimento da célula. A autora provou também que a densidade populacional está diretamente relacionada ao aumento das microcistinas intracelulares, que pode ser uma comunicação semelhante a *quorum sensing*.

Diante do exposto, resta a comunidade científica esclarecer a função natural dos metabólitos secundários nos organismos, já que a sinalização celular e ambiental executada pelos metabólitos secundários ainda não está totalmente clara na literatura.

3.3 IMPACTOS DAS CIANOTOXINAS NA SAÚDE PÚBLICA

A ocorrência de florações tóxicas é relatada em todos os continentes como fator de risco à saúde humana e ambiental. No Brasil, o primeiro caso comprovado cientificamente sobre a toxicidade das cianobactérias ocorreu em Caruaru (Pernambuco), no ano de 1996, com a morte de mais de 50 pacientes renais crônicos devido à presença de microcistina nas águas de hemodiálise (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Diante da fatalidade supracitada, que teve repercussão internacional, despertou-se a atenção e preocupação para o efeito drástico de microcistina no sangue humano, e mobilizou autoridades ligadas à saúde e a comunidade científica para o estudo de seu impacto nos ecossistemas aquáticos, na ecologia, no saneamento e na saúde pública, uma vez que a água é fonte de alimento e de sobrevivência (KAMOGAE; HIROOKA, 2000).

Teixeira e colaboradores (1993) relataram a ocorrência de cerca de dois mil casos de gastroenterite na Bahia, das quais 88 pessoas foram a óbito, causados possivelmente por florações dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena* no reservatório de Itaparica, localizado na região de Paulo Afonso.

Paralelamente na China, Carmichael (1994) expõe o óbito de animais provocado por florações tóxicas de *Microcystis*, que ainda podem estar relacionado com o alto índice de casos de câncer de fígado, já que a população se abastece da água contaminada com cianobactérias tóxicas.

Ainda, Falconer (1999) descreve que existem diversos registros de morte de rebanho bovino, ovino, suíno e equino; e de cães, peixes e invertebrados por envenenamento através da ingestão ou contato com essas florações tóxicas.

De acordo com Sampaio, Carneiro e Pinto (2011), houve notificação de floração dos gêneros tóxicos de *Microcystis* e *Anabaena* no reservatório do Funil e no rio Guandu, em novembro de 2011. Estes mananciais (detecção de $0,4 \mu\text{g}$ de $\text{MCY}\cdot\text{L}^{-1}$) são responsáveis pelo abastecimento de água potável no Rio de Janeiro, e a floração provocou outro incidente de exposição de pacientes à microcistina (concentração $\geq 0,16 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante tratamento de hemodiálise no Centro de Diálise Renal ($0,32 \mu\text{g}$ de $\text{MCY}\cdot\text{L}^{-1}$ no filtro de carvão ativado) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ) (SOARES *et al.*, 2006).

Florações de cianofíceas são cada mais frequentes nos recursos hídricos do Espírito Santo, conforme observado nas lagoas em processo de eutrofização artificial de Linhares – lagoas Juparanã e do Meio (LÁZARO, 2008), e da Serra (Jacuném e Maringá) (visita *in locu*); além de corpos d'água artificiais, como tanques de pescado e de finalidade recreativa/paisagística. Cavati e cooperadores (2009) alertam sobre a potencialidade para floração de cianobactérias na lagoa Mãe-Bá (Guarapari).

Martins (2010) avaliou a produção de MCY-LR nas lagoas Jacuném, Juara, Pedra da Cebola, uma lagoa de estabilização de ETE e o reservatório Duas Bocas. Dentre estes, a lagoa Jacuném destacou-se em termos de trofia (hipereutrófico) e produção desta hepatotoxina acima dos limites da legislação brasileira ($4,78 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Martins e coautores (2010) e LÁZARO e colaboradores (2010) ressaltam a importância de contínuo monitoramento na lagoa, tendo em vista o uso recreacional e a produção de microcistina e sugerem também a análise das toxinas produzidas pelo gênero *Cylindrospermopsis*, que dominou nas análises quali-quantitativas das amostras.

Sendo assim, pesquisas em rios, córregos e lagoas estão sendo gradativamente realizadas pela comunidade acadêmica ou consultores ambientais nas últimas décadas; contudo, há muitos mananciais desconhecidos, em especial na região norte do Espírito Santo. Além disso, estudos relacionados à quali-quantificação de cianotoxinas e isolamento e cultivo de espécimes são incipientes.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) deliberou o valor máximo permitido/tolerável (VMP) para ingestão diária de microcistinas para a população humana, que é de $0,04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por peso corpóreo por dia (CHORUS; BARTRAM, 1999). Sampaio (2008), pesquisando na laguna de Jacarepaguá (RJ), registrou ingestão diária de microcistina de até $0,20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo $\cdot\text{dia}^{-1}$ valor este, cinco vezes superior ao VMP recomendado pela OMS, considerando o consumo diário de 300 gramas de peixe para uma pessoa de 60 kg. No Espírito Santo não há relato de dados dessa natureza pela comunidade acadêmica.

Gomes e colaboradores (2009) detectou microcistinas no tecido muscular do pescado, que é comercializado pela colônia Mestre Pedro, localizada na margem da laguna de Jacarepaguá (RJ), cujas florações de cianobactérias e mudanças na qualidade da água são consequências da ocupação urbana e industrial desordenada no Complexo Lagunar de Jacarepaguá. Ademais, publicações do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ) tem alertado que as constantes proliferações tóxicas estão afetando o potencial de abastecimento público de reservatórios e pesqueiro das lagunas, além do aumento do risco de intoxicação humana, tendo em vista que a toxina aloja-se nas vísceras, músculos e ovos (MAGALHÃES; SOARES; AZEVEDO, 2001; GOMES *et al.*, 2009; SOARES, 2009).

3.4 MICROCYSTIS AERUGINOSA E MICROCISTINAS

Microcystis aeruginosa Kützing 1846 é uma das mais perigosas cianobactérias formadoras de florações e tem sido encontrada em todos os continentes (JIANG *et al.*, 2008). Esta espécie é uma das mais estudadas e conhecidas. De acordo com Sant'Anna e colaboradores (2008), as florações tóxicas desta espécie tem uma distribuição ampla nas áreas tropicais e subtropicais do Brasil.

M. aeruginosa pertence à Família Microcystaceae dentro da Ordem Chroococcales e é composta por colônias flutuantes, esféricas a irregulares, com grande variabilidade morfológica, envolvidas por fina camada de mucilagem incolor. A colônia desta espécie apresenta numerosas células esféricas, com diâmetro celular variando de 4 a $6,2 \mu\text{m}$, que estão aglomeradas de forma irregular (KOMÁREK; KAMÁRKOVÁ, 2002; SANT'ANNA *et al.*, 2008; SILVA; HUSZAR; ROLAND, 2009).

Além disso, estas células possuem aerótopos que controlam a flutuabilidade, permitindo melhor posicionamento na captação de luz (KOMÁREK; KAMÁRKOVÁ, 2002; SANT'ANNA *et al.*, 2008; SILVA; HUSZAR; ROLAND, 2009). A divisão celular ocorre em três planos perpendiculares (KOMÁREK, 2003).

Essa espécie, com habitat cosmopolita, é citada frequentemente na literatura especializada em Ficologia e Saneamento Ambiental, uma vez que suas florações e cianotoxinas provocam impactos aos corpos de água e, em muitos casos, comprometem os usos e qualidade desses ecossistemas, além de prejuízos sócioeconômico e ambiental, tendo em vista que a persistência de microcistina residual é intacta em água submetida ao tratamento convencional de potabilidade.

Muitas linhagens de *M. aeruginosa* são produtoras de hepatotoxinas, em particular as microcistinas, cujos efeitos tóxicos representam risco à saúde humana. As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos, solúveis, hidrofílicos, e potentes inibidores das proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina dos hepatócitos, dentre estas: PP1, PP2A, PP4 e PP5 e também PP2B quando expostas as altas concentrações de microcistinas (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; JIANG *et al.*, 2008; MOLICA; AZEVEDO, 2009; SOARES, 2009).

Deve-se ressaltar que os genes não ribossômicos estão envolvidos na síntese de microcistina em cepas tóxicas, uma vez que os peptídeos não ribossômicos inibem a ação das proteínas fosfatases (BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003).

A razão superfície/volume de *Microcystis aeruginosa* afeta a atenuação de luz, a taxa de crescimento de outros microrganismos e a assimilação de nutrientes. Além disso, esta espécie é abundante em altas temperaturas (DAVIS *et al.*, 2009), crescendo bem na faixa entre 15 e 30°C (CHORUS; BARTRAM, 1999); requer irradiação luminosa ora muito reduzida ou muito elevada, com ótimo de crescimento até 80 $\mu\text{mol fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (IMAI *et al.*, 2009), e taxa de duplicação e produção de microcistina igual ou acima de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (JACINAVICIUS, 2010); e tem grande capacidade de absorver fósforo inorgânico, podendo estocá-lo em estruturas especiais; bem como possui a tendência de formar florações em águas paradas (JUNQUEIRA-MELGAÇO, 2007).

No entanto, Imai e colaboradores (2009) ressaltam que baixas intensidades luminosas (menores que $26 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) podem estimular a produção de microcistina (caso da MCY-RR), assim como a interação da luz e de níveis de ferro, que também estimula o crescimento de *M. aeruginosa* (JIANG *et al.*, 2008).

O ferro é importante na assimilação de nitrogênio e na produção de clorofila-a (JIANG *et al.*, 2008). Na pesquisa de Marsalek e colaboradores (2012), nanopartículas de ferro molecular (valência zero) foram utilizadas na destruição celular e impedimento da formação de florações de cianobactérias ao remover fósforo biodisponível; bem como atua na imobilização de microcistinas, evitando sua liberação para o meio aquático.

As microcistinas foram descritas pela primeira vez no início da década de 1980 e desde então são amplamente estudadas (SOARES, 2009). A produção destes heptapeptídeos não se restringe exclusivamente a *Microcystis aeruginosa*, uma vez que linhagens tóxicas já foram registradas em outros gêneros. Além disso, estas toxinas causam sérios danos ao fígado de animais vertebrados, uma vez que os hepatócitos são capazes de captá-las através dos transportadores iônicos presente nos canais biliares e no intestino delgado (AZEVEDO, 1998; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SOARES, 2009).

Os impactos sobre o fígado são irreversíveis, caso não ocorra necrose deste órgão e óbito por hemorragia, o indivíduo apresentará disfunção hepática. A letalidade da toxina é atribuída ao choque hipovolêmico, que resulta do sequestro de sangue pelo fígado. Ainda, o atrofiamento do citoesqueleto deste órgão deve-se à ação inibitória que as microcistinas e nodularinas exercem nas fosfatases, que são enzimas que regulam a síntese de proteínas, essenciais à sua manutenção (CARMICHAEL, 1992, 1994; CHORUS; BARTRAM, 1999; KAMOGAE; HIROOKA, 2000; YUAN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SILVA-STENICO *et al.*, 2009; SOARES, 2009).

Esses mecanismos de interferência com as fosfatases que tornam as hepatotoxinas promotoras de tumores conforme publicações científicas, que obtiveram vários resultados associando a microcistina ao estabelecimento da capacidade hepatocarcinogênica (KAMOGAE; HIROOKA, 2000).

De acordo com Soares (2009), as microcistinas são caracterizadas pela presença de 5 *D*-aminoácidos (identificados por letras) e 2 *L*-aminoácidos (posições 2 e 4 da estrutura cíclica), sendo sua estrutura geral descrita como ciclo-(*D*-alanina¹-*X*²-*D*-MeAsp³-*Y*⁴-Adda⁵-*D*-glutamato⁶-*Mdha*⁷), onde: onde **X** e **Z** são os dois *L* aminoácidos variáveis; *D*-MeAsp³ é *D*-eritro-β-ácido metilaspártico; Adda⁵ é (2*S*, 3*S*, 8*S*, 9*S*)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico; e *Mdha*⁷ é *N*- metildehidroalanina (Figura 3.1).

A variabilidade dos *L*-aminoácidos é uma das principais razões da existência de mais de 80 congêneres de microcistinas (SOARES, 2009) como microcistina-LR (leucina-arginina), microcistina-RR (arginina-arginina), microcistina-LA (leucina-alanina), dentre outras (Figura 3.1). As microcistinas RR (MCY-RR) e LR (MCY-LR) são as mais comumente encontradas nas águas dulcícolas, sendo que a MCY-LR é a mais tóxica (PINHO *et al.*, 2003).

Chorus e Bartram (1999) relatam que o grupo *Adda*, comum a todas as microcistinas, é o responsável pela atividade biológica desta toxina. *Adda* parece desempenhar papel de destaque na hepatotoxicidade, já que a remoção ou saturação de *Adda* reduzem drasticamente a toxicidade de microcistina-LR (HARADA *et al.*, 1990a, 1990b). Ainda, resíduos de *Glu* da molécula de microcistina também são essenciais para a hepatotoxicidade (KAMOGAE; HIROOKA, 2000).

A ecofisiologia do gênero *Microcystis* ainda é pouco conhecida, assim como os mecanismos que determinam sua floração (IMAI *et al.*, 2009). De acordo com Jiang e colaboradores (2008), Davis *et al.* (2009) e Imai e coparticipantes (2009), o crescimento de *Microcystis aeruginosa* e a produção e quantidade de microcistina sintetizada são afetados por fatores ambientais (luz, temperatura, nitrogênio, fósforo, ferro, cobre, dentre outros) tanto em condições *in vitro* (cultivo contínuo e em batelada) quanto em águas naturais.

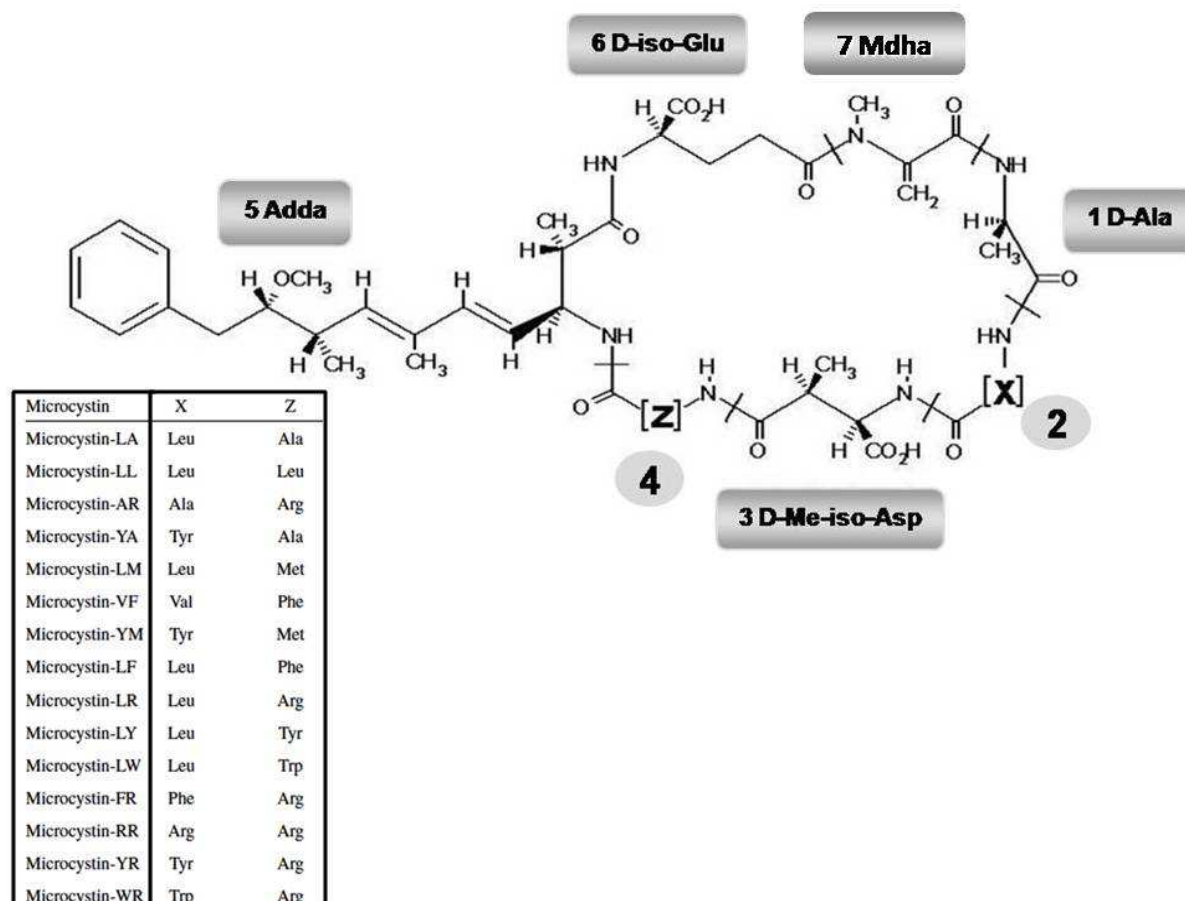


Figura 3.1 - Estrutura química da microcistina e exemplos da composição dos aminoácidos na formação das variantes de microcistinas. As letras X e Z são dois aminoácidos variáveis.

Fonte: Sivonen e Jones (1999) e Silva-Stenico *et al.* (2009) modificado.

As microcistinas são estáveis e resistentes a hidrólise química e oxidação em pH próximo da neutralidade; isto se deve a estrutura peptídica cíclica (CHORUS; BARTRAM, 1999); CALIJURI; ALVES; DO SANTOS, 2006). Também é válido lembrar que a fervura de uma água/cultura contendo microcistina não inativa sua toxicidade (HARADA *et al.*, 1996).

Ainda, estas toxinas podem persistir por meses ou anos em condições naturais, no período noturno. Cerca de 90% da concentração total das microcistinas foram degradadas a 40°C e extremos de pH (1 e 12), porém foram necessárias mais de 10 semanas (HARADA *et al.*, 1996). Por outro lado, a degradação fotoquímica de 90% desta concentração total pode variar de duas a seis semanas, dependendo da concentração de pigmentos fotossintéticos hidrossolúveis (ficobiliproteínas) e de toxinas.

A presença de substâncias húmicas também parece acelerar a degradação das microcistinas quando expostas à luz solar. Sivonen e Jones (1999) e Rapala e coparticipantes (1994) ressaltam que a degradação total de microcistinas pode variar de dois dias a mais de três semanas dependendo do corpo d'água, condições climáticas, variáveis ambientais e até do histórico de florações do ambiente.

Embora as microcistinas sejam resistentes a muitas peptidases de eucariontes e bactérias, elas são vulneráveis à degradação por algumas bactérias de rios e reservatórios. Bactérias isoladas de vários corpos d'água e de efluentes líquidos atingiram eficiência de 90% de degradação de microcistinas (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Os esterilizadores que irradiam radiações ultravioleta, ou filtros UV, apresentam em seu núcleo uma lâmpada ultravioleta do tipo C (UV-C), que atua na eliminação de células de cianobactérias através da destruição do DNA. Cada microrganismo apresenta diferentes níveis de resistência à radiação ultravioleta e a quantidade de radiação é dada pela potência dada na exposição e o tempo a que o organismo fica exposto. O nível de radiação necessária, em μWatts (microwatts) de $\text{UV-C}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, utilizada nos processos de esterilizações divergem entre os microrganismos, para controlar cianobactérias, demais algas (fitoplanctônicas e perifíticas) (*Chlorella vulgaris* – $2,2 \times 10^4 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), vírus (*Influenza* sp. – $2,6 \times 10^4 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e bactérias (*Streptococcus hemolyticus* - $10^4 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pelo uso do filtro UV ou reator de ultravioleta (TAO *et al.*, 2010; SNatural, 2012).

As vantagens do uso da radiação UV são: a elevada eficiência na eliminação de microrganismos em tempo de contato reduzido; não forma subprodutos; e não provoca odor e sabor na água. Por outro lado, as desvantagens são: custos elevados e técnicas de aplicação mais sofisticada; o UV não apresenta poder residual; e redução significativa da eficiência com o aumento da cor e/ou turbidez da água (SNATURAL, 2012).

Tao e coautores (2010) estudaram os efeitos da irradiação UV-C no crescimento de *M. aeruginosa* e na integridade das células com a finalidade de desenvolver um método potencial para impedir florescimentos de cianobactérias. Os autores constataram que a sensibilidade de *M. aeruginosa* à UV-C foi significativamente mais elevada do que aquela observada na clorófitica do gênero *Chlorella*, sugerindo um potencial de aplicação desta irradiação no controle das florações.

3.5 LEGISLAÇÃO, PADRÕES E LIMITES DE CIANOTOXINAS

Poucas referências propõem valores limites para cianobactérias e cianotoxinas. A Organização Mundial da Saúde (OMS), através do “*Guidelines for drinking-water quality*” (OMS, 2011), concluiu que não havia dados suficientes para a definição de valores para qualquer outra cianotoxina além da microcistina-LR. Então, a OMS recomendou o limite máximo de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para microcistina-LR total (extracelular e intracelular), considerando a exposição através da água de abastecimento (OMS, 2011). Em contrapartida, o guia “*Australian Drinking Water Guidelines*” (ADWG, 1996) propôs valor de referência menos restritivo de $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para microcistina-LR total.

Diante do episódio ocorrido em Caruaru (PE), as florações de cianobactérias tóxicas foram reconhecidas pelas autoridades brasileiras como um problema de saúde pública e estas cianobactérias foram incorporadas como parâmetro de monitoramento a partir da Portaria MS nº 1.469/2000, que foi revogada pela Portaria MS nº 518/2004.

Esta estabelece limites de densidade de cianobactérias na água bruta (ponto de captação) e de cianotoxinas (microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas) em águas tratadas (Tabelas 3.2 e 3.3); contudo, apenas a análise de microcistina é obrigatória, pois é a toxina mais reportada quanto à intoxicação de pessoas e animais (BRASIL – MS, 2004).

Os valores máximos permitidos (VMP's) pela legislação brasileira consideram apenas os efeitos agudos da microcistina em água potável e alimentos, não contemplando os efeitos crônicos ou carcinogênicos (BRASIL – MS, 2005).

Tabela 3.2 – Resumo das normativas da Portaria MS nº 518/2004 quanto ao monitoramento de cianobactérias e análise de cianotoxinas

Parâmetro	Local	Condição	Frequência / Número de amostras	Artigo na Portaria 518/2004
Ensaio toxicológico com camundongos	Água do manancial (ponto de captação)	Densidade > 20.000 cél•mL ⁻¹ ou biovolume > 2 mm ³ •L ⁻¹	Semanal, uma amostra por ponto de captação	Artigo 18, § 5
Contagem de cianobactérias	Ponto de captação (água bruta)	Densidade acima de 10.000 cél•mL ⁻¹ ou 1 mm ³ •L ⁻¹ de biovolume	Semanal, uma amostra por ponto de	Artigo 19, § 1
		Densidade até 10.000 cél•mL ⁻¹ ou 1 mm ³ •L ⁻¹ de biovolume	Mensal, uma amostra por ponto de	Artigo 19, § 1
Análise de cianotoxinas	Na saída do tratamento, na entrada (hidrômetro) de clínicas de hemodiálise e indústrias injetáveis	Densidade > 20.000 cél•mL ⁻¹ ou biovolume > 2 mm ³ •L ⁻¹	Mensal, uma amostra por unidade de tratamento	Tabelas 6 e 7; e Artigo 18, § 5

Fonte: Brasil – MS (2004) e Cybis *et al.* (2006).

Em 2009, o Ministério da Saúde iniciou a revisão da Portaria nº 518/2004, pretendendo atender o Artigo 4º, que determina a revisão da Norma no prazo de cinco anos ou a qualquer tempo, mediante solicitação justificada. Sendo assim, a Portaria nº 2.914 do MS, que estabelece padrões para a potabilidade, foi publicada em 14 de dezembro de 2011, substituindo a 518/2004.

No que tange as mudanças relativas às cianobactérias e cianotoxinas incorporadas na Portaria MS nº 2.914/2011, a norma passa a considerar as contribuições da fração intracelular e extracelular na concentração da cianotoxina; o somatório das concentrações de todas as variantes de microcistina no VMP (1,0 µg•L⁻¹); recomenda a análise de cilindrospermopsinas (VMP de 1,0 µg•L⁻¹) e anatoxina-a (s) quando houver presença de gêneros potencialmente tóxicos no monitoramento quali-quantitativo da água, além de análise de saxitoxinas (VMP de 3,0 µg equivalente de SXT•L⁻¹) (BRASIL – MS, 2011).

Ademais, a Portaria MS nº 2.914/2011 destaca no ANEXO XI, as mudanças relativas à frequência de monitoramento de cianobactérias em águas para consumo humano, que passa a ser mensal caso o número de cianobactérias seja menor ou igual a $10.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ e semanal, se for superior a 10.000 células de cianobactérias por mililitro (mL) de água. O ANEXO XII desta Portaria esboça que em mananciais superficiais, a análise de cianotoxina da saída do tratamento será semanal quando a densidade de cianobactérias exceder ou igualar a $20.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$. Além disso, a análise de cianotoxinas foi dispensada nos sistemas de distribuição (reservatórios e redes), conforme descrito neste mesmo ANEXO XII (BRASIL – MS, 2011).

A revisão da Portaria nº 518/2004 buscou contemplar os avanços técnico-científicos no que diz respeito aos padrões de potabilidade, tendo por base as normas internacionais, as recomendações dos Guias de Qualidade da Água para Consumo Humano da OMS, considerando a realidade brasileira, e os resultados de pesquisas contratados pelo Ministério da Saúde.

A Tabela 3.3 ilustra as principais diferenças entre as Portarias do Ministério da Saúde, 518/2004 e 2.914/2011, relativas à vigilância e controle de águas potáveis com cianotoxinas.

A Portaria MS nº 518/2004 salienta que é vedado o uso de algicidas no manancial, ou qualquer situação/intervenção de estresse às cianobactérias, que provoque lise celular quando a densidade for superior a $20.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ (BRASIL - MS, 2004). Além disso, expõe que bioensaios com camundongos não definem as variantes de cianotoxinas presentes nas florações (CYBIS *et al.*, 2006; PÁDUA, 2006).

Em contrapartida, a Portaria MS nº 2.914/2011 mantém a proibição do uso de algicidas ou qualquer intervenção/controle do crescimento de microalgas e cianobactérias; contudo, estabelece que em casos excepcionais as autoridades ambientais e de recursos hídricos regulamentarão sobre o uso desses produtos no corpo d'água.

A Resolução CONAMA nº 357/2005 estabelece a classificação (águas doces, salobras e salinas) e o enquadramento dos corpos de água, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes para controlar a poluição e a qualidade da água através de análises de variáveis físico-químicas e biológicas.

Esta legislação foi alterada pelas Resoluções CONAMA nºs 397/2008, 410/2009 e 430/2011. A CONAMA nº 430/2011 é também apresentada na seção II.5.B.1.4 - Recursos Hídricos e Zona Costeira (BRASIL – MMA, 2012).

Tabela 3.3 – VMP's⁽¹⁾ e tipos de análises das cianotoxinas em águas potáveis destinadas ao consumo humano segundo as Portarias do Ministério da Saúde nº 518/2004 e nº 2.914/2011

Parâmetro	Portaria MS nº 518/2004		Portaria MS nº 2.914/2011	
	Análise em água	VPM ⁽¹⁾	Análise em água	VPM ⁽¹⁾
Microcistina	Obrigatória Artigo 14, notas	1 µg•L ⁻¹	Obrigatória ANEXO VIII	1 µg•L ⁻¹ ⁽⁴⁾ Σ variantes
		Até 10 µg•L ⁻¹ até 3 amostras ⁽²⁾		
Saxitoxina (SXT)	Recomendação Artigo 14, § 1	3 µgSTX•L ⁻¹ ⁽³⁾	Obrigatória ANEXO VIII	3 µgSTX•L ⁻¹ ⁽³⁾
Cilindrospermopsina	Recomendação Artigo 14, § 1	15 µg•L ⁻¹	Gêneros Tóxicos	
Anatoxina-a (s)	Não é incluída na Portaria	—	Gêneros Tóxicos	

Fonte: Brasil – MS (2004); Cybis *et al.* (2006) e Brasil – MS (2011).

Notas:

- (1) Valor máximo permitido (VMP)
- (2) Até 10 µg•L⁻¹ em até 3 amostras, consecutivas ou não, nos últimos 12 meses.
- (3) 3 µg•L⁻¹ de equivalente de SXT
- (4) O valor representa o somatório (Σ) das concentrações de todas as variantes de microcistinas.

A Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL – MMA, 2005) designou para as águas doces (águas com salinidade igual ou inferior a 0,5‰), padrões para cinco classes: uma Especial e quatro classes (Tabela 3.4), abrangendo desde o abastecimento doméstico e preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas (caso da classe Especial) até a harmonia paisagística, navegação e usos menos nobres (caso da classe 4).

A lei em questão foi um marco na legislação ambiental para o monitoramento e controle das cianobactérias em águas doces, ao dispor variáveis biológicas de cianobactérias como um dos parâmetros para padrões de qualidade das águas dulcícolas. Para águas doces, essa Resolução instituiu VMP's para clorofila-a (biomassa fitoplanctônica), densidade numérica e biovolume celular de cianobactérias, segundo consta na Tabela 3.4.

Em contrapartida, na Resolução CONAMA nº 357/2005 não consta a exigência de monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em ambientes salobros e ainda inexistente previsão legal para aplicação de tais ações (SAMPAIO, 2008).

Tabela 3.4 – VMP dos padrões biológicos (clorofila-a, densidade e biovolume) para classes de água doce segundo CONAMA nº 357/2005 (alterada pelas Resoluções nº 410/2009 e 430/2011)

Parâmetro/Variável	Valor Máximo Permitido (VMP) – Água Doce			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe
Clorofila-a do fitoplâncton ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	≤ 10	≤ 30	≤ 60	—
Densidade de cianobactérias ($\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$)	≤ 20.000	≤ 50.000	≤ 100.000	—
Biovolume de cianobactérias ($\text{mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$)	$\leq 2 \text{ mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$	$\leq 5 \text{ mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$	$\leq 10 \text{ mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$	—
Densidade de cianobactérias para dessedimentação de animais	—	—	≤ 50.000 ou $\leq 5 \text{ mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$	—

Nota: VMP = Valor máximo permitido

Segundo a legislação vigente, o VMP é de 50.000 células de cianobactérias por mL para uso de recreação de contato primário (Resolução CONAMA nº 357/2005) e a ocorrência de florações de algas ou outros organismos, é um dos indicadores de condições impróprias para a balneabilidade, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana (Resolução CONAMA nº 274/2000) (BRASIL – MMA, 2012). Inexiste até o momento limites na legislação para o valor máximo de cianotoxinas em áreas de balneário, contudo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) orienta que sejam utilizados os valores máximos permitidos para água de consumo humano de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para microcistina e $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para saxitoxina.

3.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS: CLAE

No Brasil não existem técnicas padronizadas para a análise da maioria das cianotoxinas, tanto em culturas (simulação em laboratórios) quanto no ambiente aquático. Algumas metodologias de detecção e quantificação de cianotoxinas incluem oxidação da toxina para produzir ácido eritro-2-metil-3-metóxi-4-fenilbutírico (MMPB); bioensaios de toxicidade aguda em roedores; estudos moleculares; ensaio do imunoabsorvente ligado à enzima ou ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*); inibição de proteína fosfatase por microcistinas; **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)** ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC); e **Cromatografia Líquida–Espectrômetro de Massa (LC/MS)**. (YUAN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006). Além de uso de marcadores moleculares, cuja eficiência é decorrente a especificidade pelas sequências peptídicas (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

A escolha do método mais adequado dependerá do nível e da qualidade de informação que se deseja, dos equipamentos disponíveis, do custo da análise, de pessoas treinadas e do tempo necessário para a obtenção de resultados, para que em casos de risco em potencial, as decisões cabíveis sejam tomadas rapidamente. Entretanto, tais metodologias ainda são muito trabalhosas e onerosas (PÁDUA, 2006). O Quadro 3.1 detalha os usos, as vantagens e desvantagens de técnica de detecção de cianotoxinas.

Os *kits* ELISA e a CLAE são as técnicas empregadas na detecção de microcistinas e nodularinas (SIVONEN; JONES, 1999) em amostras sem qualquer tipo de impurezas, principalmente no uso do HPLC. A grande difusão da determinação de microcistina deve-se à maior ocorrência (ou registros) de florescimentos com esta toxina (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999) nos diversos ecossistemas aquáticos.

Técnicas	Uso	Vantagens	Desvantagens
Bioensaios com ratos ou camundongos	-Primeiros testes de toxicidade usados para detecção e identificação de cianotoxinas	-Método de simples avaliação no laboratório e de baixo custo	-Resultado obtido é uma inferência não específica, não sendo capaz de detectar a produção em baixos níveis. Utilização de animais em testes toxicológicos.
Ensaio imunológico (ELISA)	-Teste imunológico que envolve uma enzima, um anticorpo e um antígeno.	-Rápida detecção devido a sua sensibilidade, especificidade e fácil operação	-Apresenta resultados falsos positivos.
HPLC	-Separação de substâncias orgânicas	-Um dos primeiros métodos aplicados para PSPs	- Necessidade de padrões puros e quantificados para todas as toxinas; falta de um cromóforo necessário nos métodos derivatização pós coluna para produzir produtos fluorescentes; possibilidade de conversões químicas da toxina durante preparação da amostra
LC-MS	-Identificação de substâncias desconhecidas, quantificação e elucidação de propriedades química e estrutural de novas moléculas	-Maior sensibilidade, seletividade e precisão na quantificação	- Técnica de custo elevado Requer profissional habilitado com conhecimento detalhado para operar e manter o equipamento
Q-TOF	-Detecção e identificação de cianotoxinas	-Alta sensibilidade, versatilidade e resolução	-Média sensibilidade no "full scan".
PCR	-Amplificação de genes envolvidos com a síntese de produção de toxinas	-Detecção, especificidade e sensibilidade	-Requer infraestrutura e equipamento especializado

Quadro 3.1 – Metodologias de detecção de cianotoxinas: usos, vantagens e desvantagens.

Fonte: Humpage, Magalhães e Froscio (2010).

Há testes ELISA para análise qualitativa (leitura visual) e quantitativa de microcistina total (leitura de microplacas por absorvância em espectrofotômetro), sem determinação das variantes de microcistina, cuja detecção atinge até $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. No ELISA, o anticorpo contra MCY-LR, imobilizado na placa de reação enzimática, liga-se à microcistina e produz coloração na presença de substrato cromático (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006). O limite de detecção (LD) nesta técnica sugerido por Chorus e Bartram (1999) é de 16 ppb (ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A CLAE ou HPLC utiliza colunas contendo gel de sílica-octadecilsilano (C18), com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob velocidades diferentes e altas pressões.

Este método analítico realiza análises quali e quantitativas, purificação e separação de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Esta fase móvel contendo metanol e/ou acetonitrila determina as variantes de microcistina (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Devido à grande variedade de detectores de HPLC desenvolvido pelo fabricante (visível, ultravioleta, fluorescência, condutividade, índice de refração, contador de radioatividade, quimioluminescência, e massa), é possível detectar qualquer substância, mesmo aquelas que são opacas, no espectro visível e ultravioleta.

O HPLC que detecta por cromatografia ultravioleta é uma técnica barata e a mais comum na identificação de nodularinas e das variantes de microcistinas (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006). Em contrapartida, a detecção limita-se a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de microcistina em água (HARADA *et al.*, 1999). Já CLAE associado ao detector por fotodiodo (PDA), provavelmente, é o melhor método empregado na determinação de microcistinas em conformidade com o valor limite proposto pela legislação (NICHOLSON; BURCH, 2001), podendo ser ajustado no intervalo desejado. O PDA registra a resposta ultravioleta dos diferentes analitos⁵ na forma de espectro (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Para microcistinas, pode-se utilizar faixa espectral entre 190 e 300 nm, sendo a absorvância máxima da maioria destas toxinas no comprimento de onda de 238 nm (devido ao resíduo ADDA) ou 222 nm, no caso de variantes com triptofano (LAWTON; EDWARDS; CODD, 1994; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SANCHES *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2008).

A técnica CLAE/PDA combina identificação do espectro de absorção máximo e o tempo de retenção ou detenção da microcistina, ou seja, o tempo decorrido desde a injeção do analito até a obtenção do pico máximo (LAWTON; EDWARDS; CODD, 1994; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; SANCHES *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2008). Vale salientar que a área do pico cromatográfico é proporcional à concentração da toxina analisada (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

⁵ Solução da qual se conhece o nome da cianotoxina, porém se desconhece a concentração.

3.7 IMPACTOS E TECNOLOGIAS PARA REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

As metodologias de controle físico, químico e biológico do crescimento das populações de cianobactérias e de suas toxinas têm sido pesquisadas para melhorar a qualidade da água dos reservatórios, lagoas e lagos atingidos pelas florações, principalmente os mananciais destinados ao abastecimento doméstico (CHORUS; BARTRAM, 1999). A escassez e a menor disponibilidade de água, tanto em qualidade como quantidade, tem estimulado o desenvolvimento de novas tecnologias e adequação de processos já existentes de remoção de cianobactérias e cianotoxinas.

O impacto provocado pelas florações de cianofíceas torna dispendiosos os custos operacionais no tratamento de água destinada ao abastecimento humano e na resolução de problemas operacionais das estações de tratamento de água (ETA's), tendo em vista que esta água deve atender aos requisitos de qualidade e potabilidade preconizados pela legislação brasileira vigente.

Tais problemas seriam obstrução dos filtros, que requer maior tempo e frequência na lavagem; uso de carvão ativado para a remoção de odor e gosto; ações que promovam a remoção das microalgas e da cor; remoção ineficiente das florações quando flutam nos decantadores; maior demanda de produtos químicos; produção de trihalometanos (THM's) após pré-cloração agindo na matéria orgânica existente; liberação e persistência de cianotoxinas na água tratada, limitando a possibilidade e a qualidade dos usos (BRASIL - FUNASA, 2003; CYBIS *et al.*, 2006). A OMS (OMS, 2011) salienta que a ingestão de água é a principal rota de intoxicação do homem pelas cianotoxinas.

Contudo, as células viáveis/sadias de cianobactérias produtoras de toxina e demais comunidades do fitoplâncton são eliminadas do tratamento de água convencional, garantindo segurança e eficiência esperada (CYBIS *et al.*, 2006).

Entretanto, caso ocorra rompimento da membrana celular (*lise*), a toxina intracelular contida na espécie produtora de toxina dissolve-se no meio aquoso e obriga a empresa de saneamento a empregar técnicas mais avançadas de remoção de cianotoxinas como oxidação (cloro, ozônio, permanganato de potássio, dentre outros), depois de retirada de células viáveis, e adsorção por carvão ativado (CYBIS *et al.*, 2006).

As cianotoxinas intracelulares permanecem no interior da célula até atingir a fase de senescência ou morte, ou então, caso ocorra ruptura da célula (FALCONER, 1999; FERREIRA *et al.*, 2004). Esta *lise* pode ocorrer naturalmente, pela ação de produtos químicos ou por ação mecânica (turbulência e bombeamento) (CYBIS *et al.*, 2006).

O tratamento da água por carvão ativado permite a retirada da toxina presente na água segundo várias pesquisas brasileiras e internacionais, que tem demonstrado que o carvão ativado é eficiente na remoção de microcistinas e saxitoxinas (PÁDUA, 2006), até mesmo a remoção total de cianotoxinas, quando empregado isoladamente ou de forma complementar ao tratamento convencional. Contudo, as concentrações de carvão necessárias para reter as toxinas na água de hemodiálise ainda não são conhecidas, bem como existem poucos estudos do uso do carvão ativado com outros tipos de cianotoxinas. É importante lembrar que a pós-ozonização pode acarretar a completa destruição destes compostos (BRASIL – FUNASA, 2003).

Deve-se salientar que o processo de tratamento convencional com sulfato de alumínio (cloração, coagulação, floculação e sedimentação), adotado na maioria das ETA's e mais difundido no mundo, ainda é ineficiente na remoção de cianotoxina extracelular ou dissolvida, apesar da existência de inúmeras pesquisas *in locu* (MÜLLER, 2008) e em escala experimental.

No caso de aplicação do sulfato de cobre em *Microcystis aeruginosa*, García-Villada e colaboradores (2004) constataram a formação de cianobactérias mutantes, capazes de resistir às doses letais deste algicida e de duplicar-se com a nova característica adquirida no seu material genético.

Teixeira e Rosa (2006) argumentaram em sua pesquisa que o processo de flotação por ar dissolvido é uma das etapas mais eficientes na remoção de células intactas de cianobactérias, desempenho superior ao processo de sedimentação. Brandão *et al.* (2009) relataram a partir da análise de várias publicações que o desempenho é superior ao processo de sedimentação, eficiência esta que variou entre 92 e 99,9%.

A biodegradação por bactérias é uma alternativa de tratamento da água em termos de remoção de toxinas de cianobactérias (GOMES *et al.*, 2009), caso da bactéria LH21 (provável gênero *Sphingopyxis* sp.), que degrada microcistina-LR (BRANDÃO *et al.*, 2009).

A biomanipulação, juntamente com medidas de saneamento da bacia de drenagem, apresenta-se como uma alternativa a ser analisada no controle das florações de cianobactérias e demais integrantes do fitoplâncton em ambientes eutrofizados (PANOSSO *et al.*, 2007).

Além disso, carvão ativado, ozônio e cloro (pouco eficiente para saxitoxinas) e aquecimento são recomendados para retirar anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina da água; enquanto que filtração e os métodos citados anteriormente são sugeridos na remoção de cilindrospermopsina e microcistina (BRASIL - FUNASA, 2003). Vale ressaltar que o custo da utilização da ozonização no sistema de tratamento de águas das ETA's ainda é muito alto para os padrões brasileiros.

Cita-se ainda a oxidação química na água, que inativará as toxinas. Entretanto pode ocorrer o aparecimento de outros análogos estruturais mais potentes (SAMPAIO; CARNEIRO; PINTO, 2011). A microfiltração também é eficaz na remoção das toxinas; contudo é um método oneroso e o material retido é muito tóxico (BRASIL - FUNASA, 2003).

Estudos recentes (JANČULA; MARŠÁLKOVÁ; MARŠÁLEK, 2011) indicaram que floculantes orgânicos (poliacrilamidas catiônicas) são capazes de remover mais de 80% da biomassa do fitoplâncton, indicando, deste modo, a possibilidade de remoção das florações de algas e de cianobactérias. Poliacrilamidas catiônicas são biodegradáveis e a toxicidade é baixa para os organismos aquáticos.

Ademais, o tratamento com nanopartículas de ferro zero valente ou elementar (NPF ou nZVI) é um método eficaz e ambientalmente benigno que tem sido aplicado no tratamento de água visando a destruição celular e impedimento da formação de florações de cianobactérias pela remoção de fósforo biodisponível, além de imobilização da microcistina, prevenindo sua liberação no meio aquático. Estas partículas são atóxicas e agregam-se ao $\text{Fe}(\text{OH})_3$, promovendo a floculação e sedimentação gradual da biomassa de cianobactérias (MARSALEK *et al.*, 2012).

Segundo Jančula e coautores (2010), fitalocianinas degradaram 61,5% de MCY-LR em 48 horas (38% foi degradada após 24h, e 24% após 12h de incubação) Embora outros oxidantes, como peróxido de hidrogênio ou ozônio sejam capazes de degradar microcistinas dentro de várias horas.

Ainda, Jančula e demais pesquisadores (2010) acreditam que a degradação por fitalocianinas pode ser mais eficaz no futuro próximo, caso proceda-se otimização do espectro emitido pela luz e alterando-se as características de absorção de fitalocianinas.

A implantação de cortinas de ar e barreiras físicas de contenção das florações e redução da concentração celular na água afluente ao tratamento, além de técnicas de captação de água mais eficientes auxiliam na redução da entrada de cianobactérias e outros organismos nas ETA's e dos custos no tratamento. Além disso, a tomada de água deverá considerar o perfil vertical da densidade das espécies desta Classe, a ecologia e a topografia local, bem como estudo de modelo preditivo de ocorrência de proliferações nos mananciais (BEVILACQUA; AZEVEDO; CERQUEIRA, 2009).

Ainda, técnicas genéticas têm sido utilizadas para explorar a base genética, a biossíntese e a regulação fisiológica de produção de microcistina. Os processos de perda de genes resultaram em uma distribuição desigual de genes *cluster* de microcistina sintetase, seja em gêneros como em espécies, além da distribuição e abundância destes genes no ambiente KURMAYER; CHRISTIANSEN, 2009).

Nos últimos anos, a experiência na detecção de genes de microcistinas diretamente em campo aumentou enormemente a quantidade de protocolos para a extração de DNA e de detecção subsequente de genes por PCR (*polymerase chain reaction*). Ademais, a elevada sensibilidade da PCR permite detectar genótipos tóxicos antes da ocorrência de uma floração de cianobactérias, juntamente com fatores ambientais que podem influenciar a abundância de genótipos produtores (Figura 3.2) (KURMAYER; CHRISTIANSEN, 2009).

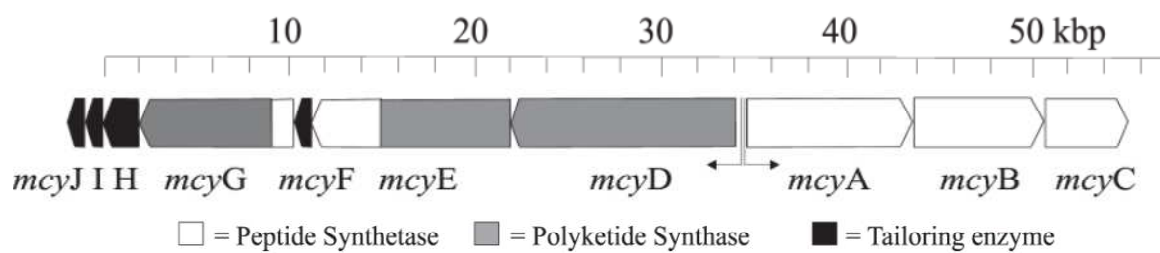


Figura 3.2 - Esquema da organização estrutural dos genes *clusters* das microcistinas (*mcy*) produzidas pelo gênero *Microcystis*. As setas indicam a direção de transcrição dos sítios promotores (bi)-direcionais. A escala indica o comprimento dos agrupamentos de genes em pares de bases (kpb).

Fonte: Kurmayer e Christiansen (2009) modificado.

4 METODOLOGIA

4.1 MANUTENÇÃO DAS VIDRARIAS E MATERIAIS

Os materiais e vidrarias utilizadas foram lavados com detergente neutro Extran (Merck), enxaguadas com água corrente; imersas em banho de solução sulfocrômica por até 24 horas. Após este período eram novamente enxaguadas exaustivamente com água corrente, seguida de enxágue por água destilada (5 vezes). O meio de cultivo e os materiais e vidrarias foram esterilizados em autoclave vertical (BioEng) a 121°C sob pressão de 1 atmosfera, por 20 minutos. Vale destacar que o meio ASM-1 estéril apenas era usado nos repiques após resfriamento até a temperatura ambiente.

Os frascos também foram tampados com papel alumínio e filme plástico, enquanto que os erlenmeyers exclusivos dos experimentos foram vedados com rolhas (tampões) de algodão e gaze, a fim de permitir as trocas gasosas e evitar contaminação.

4.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS ESTOQUES

A cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* Kützing (NPLJ-4) foi cedida de uma linhagem do banco de cultivo de cianobactérias do Laboratório de Controle de Qualidade de Água, da Universidade Federal de Viçosa (UFV, MG). A cepa NPLJ-4, produtora de microcistina, foi isolada da laguna Jacarepaguá (RJ), em 1996, pela equipe da professora Doutora Sandra Maria Feliciano de Oliveira Azevedo, do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, RJ).

As culturas estoque da linhagem tóxica da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* Kützing (NPLJ-4) foram mantidas em frascos Erlenmeyers de vidro borossilicato, em estufa incubadora climatizada (Modelo Nova Técnica – NT – 0708), sob agitação manual (sem aeração), com condições fotoautotróficas e de assepsia controladas, à temperatura de $25,4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, segundo monitoramento em termógrafo ambiental (modelo portátil, tipo panorâmico; temperatura: -15 a $+40^{\circ}\text{C}$, rotação de 24 horas em 7 dias, com gráfico cilíndrico, e precisão de $\pm 2\%$ do valor máximo de escala), fotoperíodo de 12 horas (luz:escuro) e a iluminação constante entre 50 e $73 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (média de $62,1 \pm 6,29 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes de 20 Watts (luz branca fria, marca Philips, TL-T RS, extra luz do dia, 1.100 lm, 5.000 K, diâmetro de 31,8 mm).

A espécie foi cultivada em meio de cultura ASM-1 (Tabela 4.1): líquido composto apenas por substâncias inorgânicas, com pH ajustado para $7,5 \pm 0,02$ antes da esterilização em autoclave. As soluções estoque utilizadas para preparar este meio foram conservadas em refrigerador $+4^{\circ}\text{C}$. Deve-se ressaltar que o meio ASM-1 é muito usado no cultivo de algas de ecossistemas dulcícolas (GORHAM *et al.*, 1964).

A manutenção da cepa foi realizada através de repicagens periódicas entre 12 e 20 dias, em câmara (ou capela) de fluxo laminar, a partir da proporção de 1:9, ou seja, uma parte de células saudáveis que atingiram a fase *log* (inóculo) e nove partes de novo meio ASM-1.

Além disso, o controle de contaminantes foi executado através de inspeção visual e análise microscópica das culturas estoque. Lembrando que a câmara de fluxo laminar era previamente desinfetada com hipoclorito de sódio (Vetec, diluição de 1:1), álcool 70% e exposição à ultravioleta por 30 minutos. Esta rotina de desinfecção foi aplicada aos materiais usados nas repicagens e amostragens.

Todavia, a linhagem obtida junto à UFV não era unialgal e, por isso, foi necessária reisolamento através da técnica de micropipetagem (capilaridade com uso de pipeta Pasteur estéril) e adição de cicloheximida ($\{3\text{-}[2\text{-}(3,5\text{-Dimetil-2-oxociclohexil})\text{-2-hidroxi-etil}]\text{glutarimide}\}$, C-7698, Sigma-Aldrich) em meio de cultura, frio e esterilizado, antes da inoculação de *M. aeruginosa*, de forma que fosse obtido concentração final de $75 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ou $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O cicloheximida ajudou a controlar e isentar a cultura de contaminantes eucariontes, no caso, uma clorófitca não identificada.

Tabela 4.1 – Composição das quatro soluções estoque do meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) e suas proporções para a preparação de um litro de meio de cultura, utilizado como substrato ao cultivo de *Microcystis aeruginosa*

SOLUÇÃO ESTOQUE "A"				
Componente	Massa Molar (g)	Concentração (M = mol•L ⁻¹)	Quantidade (g) em 200 mL	Quantidade (g) em 1 L
NaNO ₃	84,99 g	0,1 M	1,70 g	8,50 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	246,47 g	0,01 M	0,49 g	2,45 g
MgCl ₂ • 6H ₂ O	203,29 g	0,01 M	0,41 g	2,05 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	147,01 g	0,01 M	0,29 g	1,45 g
Completar o volume com água deionizada ou destilada	-	-	200 mL	1.000 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE "B"				
Componente	Massa Molar (g)	Concentração (M = mol•L ⁻¹)	Quantidade (g) em 100 mL	Quantidade (g) em 1 L
KH ₂ PO ₄	136,08 g	0,06 M	0,87 g	8,7 g
Na ₂ HPO ₄	141,958 g	0,05 M	0,7060 g	7,060 g
Completar o volume com água deionizada ou destilada	-	-	100 mL	1.000 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE "C"				
Componente	Massa Molar (g)	Concentração (M = mol•L ⁻¹)	Quantidade (g) em 100 mL	Quantidade (g) em 1 L
H ₃ BO ₃	61,831 g	0,4 M	2,48 g	24,8 g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	197,903 g	0,07 M	1,39 g	13,9 g
FeCl ₃ • 6H ₂ O	270,293 g	0,04 M	1,08 g	10,8 g
ZnCl ₂	136,296 g	0,025 M	0,335 g	3,35 g
CoCl ₂ • 6H ₂ O	237,928 g	0,0008 M	0,019 g	0,19 g
CuCl ₂ • 2H ₂ O	170,482 g	0,00008 M	0,0014 g	0,014g
Completar o volume com água deionizada ou destilada	-	-	100 mL	1.000 mL

... continuação

SOLUÇÃO ESTOQUE "D"				
Componente	Massa Molar (g)	Concentração (M = mol·L ⁻¹)	Quantidade (g) em 100 mL	Quantidade (g) em 1 L
EDTA • Na ₂	372,236 g	0,05 M	1,86 g	18,6 g
Completar o volume com água deionizada ou destilada	-	-	100 mL	1.000 mL

PROPORÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTOQUE PARA 1 LITRO DE MEIO ASM-1		
Solução Estoque	Volume (mL)	Proporção (%)
A	20 mL	2 %
B	2 mL	0,2 %
C	0,1 mL	0,01 %
D	0,4 mL	0,04 %

Após o preparo do meio ASM-1, pH foi ajustado para 7,5 ± 0,02.

4.3 EXPERIMENTOS DE ESTRESSE FISIOLÓGICO

4.3.1 Efeito de diferentes níveis de ferro sobre *Microcystis aeruginosa*

A influência do ferro no crescimento de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) foi avaliada através de testes utilizando concentrações de 0,5 µM, 1 µM, 4 µM (Controle – condições ótimas de crescimento) e 10 µM de ferro (FeCl₃•6H₂O), durante o período de 30 dias (Figura 4.1). Entretanto, a partir do 30º dia, realizaram-se amostragens no 35º dia para análise dos parâmetros de crescimento (densidade, biovolume e clorofila-a).

Para tanto, a solução "C" do meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) foi modificada a partir da alteração da concentração de cloreto férrico hexahidratado, lembrando que na composição normal tem-se 4 µM de FeCl₃ • 6H₂O. Em seguida, o meio de cultura foi preparado para cada nível de ferro e esterilizado em autoclave à 121°C durante 20 minutos. O pH final de ASM-1 estéril foi 7,6.

Posteriormente, o inóculo com concentração de $3,25 \times 10^5$ células de *Microcystis aeruginosa* por mililitro foi inserido em 800 mL de ASM-1 de cada erlenmeyer de vidro borossilicato de um litro, obtendo concentração inicial de 10^4 células•mL⁻¹ em cada frasco. Ademais, o experimento foi conduzido em triplicata, sem aeração e utilizando células da fase exponencial de crescimento.

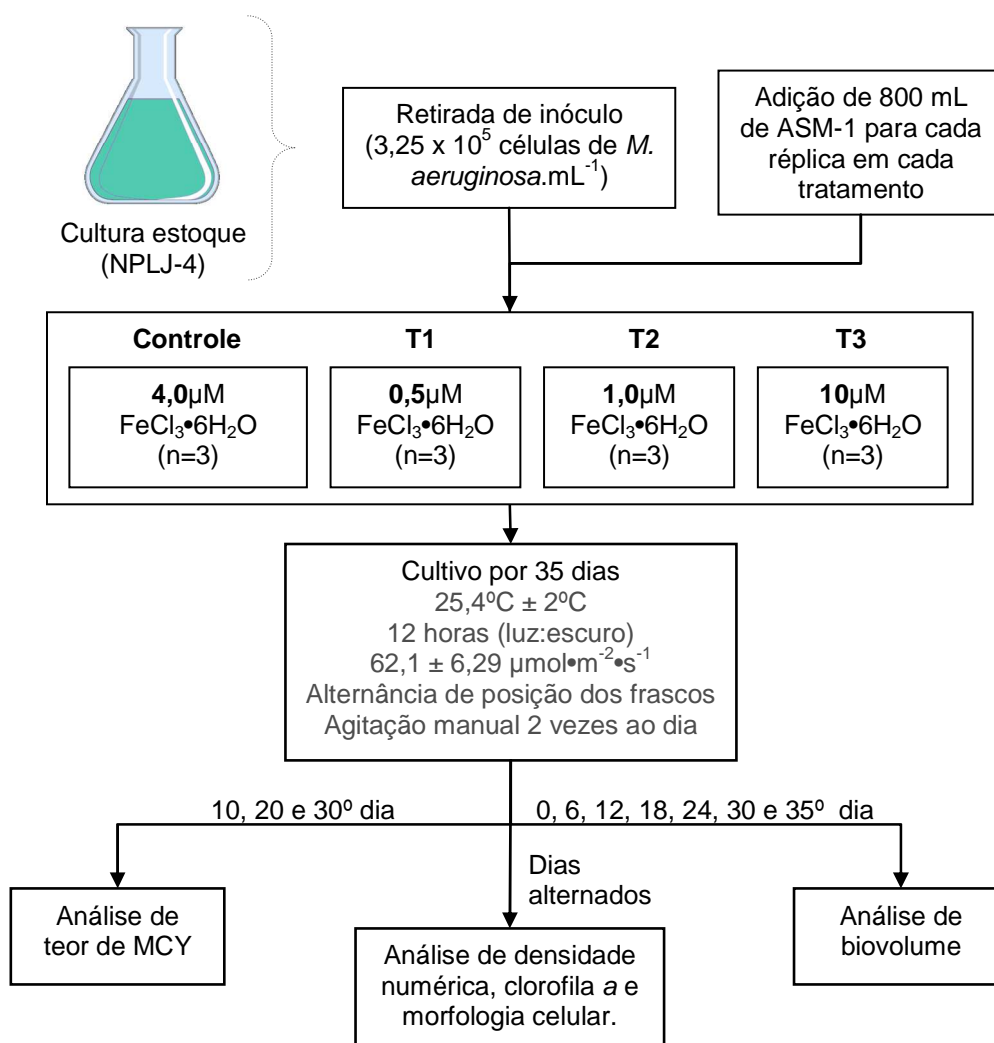


Figura 4.1 - Fluxograma do experimento de avaliação dos efeitos da exposição de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) à diferentes concentrações de ferro. O controle representa as condições ótimas de crescimento no meio de cultura ASM-1.

As culturas de *M. aeruginosa* cresceram em estufa incubadora climatizada (Modelo NT 0708), com fotoperíodo de 12 horas; à temperatura de $25,5^{\circ}\text{C} \pm 1,1^{\circ}\text{C}$; e intensidade luminosa constante entre 61 e $69 \mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (m\u00e9dia de $66 \pm 2,35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes de 20 Watts (luz branca fria). A luminosidade foi medida através de aparelho Field ScouTM Quantum Light Meters e a faixa de luz desejada foi obtida através do revestimento das lâmpadas com papel parafinado e sombrite (Figura 4.2). Estas a\u00e7\u00f5es tamb\u00e9m foram realizadas na montagem estrutural da estufa de manuten\u00e7\u00e3o da cepa de *M. aeruginosa*.

Durante o per\u00edodo experimental, cada frasco foi trocado de posi\u00e7\u00e3o nas prateleiras da estufa incubadora e as culturas foram homogeneizadas atrav\u00e9s de agita\u00e7\u00e3o manual, duas vezes ao dia (manh\u00e3 e tarde).

Al\u00e9m disso, a altera\u00e7\u00e3o da posi\u00e7\u00e3o das culturas e a agita\u00e7\u00e3o dos erlenmeyers foram realizadas a cada dois dias, sempre ap\u00f3s o t\u00e9rmino das amostragens (Figura 4.2), a fim de garantir as trocas gasosas entre o cultivo e o espa\u00e7o vazio no frasco (*headspace*), diminuir o efeito de diferen\u00e7as de intensidade luminosa e temperatura sobre as culturas, e propiciar adequada homogeneiza\u00e7\u00e3o da biomassa celular quanto \u00e0 a\u00e7\u00e3o da luz e temperatura.

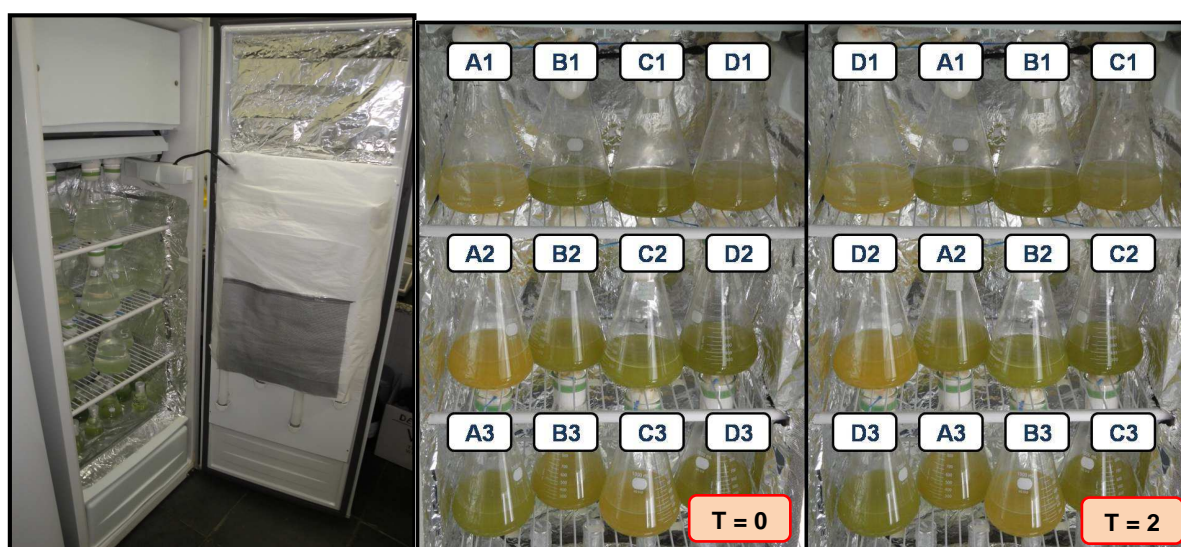


Figura 4.2 - Sombrite e papel parafinado utilizados para atenuar a luminosidade at\u00e9 a faixa de luz utilizada nos experimentos. Metodologia de rota\u00e7\u00e3o das culturas adotada durante o experimento e disposi\u00e7\u00e3o das r\u00e9plicas em cada prateleira.

4.3.2 Efeitos da exposição de *Microcystis aeruginosa* à radiação ultravioleta

As culturas de *M. aeruginosa* do 35º dia de crescimento tratadas com diferentes concentrações de cloreto férrico hexahidratado (0,5; 1,0; 4,0 e 10 µM) foram utilizadas para avaliar a influência da radiação ultravioleta (UV) com comprimento de onda entre 200 e 280 nm (UV-C), como fator interveniente no crescimento desta cianobactéria e na sua produção de microcistina (MCY) (Figura 4.3). Lembrando que cada experimento foi realizado separadamente.

Inicialmente foram realizadas na capela de fluxo laminar amostragens para análises das variáveis: densidade numérica, biovolume celular, concentração de clorofila-a e quantificação de microcistina das réplicas de cada cultura. Em seguida, um volume de 200 mL foi retirado de cada réplica de cada tratamento e do controle (4,0 µM), utilizando-se pipeta automática com volume máximo de 10 mL (Socorex) e provetas⁶ de vidro estéreis, para se obter volume final de 600 mL, que foram adicionados em seus respectivos refratários de vidro (Tabela 4.3), resultando numa altura de 2,5 cm de cultura em cada recipiente. A concentração do inóculo adicionado a cada refratário foi de 10^7 células•mL⁻¹ (Figura 4.4A e 4.4B) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Concentrações do inóculo (densidades médias de cada tratamento e do controle, n=3) utilizadas no experimento de exposição à radiação UV-C e as concentrações iniciais obtidas no volume final de 600 mL

Experimento	Cloreto Férrico Hexahidratado			
	0,5 µM	1,0 µM	4,0 µM	10,0 µM
Concentração	0,5 µM	1,0 µM	4,0 µM	10,0 µM
Inóculo	$1,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
T = 0 (C _{inicial})	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

⁶ Para cada frasco foram reservados materiais e vidrarias estéreis exclusivas.

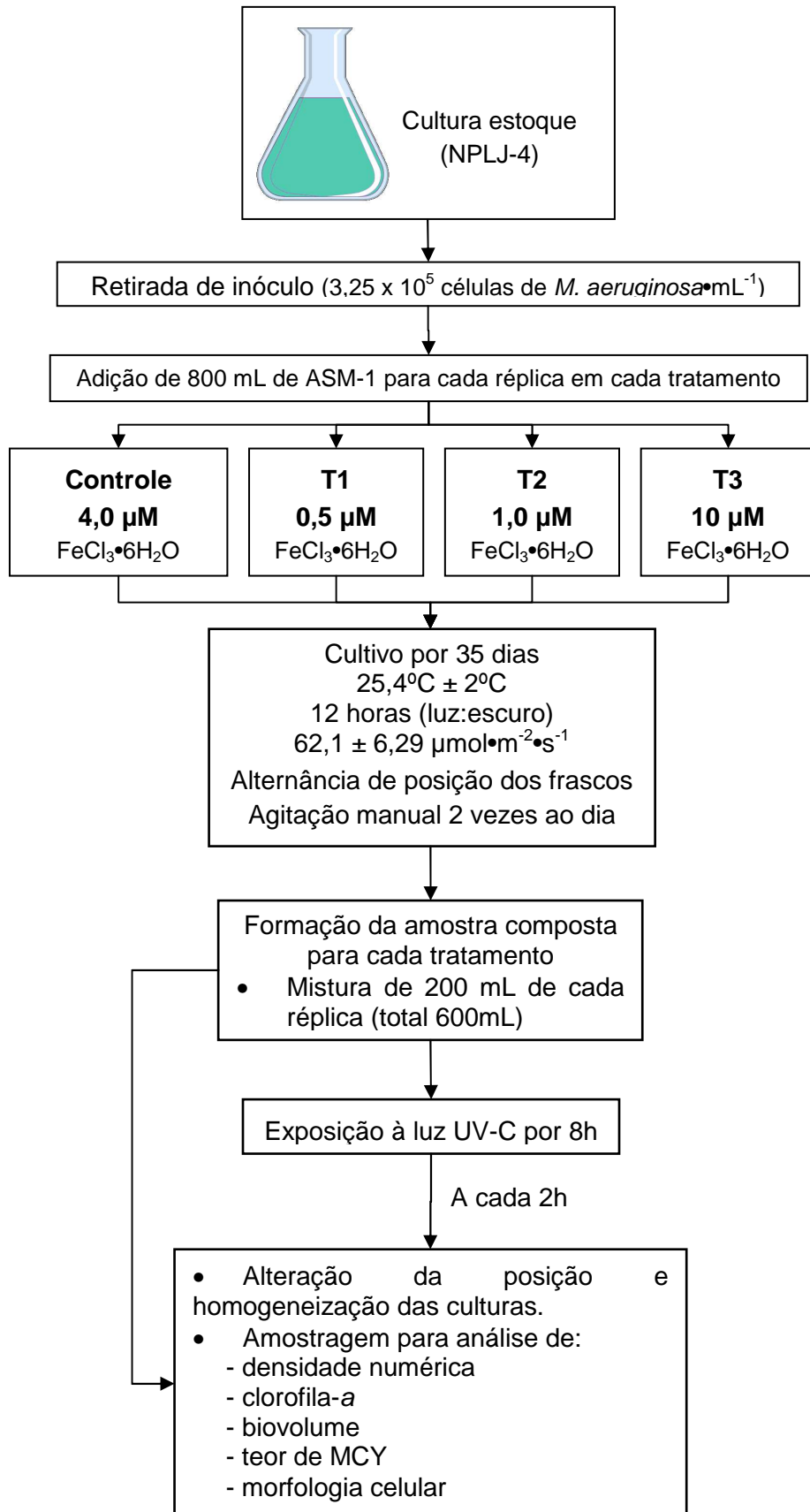


Figura 4.3 - Fluxograma do experimento de avaliação dos efeitos da exposição de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) à radiação ultravioleta C (UV-C).

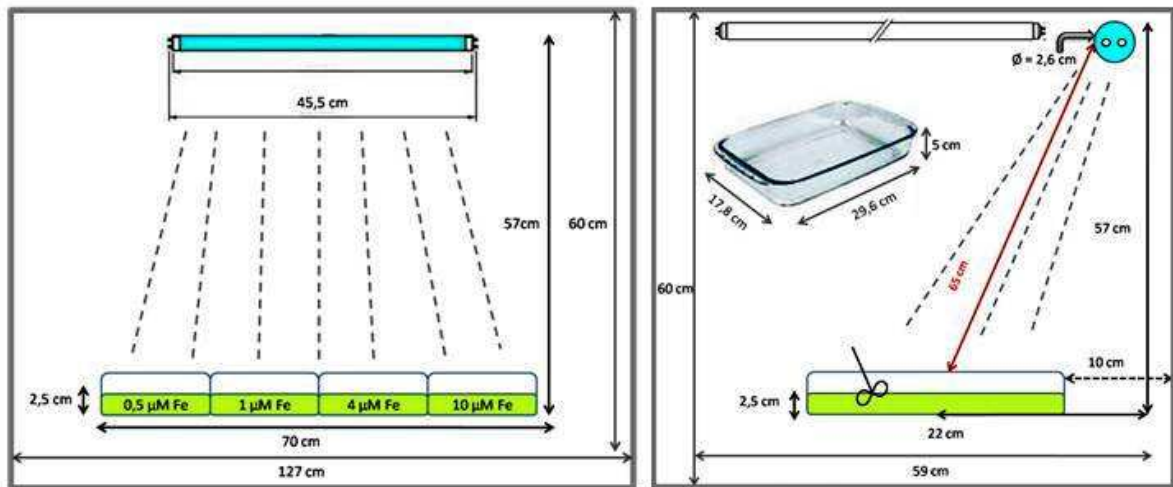
Os quatro recipientes foram posicionados na capela de fluxo laminar abaixo da lâmpada UV-C germicida de 254 nm (marca Philips, GER T18, 15 Watts, SCT 03S-Y; comprimento de 45,5 cm e diâmetro de 2,6 cm), que estava posicionada verticalmente no centro da capela (Figuras 4.4 C e D). A intensidade de radiação UV-C foi determinada através de medidor de raios ultravioleta (dimensões: 200 x 68 x 30 mm; e espectro de 290 a 390 nm), equipado com sensor destacável (dimensões: 82 x 55 x 7 mm), ambos da marca Instrutemp – Instrumentos de Medição. Desta forma, a intensidade média de UV-C ($30 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^2 = 30 \text{ mW}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^2$) nas lâminas líquidas ou suspensões de *Microcystis aeruginosa* nos refratários foi $2,0 \pm 1,41 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (ou $0,002 \pm 0,0014 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e a dosagem após 8 horas de exposição foi $16 \pm 1,41 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

A Tabela 4.3 e Figura 4.4 demonstram as dimensões estruturais da capela de fluxo laminar, dos recipientes utilizados ao longo do tratamento e do delineamento experimental em relação à posição da lâmpada UV-C.

Tabela 4.3 – Medidas estruturais da capela, dos refratários e do delineamento experimental

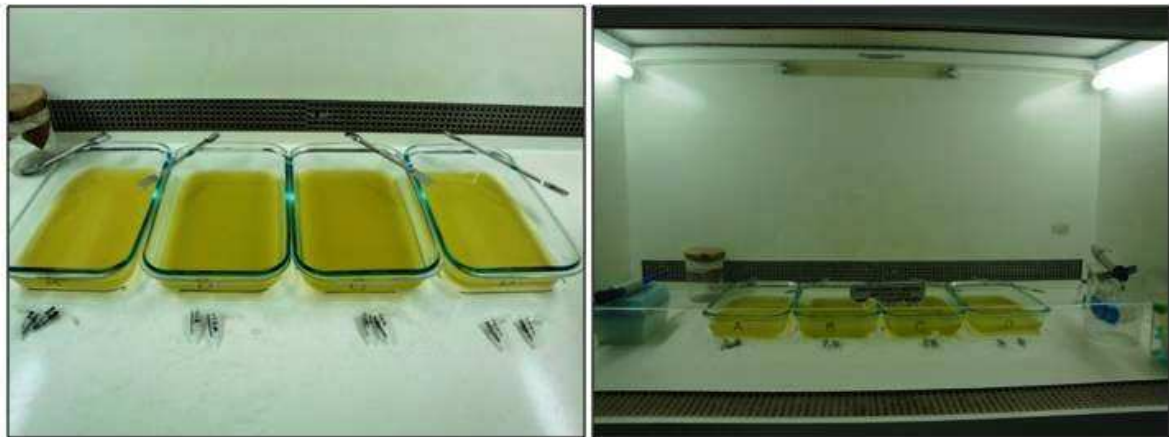
Descrição	Medida
Altura entre a lâmpada UV e a base (fundo) do refratário	57 cm
Altura da cultura de <i>M. aeruginosa</i> (600 mL) nos refratários	2,5 cm
Distância da parede interna da capela até metade (centro) dos refratários	22 cm
Distância da parede interna da capela até o início das bordas* dos refratários	10 cm
Comprimento da junção dos quatro refratários alinhados	70 cm
Comprimento do refratário de vidro	29,5 cm
Largura do refratário de vidro	17,8 cm
Altura do refratário	5 cm
Comprimento da câmara de fluxo laminar	127 cm
Largura da câmara de fluxo laminar	59 cm
Altura da câmara de fluxo laminar	60 cm

* Borda de vidro do refratário posicionada a frente da parede interna (fundo) da capela de fluxo laminar.



A – Corte frontal

B – Corte lateral



C e D – Fotografias frontais (acervo LÁZARO, 2012)

Figura 4.4 - (A) Corte frontal da câmara de fluxo laminar e posição dos refratários no tempo zero hora; (B) Corte lateral da câmara com medições e posição do refratário em relação à lâmpada UV-C; (C) Fotografia frontal com destaque para a coloração amarelada das culturas com tempo de 35 dias; e (D) Fotografia frontal da câmara e posicionamento dos refratários no tempo zero (ausência de dosagem – D_0 – de UV-C)

Vale ressaltar que a junção dos volumes de cada réplica deve-se a limitação de espaço físico imposta pela capela de fluxo laminar (comprimento de 127 cm, largura de 59 cm e altura de 60 cm) que não conteria os 12 Erlenmeyers totais ($n = 3 \times 4$) para a execução do experimento. Logo, não foi possível executar a simulação com réplicas.

Antes do início da exposição à UV-C, amostras (controle) foram recolhidas para observação em microscópio, determinação da densidade numérica, biovolume celular (biomassa) e concentração de clorofila-a; além de avaliação de microcistina em HPLC-PDA. Posteriormente, as culturas foram expostas à radiação UV-C durante 8 horas e a cada 2 horas foram retiradas alíquotas para análise das mesmas variáveis já citadas, após homogeneização do líquido. Além disso, ao final de cada amostragem os refratários eram mudados de posição (Tabela 4.4) e acendia-se novamente a lâmpada UV-C.

Tabela 4.4 – Esquema de rodízio das culturas de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) nos refratários de vidro expostos à UV-C a cada 2 horas

Horas (h)	Cloreto Férrico Hexahidratado			
T = 0 a 2	0,5 µM	1,0 µM	4,0 µM	10,0 µM
T = 2 a 4	10,0 µM	0,5 µM	1,0 µM	4,0 µM
T = 4 a 6	4,0 µM	10,0 µM	0,5 µM	1,0 µM
T = 6 a 8	1,0 µM	4,0 µM	10,0 µM	0,5 µM

4.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4)

4.4.1 Densidade numérica, biovolume celular e curva de crescimento

Alíquotas da cultura de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4), submetida aos ensaios de estresse (ferro e UV-C), foram preservadas com solução de lugol acético 4% (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003; LOURENÇO, 2006; modificado de BICUDO; MENEZES, 2006) em microtubos do tipo *Eppendorf* 1,5 mL (proporção de $\pm 40 \mu\text{L} = 0,04 \text{ mL}$ para 1 mL de cultura) para estimativa da densidade numérica e biovolume celular e posterior montagem das curvas de crescimento.

As análises quantitativas para determinação da densidade numérica foram realizadas em duplicata através de câmara de Neubauer espelhada da marca Labor Optik (área total de $9,0 \text{ mm}^2$ e volume de $0,9 \text{ mm}^3$), em microscópio óptico comum Olympus CX 41, equipado com ocular de medição, com aumento de 400 vezes, conforme método descrito por Sipaúba-Tavares e Rocha (2003) e Lourenço (2006). Esta câmara apresenta marcações de dimensões conhecidas e requer pequeno volume de amostra (Figura 4.5).

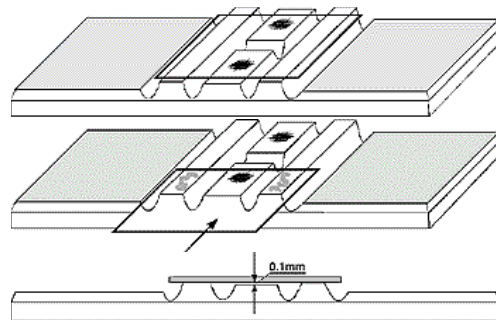


Figura 4.5 - As duas zonas de contagem da câmara de Neubauer, separadas por um sulco horizontal e limitadas de cada lado por um canal vertical, e a colocação da lamínula sobre estas zonas.

Fonte: Ciência Viva (2009).

A contagem das células foi efetuada em todo quadrado central da área de contagem da câmara (Figura 4.6-Y) quando as células e as colônias fossem facilmente distinguíveis para a contagem.

Contudo, quando a amostra apresentasse grande quantidade de células e colônias envolvidas em bainha de mucilagem em vários planos de visualização, a contagem era realizada em apenas cinco subquadrados para se evitar a perda de amostra por evaporação durante a contagem, que inviabilizaria a confiabilidade dos resultados. Para tanto, eram escolhidos os quatro subquadrados que formam as esquinas do quadrado central e o subquadrado central (Figura 4.6-Z), ou seja, foram contadas apenas as células contidas num volume igual a $5/25$ ou $1/5$ do volume total do quadrado central.

O quadrado central da câmara de Neubauer (composta por nove quadrados) é subdividido em 25 subquadrados e apresenta área de 1 mm^2 e volume de $0,1 \text{ mm}^3$ (ou 1 mL) (Figura 4.6). Vale ressaltar que a altura da lamínula até a câmara é de $0,1 \text{ mm}$. Desta forma, a densidade foi expressa em $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ e calculada segundo as Equações 4.1 e 4.2.

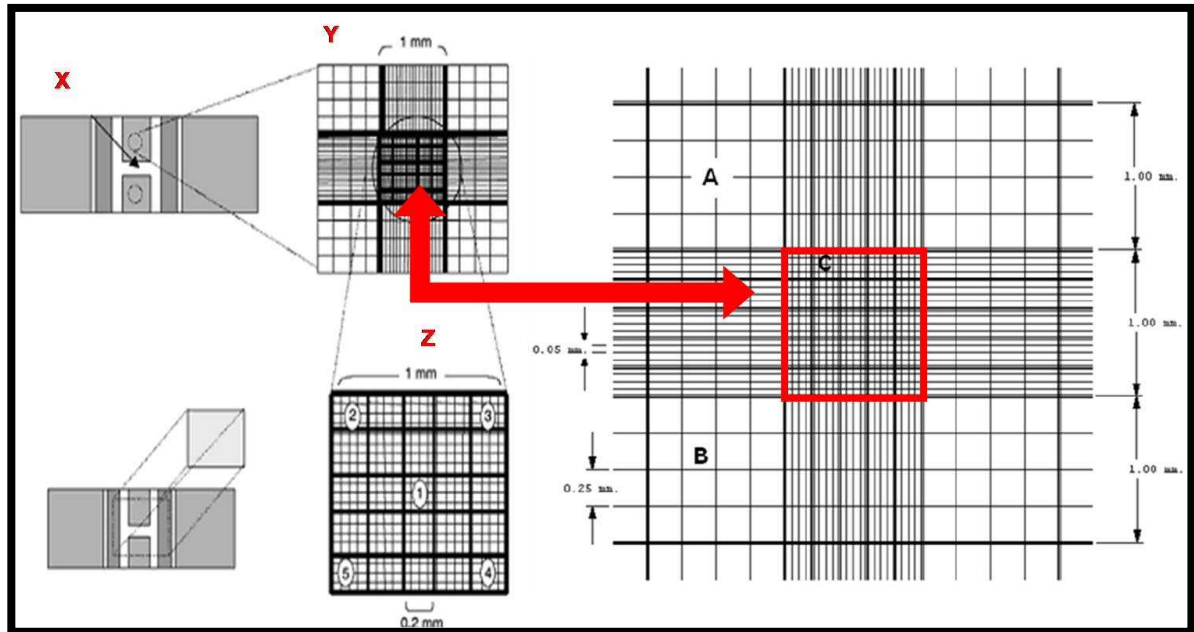


Figura 4.6 - Zonas de contagem da câmara de Neubauer (X), vista microscópica da área total de contagem na câmara de Neubauer, com destaque em vermelho para o quadrado central (Y) e dos 5 subquadrados (Z) onde foram efetuadas as contagens de *Microcystis aeruginosa*.

Fonte: Ciência Viva (2009) modificado.

$$\text{Densidade} = \frac{\text{Número total de células contadas}}{\text{Número de subquadrados contados} \times 4 \times 10^{-6}} \quad \text{Equação 4.1}$$

Assim,

$$\text{Densidade} = \text{Número total de células contadas} \times F \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde: Fator de multiplicação (F) = 10.000 (contagem das células sedimentadas em todo o quadrado central ou 25 subquadrados).

Fator de multiplicação (F) = 50.000 (contagem das células de apenas 5 subquadrados contidos no quadrado central).

Por outro lado, o volume celular das células quantificadas de *Microcystis aeruginosa* (BOX, 1980) foi estimado considerando-se as dimensões médias destas células, utilizando modelos geométricos aproximados de acordo com o formato celular conforme metodologia proposta por Edler (1979), Hillebrand e colaboradores (1999), Sun e Liu (2003) e Vadrucci, Cabrini e Basset (2007). No caso desta espécie foi adotada a forma da esfera e elipsóide (BOX, 1980) (Figura 4.7), tanto em células solitárias como células em fase final de divisão celular (telófase).

Nas amostras de tempo igual a zero, 6, 12, 18, 24, 30 e 35 dias de experimento do ferro, 15 células de cada tratamento e do controle, no mínimo, foram medidas através de régua de medição. Neste caso os volumes médios foram extrapolados para os demais dias. Já no experimento de exposição ao ultravioleta, 15 células de todas as amostras foram medidas com intuito de se obter volume celular por horário e por controles (4 μM de ferro e amostras sem exposição ao UV-C).

Posteriormente às medições, a média aritmética foi calculada a partir dos volumes celulares obtidos para cada situação descrita anteriormente. O biovolume ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) foi calculado a partir da multiplicação do volume celular médio pela densidade numérica, sendo os resultados convertidos em $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ao dividir por 10^6 .

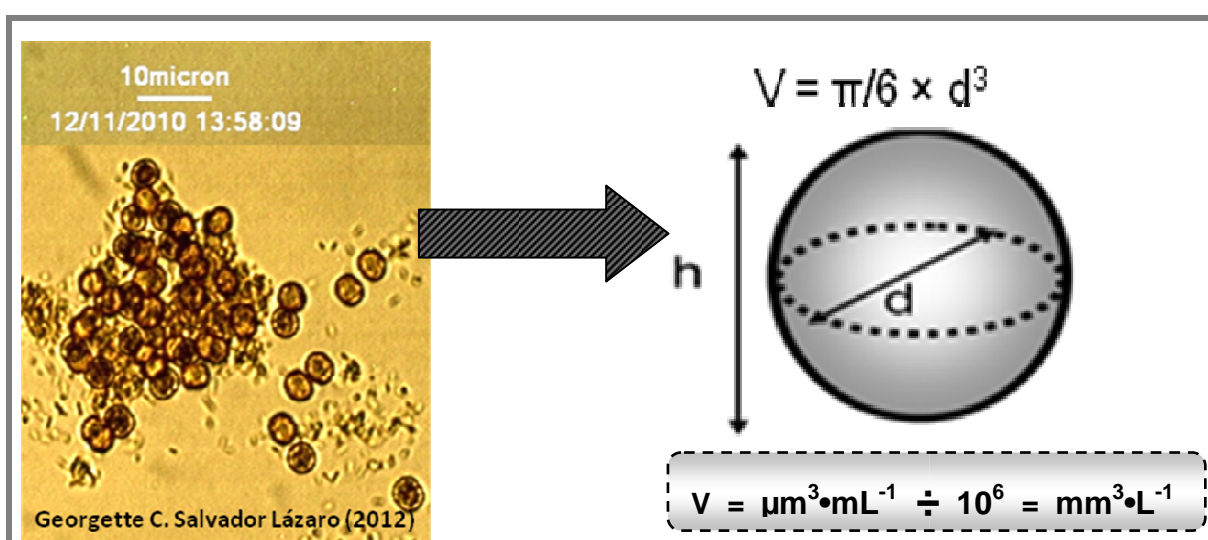


Figura 4.7 – Fotografia do 6º dia de *Microcystis aeruginosa* (acervo pessoal) e esquema matemático e ilustrativo do cálculo de biomassa via volume celular.

Fonte: Lázaro (2012).

Já a taxa de crescimento (μ , dia^{-1}) e o tempo de geração ou duplicação celular ($G = \text{divisões celulares} \cdot \text{dia}^{-1}$) do experimento do cloreto de ferro hexahidratado foram calculados (Equações 4.3 e 4.4) segundo Fogg e Thake (1987), APHA; AWWA; WEF (2005) e Lourenço (2006).

$$\text{Taxa de Crescimento (} \text{dia}^{-1} \text{)} = \frac{\ln \cdot N_2 - \ln \cdot N_1}{T_2 - T_1} \quad \text{Equação 4.3}$$

$$\text{Tempo de Geração (divisões} \cdot \text{dia}^{-1} \text{)} = \frac{\ln \cdot 2}{M} \quad \text{Equação 4.4}$$

Sendo: \ln = logaritmo neperiano

N_2 = número de células $\cdot \text{mL}^{-1}$ no tempo T_2

N_1 = número de células $\cdot \text{mL}^{-1}$ no tempo T_1

$T_2 - T_1$ = intervalo de tempo em dias

μ = velocidade específica de crescimento ou taxa de crescimento

4.4.2 Concentrações de clorofila-a: estimativa da biomassa

Para a determinação das concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$) e montagem da curva de crescimento, amostras de *Microcystis aeruginosa*, submetidas aos diversos tratamentos, foram retiradas a cada 2 dias e foram filtradas em filtro de fibra de vidro GF-6 (25 mm de diâmetro, Macherey-Nagel). Os filtros contendo as células foram acondicionados em papel alumínio, depositados em recipiente âmbar contendo sílica gel e armazenados em refrigerador a $+4^\circ\text{C}$ para posterior etapa de extração a frio do pigmento (LORENZEN, 1967; APHA; AWWA; WEF, 2005; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Deve-se ressaltar que o volume retirado a cada amostragem esteve condicionado ao reduzido número de células nos períodos iniciais de crescimento e elevada densidade na fase final do experimento, bem como ao volume total de cultura nos erlenmeyers (820 mL), de forma que o volume total retirado de alíquotas (76 mL) não provocasse estresse à cultura e comprometimento dos resultados dos experimentos.

A extração dos pigmentos fotossintéticos foi realizada por trituração do filtro contendo as células, no escuro, através de *mixer* com haste e utilizando-se 10 mL de acetona 90%, seguida de repouso dos extratos, refrigeração a +4°C e abrigo da luz, por um período entre 20 e 24 horas (*overnight*), conforme APHA, AWWA, WEF (2005) modificado.

Os extratos foram submetidos à centrifugação (centrífuga marca FANEM), sob velocidade de 3.000 rpm (rotações por minuto), durante 25 minutos e a leitura das absorvâncias da fração líquida (sobrenadante) dos extratos, depositada em cubeta de quartzo (marca Micronal, caminho óptico de 1 cm), foi executada em espectrofotômetro (marca Micronal, modelo B-582) e em duplicata, nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm, sendo posteriormente calculado as concentrações de clorofila-a. Para a leitura da amostra, foi utilizado como branco o solvente orgânico acetona 90%. Sequencialmente à primeira leitura, as amostras foram acidificadas com 100 µL (ou 0,1 mL) de ácido clorídrico 0,2 molar (M) e uma nova leitura foi realizada para quantificar o pigmento ativo (modificado de STRICKLAND; PARSONS, 1972; ARAR; COLLINS, 1997; APHA; AWWA; WEF, 2005; CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

O espalhamento de luz observado em 750 nm foi descontado nos cálculos, utilizando-se o solvente acetona como o branco. Para tanto, utilizou-se a fórmula proposta por Lorenzen (1967) (Equação 4.5) para obter as concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) e, assim efetuar a montagem das curvas de crescimento.

$$\text{Clorofila-a} = \frac{[(U_{665} - U_{750}) - (A_{665} - A_{750})] \cdot v \cdot F \cdot K}{V \cdot L} \quad \text{Equação 4.5}$$

Sendo: U_{665} = absorvância do extrato antes da acidificação no $\lambda = 665$ nm
 U_{750} = absorvância do extrato antes da acidificação no $\lambda = 750$ nm
 A_{665} = absorvância do extrato depois da acidificação no $\lambda = 665$ nm
 A_{750} = absorvância do extrato depois da acidificação no $\lambda = 750$ nm
 v = volume de acetona utilizado na extração (10,0 mL)
 F = fator (constante) para equiparar a redução em absorvância para a concentração inicial da clorofila-a (2,43)
 K = coeficiente de absorção da clorofila-a para acetona (11,0)
 V = volume da água filtrada (L)
 L = comprimento da cubeta (cm) ou passo óptico (cm)

4.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE MICROCISTINAS POR CLAE-PDA

4.5.1 Padrões cromatográficos, solventes e reagentes

Os padrões cromatográficos das variantes de microcistinas (MCY): RR (MCY-RR, código M1537-25UG), LA (MCY-LA, código M4194-100UG) e LR (MCY-LR, código 33893) foram adquiridas da SIGMA-ALDRICH para as análises cromatográficas (95% de grau de pureza). Todas as soluções estoque de microcistina foram diluídas em metanol, filtrados em membrana Millex PTFE (0,22 μ m de porosidade; 13 mm de diâmetro; Millipore Corporation[®]) e armazenados em *vials*, com posterior acondicionamento em freezer -22°C.

Os reagentes utilizados para as análises cromatográficas apresentavam grau analítico para HPLC. Os solventes, metanol e acetonitrila, eram das marcas Tedia e Carlos Erba, enquanto que o ácido trifluoroacético (TFA) foi obtido junto a Merck. Já a água ultrapura utilizada nas análises foi produzida através do sistema Milli-Q (Millipore) instalado no Laboratório de Saneamento da UFES (LABSAN).

4.5.2 Extração, determinação e quantificação de microcistina em CLAE-PDA

No 10^o, 20^o e 30^o dia de experimento do íon ferro foram retiradas amostras de 50 mL das réplicas de cada tratamento e do controle; enquanto que nos ensaios de exposição à radiação UV-C realizou-se amostragem de 50 mL de cada recipiente desde o momento sem exposição (controle) até a 8^a hora de exposição. Tais amostras foram armazenadas em freezer -22°C para posteriores análises cromatográficas de microcistina total (intracelular mais extracelular) em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sistema HPLC-PDA.

Posteriormente ao descongelamento do material; as amostras foram fervidas em micro-ondas em três (3) ciclos de ebulição⁷ de 9 minutos (totalizando 27 minutos) (modificado de AGUJARO, 2007; SILVA-STENICO *et al.* (2009)), visando maximizar o processo de rompimento celular, que foi iniciado com gelo prosseguido de degelo.

Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo em microfiltro de fibra de vidro GF-1 (diâmetro de 47 mm, Macherey-Nagel), com porosidade igual a 0,45 µm, e acidificadas ao pH 8,1 ± 0,05 por adição de ácido clorídrico (HCl) 1 molar (M), sendo o filtrado submetido ao processo de purificação e concentração pela técnica de extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE) através de cartuchos PP Chromabond[®] C18ec (octadecil, volume de 6 mL, adsorvente de 500 mg; Macherey-Nagel) e sob ação da gravidade, segundo método modificado de Lawton, Edwards e Codd (1994) e Albuquerque Junior, Melo e Franco (2007).

Os cartuchos de extração foram condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultra pura (Milli-Q), conforme orientação do fabricante, antes da inserção das amostras. Após o término de passagem das amostras pelos cartuchos, prosseguiu-se com as etapas de lavagem dos cartuchos (20 mL de água ultra pura e 20 mL de metanol 10%, 20% e 30%, respectivamente); eluição do analito (microcistinas) com 20 mL de solução de metanol:água:ácido trifluoroacético (89,9:10:0,1% volume/volume); evaporação em banho-maria à 45°C; ressuspensão do resíduo em 1 mL de metanol 100%; filtração em unidade filtrante GV Millex em polietileno com membrana Durapore (13 mm de diâmetro e 0,22 micra (µm) de poro, Millipore Corporation[®]); e avaliações cromatográficas por fase reversa (MARTINS, 2010).

⁷ A ebulição de cultura com microcistina não inativa sua toxicidade.

Para tanto, uma coluna analítica de gel de sílica octadecilsilanizada (C18) Symmetry 300 (250 x 4,6 mm, 5 µm de porosidade) foi utilizada nas análises em cromatógrafo, cuja separação foi realizada pelo gradiente de água e acetonitrila, ambos acidificados com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (Tabela 4.5) (MARTINS; ANTUNES; CASSINI, 2009).

Enquanto que a detecção de microcistinas nos eluatos foi realizada por análise em fotodiodo (PDA) e o espectro de absorção encontrava-se na faixa de 190 a 300 nm. Ainda, os picos referentes às variantes de microcistinas foram identificados por máxima absorção no comprimento de onda (λ) de 238 nm (LAWTON; EDWARDS; CODD, 1994).

O sistema cromatográfico líquido empregado foi o modelo SHIMADZU CBM-20A, com degaseificador DGU-20AS, bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, forno CTO-20A e detecção realizada por detectores de arranjo de diodos (PDA) SPD-M20A. Entretanto, os solventes utilizados na fase móvel (ácido trifluoroacético e acetonitrila) foram previamente filtrados em membranas de PTFE (0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, Millipore Corporation[®]) e degaseificadas em banho de ultrassom (Limpsonic[®]), respectivamente.

O volume injetado no cromatógrafo foi de 30 µL e a temperatura do forno e do detector foi controlada a 30°C. A eluição das variantes de microcistina ocorreu sob fluxo de 0,8 mL•minuto⁻¹ e cada réplica dos tratamentos foi analisada em duplicata, nas avaliações cromatográficas, sendo utilizado os valores médios. Os cromatogramas obtidos a partir do gradiente representado na Tabela 4.5 foram integrados e analisados em 238 nm através do software LC Solution (SHIMADZU Corporation). Para construção da curva analítica de calibração para a microcistina-LR (Sigma-Aldrich), uma solução estoque padrão de 1 µg•L⁻¹ foi previamente preparada e armazenada em um *vial*.

Posteriormente, a quantificação de microcistina foi realizada correlacionando-se o valor da área de quantidade conhecida de padrão com as áreas dos picos das amostras dos ensaios, ambas obtidas nas mesmas condições cromatográficas (MARTINS, 2010). Tanto as amostras do cultivo quanto as soluções-estoque destas variantes foram armazenadas em *vials* e acondicionadas em freezer -20 °C.

Tabela 4.5 – Gradiente linear dos solventes A (água e TFA 0,1%) e B (acetonitrila e TFA 0,1%), sob fluxo de 0,8 mL por minuto, utilizado para análise de microcistinas por CLAE-PDA, de acordo com método validado por Martins (2010).

Solvente (%)	Tempo de Retenção (minutos)			
	0	12	13	28
Solvente A: água e TFA 0,1%	65	48	65	65
Solvente B: acetonitrila e TFA 0,1%	35	52	35	35

Fonte: Martins (2010).

Assim, a sensibilidade do método validado por Martins (2010) permite determinar os limites de detecção⁸ e de quantificação⁹, segundo Equações 4.6 e 4.7 (BRASIL – ANVISA, 2003), respectivamente, e conforme Tabela 4.6. Vale destacar que o intervalo ou faixa linear do método refere-se ao limite de quantificação até a concentração máxima da linearidade (5,0 µg de MCY•mL⁻¹) (MARTINS, 2010).

$$\text{Limite de Detecção (LD)} = \frac{DP\alpha \cdot 3}{I_C} \quad \text{Equação 4.6}$$

$$\text{Limite de Quantificação (LQ)} = \frac{DP\alpha \cdot 10}{I_C} \quad \text{Equação 4.7}$$

Onde: DPα = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

I_C = inclinação da curva de calibração

⁸ Menor concentração do analito a ser detectada e não necessariamente quantificado.

⁹ Menor concentração do analito na amostra a ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, considerando que o limite do equipamento ainda não tenha sido atingido.

Tabela 4.6 - Limite de Detecção (LD) e de quantificação (LQ) das variantes de microcistina (MCY) conforme método validado por Martins (2010)

	MCY-RR	MCY-LR	MCY-LA
Limite de Detecção ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,05	0,03	0,11
Limite de Quantificação ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,18	0,10	0,38

4.5.3 Construção das curvas analíticas da microcistina

Para a determinação da concentração de microcistina das amostras dos experimentos de ferro e UV-C, estabeleceu-se uma relação, por regressão linear, entre a área do pico da toxina e as concentrações dos padrões utilizados para a calibração do método. Os pontos da reta obtida pela relação área/concentração foram apresentados na forma de gráficos.

Os pontos da reta obtida pela relação área/concentração de cada variável de microcistina estão apresentados nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10. O coeficiente de correlação (R^2) obtido para a determinação desta relação, em que [MYC] é a concentração de microcistina, em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, também está apresentado na Figuras 4.8, 4.9 e 4.10.

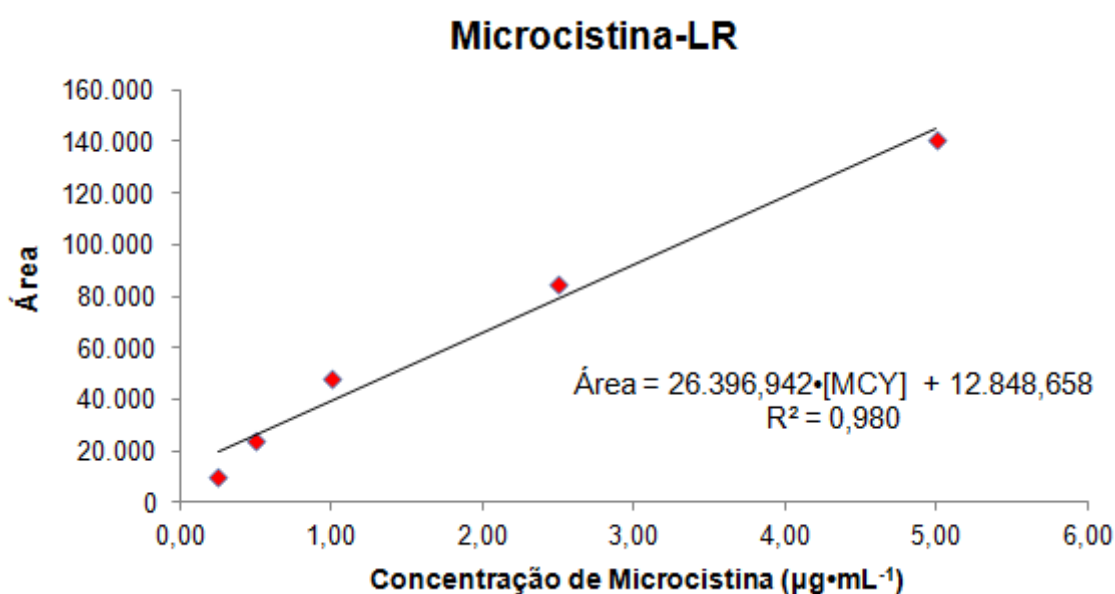


Figura 4.8 - Curva de linearidade e regressão linear entre a área do pico da toxina e sua concentração do padrão de microcistina LR (MCY-LR) utilizado para a calibração do método.

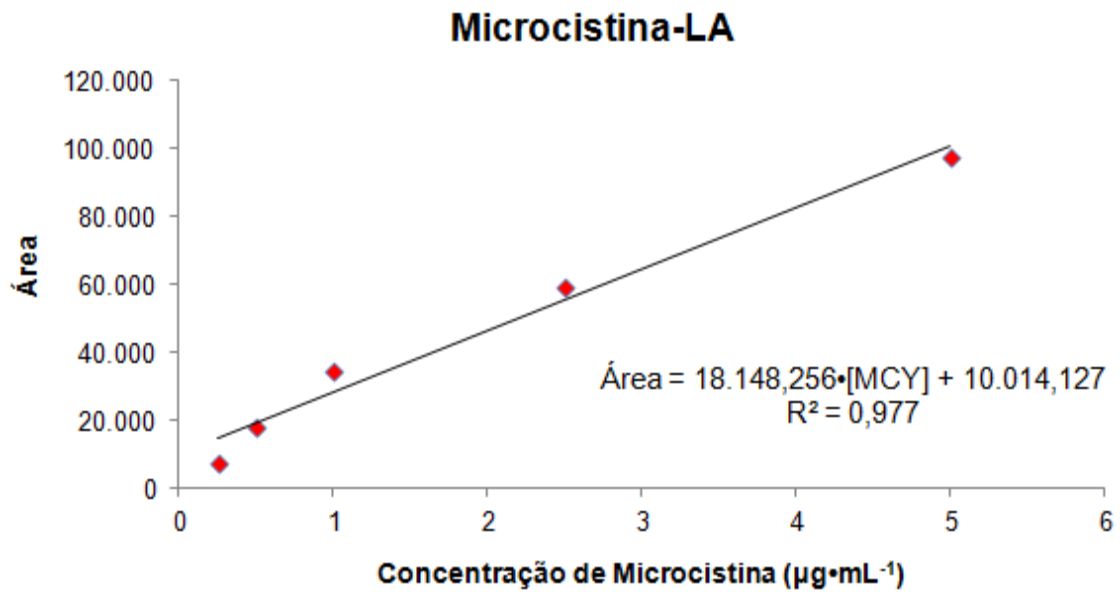


Figura 4.9 - Curva de linearidade e regressão linear entre a área do pico da toxina e sua concentração do padrão de microcistina LA (MCY-LA) utilizado para a calibração do método.

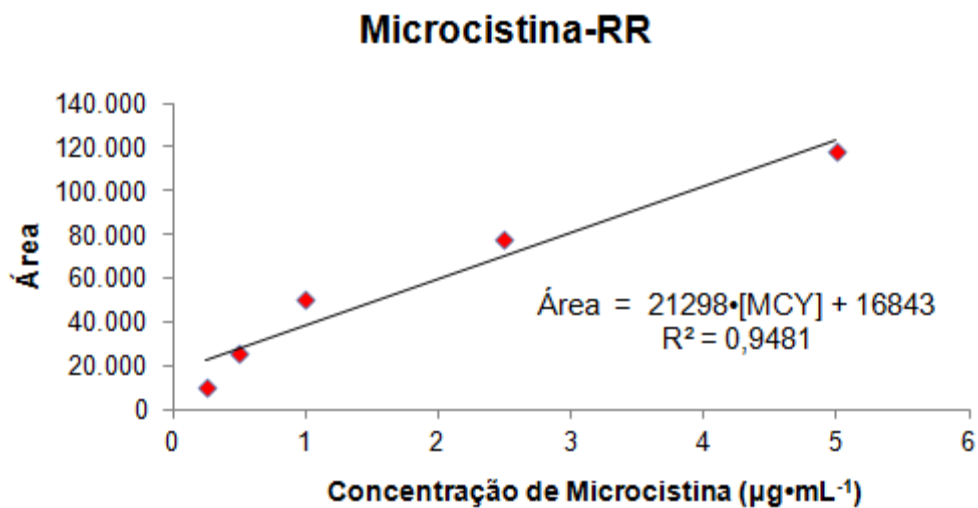


Figura 4.10 - Curva de linearidade e regressão linear entre a área do pico da toxina e sua concentração do padrão de microcistina RR (MCY-RR) utilizado para a calibração do método.

4.6 TRATAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram aplicadas apenas aos dados do experimento de cloreto férrico hexahidratado que foi conduzido em tréplica ($n = 3$), diferente do experimento de exposição à UV-C, realizado somente com uma réplica por causa da limitação de espaço na capela de fluxo laminar.

Assim, estatística descritiva foi empregada para analisar os dados através do programa Microsoft® Office Excel® 2007. Para tanto, foram determinados os valores mínimo, máximo, média aritmética como medida de tendência central para os dados em triplicata, desvio padrão (D_{Pad}) e o coeficiente de variação (CV%) como medidas do grau de dispersão dos dados em relação às médias.

Em seguida, para cada variável experimental foi analisada a normalidade dos dados através do teste Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, as variáveis que não tivessem uma distribuição normal foram logaritimizadas e foi realizada a análise de medidas repetidas lineares de modelo geral (GML) e teste de Tukey para múltiplas comparações utilizando-se o aplicativo SPSS versão 8.0. (*Statistical Package for the Social Sciences*). Foram considerados dados com variação significativa para o nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O testes no experimento do ferro foram aplicados nas variáveis densidade numérica, biovolume, concentrações de clorofila-a, taxa de crescimento, tempo de geração, e concentração e área do pico cromatográfico da microcistina-LR.

Em contrapartida, não foi possível realizar análise estatística de diferença de médias com os dados do experimento de exposição à radiação UV-C, visto que foi analisada amostra composta (união das triplicatas do experimento do cloreto de ferro hexahidratado). Este procedimento deve-se a falta de espaço na capela de fluxo laminar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse item são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios realizados em laboratório. Primeiramente foram discutidos os efeitos sobre o crescimento e biomassa de *Microcystis aeruginosa* Kützing (NPLJ-4), a partir de diferentes concentrações de íon ferro e pela exposição à radiação ultravioleta C. Em seguida, efeitos qualitativos e quantitativos sobre a produção de microcistinas foram examinados visando compreender os impactos de diferentes teores de ferro e de diferentes dosagens/exposição de UV-C.

Ademais, os dados de densidade e biovolume foram transformados em logaritmo neperiano antes de serem plotados em gráficos.

5.1 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO E BIOMASSA DE *Microcystis aeruginosa*

5.1.1 Exposição a diferentes concentrações de íon ferro

Nos tratamentos com diferentes concentrações de cloreto férrico hexahidratado (0,5; 1; 4 e 10 μM) foi observado que, em geral, as fases do crescimento de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) foram caracterizadas por uma fase de adaptação celular ou *lag* no intervalo entre 0 (zero) e 5 dias; que é sucedida por uma fase exponencial ou logarítmica (*log*) equivalente a 11 dias (6^o ao 14^o dia), caracterizada por um aumento numérico de células esféricas, unicelulares, agrupadas em colônias e, ainda, em divisão celular.

Posteriormente a população das culturas exibe uma fase estacionária do 16^o ao 35^o dia em termos de densidade numérica e biovolume em todos os tratamentos (Figura 5.1). Os valores de biomassa calculados através do método de biovolume apresentaram o mesmo comportamento que a densidade numérica de células.

Sá (2006) relata uma curva de crescimento da cepa NPLJ-4 com fase *log* entre 6 e 18 dias, que se assemelha aos dados obtidos nesta pesquisa. Em relação às amostras controle (4 μM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), a fase exponencial encontra-se entre 8 e 14 dias.

Segundo Lourenço (2006), a duração de cada estágio depende de fatores como a espécie examinada, as concentrações de nutrientes ou elementos-traços oferecidos, a intensidade de luz, o volume e a forma de cultivo, dentre diversos outros fatores.

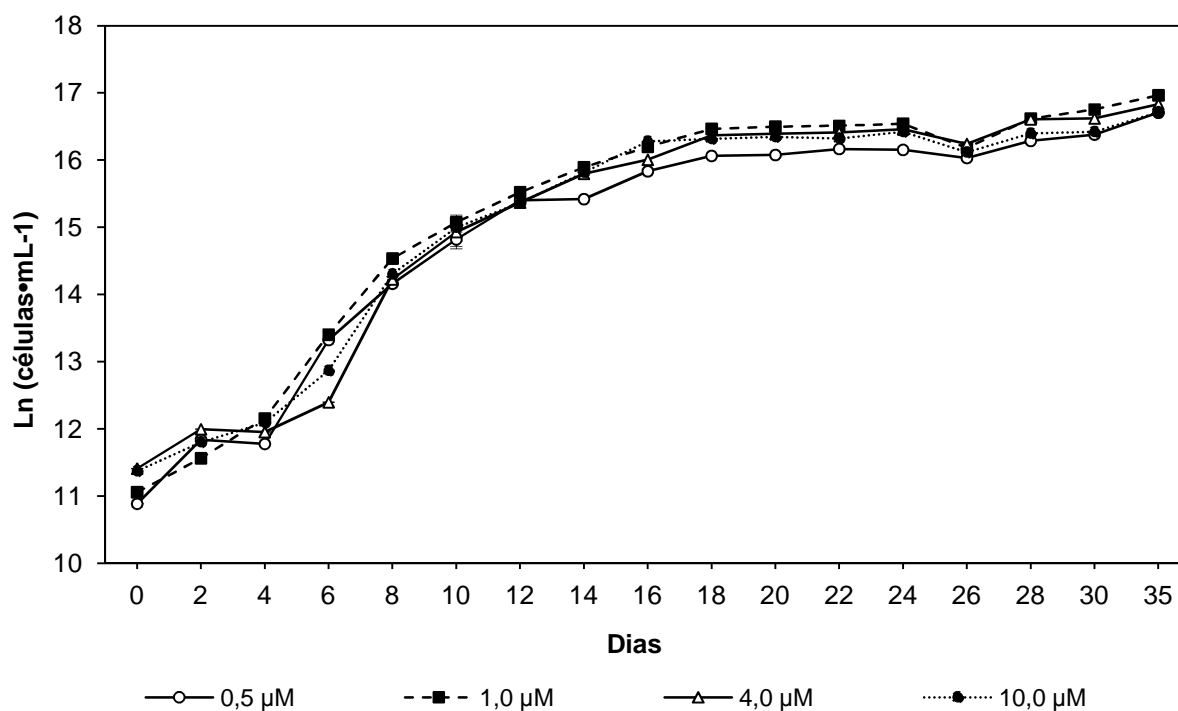


Figura 5.1 - Curva logarítmica de crescimento ($\ln \cdot \text{mL}^{-1}$) de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, ao longo de 35 dias: 0,5 (círculo aberto), 1 (quadrado preto), controle ou 4 (triângulo aberto) e 10 (círculo preto) μM de ferro, respectivamente. Cada ponto representa a média de três réplicas ($n=3$).

Em relação à densidade numérica ($n = 3$) ao longo do tempo de 35 dias de crescimento, as culturas com 0,5 μM de ferro (cloreto férrico hexahidratado) apresentaram densidade mínima de $4,5 \times 10^4$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$, máxima de $2,6 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ e valores médios entre $5,3 \times 10^4$ e $1,8 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$. O tratamento de 1 μM atingiu valores mínimos de $4,5 \times 10^4$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$, máximo de $2,7 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ e valores médios entre $6,3 \times 10^4$ e $2,3 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$. Valores estes bem próximos aos encontrados no tratamento com 0,5 μM .

O controle (4 μM) apresentou densidades médias superiores aos dois cultivos anteriores, entre $9,0 \times 10^4$ e $2,0 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$, mínimo de $6,0 \times 10^4$ e máximo de $3,1 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$. Já o tratamento com 10 μM do mesmo elemento registrou valores médios de densidade entre $8,7 \times 10^4$ e $1,8 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$, mínimo de $8,0 \times 10^4$ e máximo de $2,8 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$. O coeficiente de variação (CV%) para os tratamentos e controle foi de 57,74%.

Além do exposto anteriormente (Figura 5.1), as culturas tratadas com 1 μM de ferro demonstraram maior crescimento em termos de densidade numérica, especialmente no 10^o, 20^o, 30^o e 35^o dia ($3,5 \times 10^6$; $1,5 \times 10^7$; $1,9 \times 10^7$ e $2,3 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente); seguido do tratamento com 10 μM e do controle (4 μM), que alternavam os valores mínimos e máximos. Já as culturas com 0,5 μM de ferro apresentaram os menores valores em densidade ($2,7 \times 10^6$ no 10^o dia; $9,6 \times 10^6$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ no 20^o dia; $1,3 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ no 30^o dia e $1,8 \times 10^7$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ no 35^o dia).

Além da densidade numérica, outra maneira de quantificar organismos fitoplanctônicos, como cepas de cianobactérias, é através da estimativa da sua biomassa através do biovolume, que é um dado importante em função da diversidade de tamanhos entre as mesmas espécies submetidas a tratamentos e condições de estresses diferentes (NUNES, 2003). Portanto, tem sido prática freqüente, conforme Margalef (1983), multiplicar os valores da densidade numérica das espécies por um valor aproximado do volume médio de suas respectivas células, obtendo-se um valor muito próximo da biomassa algal.

A Figura 5.2 representa a biomassa em termos de biovolume celular. Este acompanhou os valores de densidade numérica (Figura 5.1), com as culturas de 1 μM de ferro apresentando maior biomassa, enquanto que as culturas sob menor limitação de ferro (0,5 μM) proporcionaram menor biomassa.

O biovolume celular da *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) aumentou do 6^o até o 16^o dia, com tendência a estabilização (fase estacionária) a partir do 18^o dia. Além disso, apresentou uma redução no 26^o dia, elevando-se do 28^o ao 35^o dia, assim como nos dados de densidade numérica.

Ainda no tratamento com 0,5 μM de íon ferro registrou-se biomassa ($n = 3$) mínima de 1 mm^3 de células $\cdot\text{L}^{-1}$, máximo de $926,13 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$ e valores médios variando entre 1 e $629,21 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$. O tratamento de 1 μM obteve biovolume celular mínimo de $1,09 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$, máximo de $1.201,71 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$ e valores médios entre 1,53 e $1.044,02 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$. No controle (4 μM) os cultivos apresentaram valores médios entre 3,18 e $877,98 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$, mínimo de 1,71 e máximo de $1.331,91 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$.

Já o tratamento com 10 μM registrou valores médios entre 2,79 e $794,98 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$, mínimo de 2,41 e máximo de $1.225,58 \text{ mm}^3$ de células $\cdot\text{L}^{-1}$. O comportamento do biovolume assemelha-se aos da densidade numérica, inclusive no que tange ao coeficiente de variação (CV%) dos dados dos tratamentos e controle que é similar (57,74%) (Apêndice Aa e Ab) (Tabela 5.1).

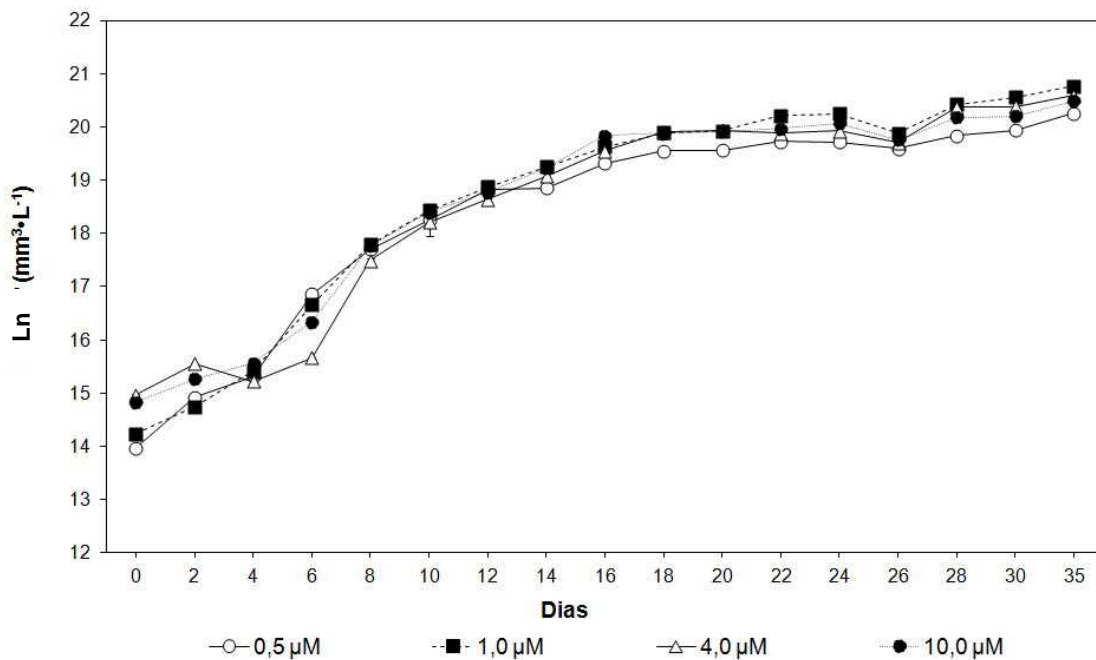


Figura 5.2 - Curva logarítmica da média do biovolume ($\ln \cdot \text{mm}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$), representante da biomassa de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, ao longo de 35 dias: 0,5 (círculo aberto), 1,0 (quadrado preto), controle ou 4,0 (triângulo aberto) e 10,0 (círculo preto) μM de íon ferro, respectivamente. Cada ponto representa a média de três réplicas ($n=3$).

De acordo com Nunes (2003), muitos autores preferem estimar a biomassa de microalgas baseada nos valores de clorofila-a, que é um método mais simples, todavia menos confiável, uma vez que em uma amostra de água existe uma variedade de outros “resíduos” que podem interferir na leitura desta variável.

Quanto à análise de clorofila-a (Tabela 5.1), o tratamento com 0,5 μM de ferro apresentou a menor variação em termos de valores médios de biomassa durante todo experimento (26,08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 801,82 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no 20º dia de crescimento).

O microcosmo com 1 μM atingiu concentração média mínima de clorofila-a no início do cultivo (26,08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); e média máxima no 20º dia de crescimento (1259,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), comportamento semelhante ocorreu nas culturas com 0,5 μM e 10 μM . Enquanto que o cultivo com 4 μM (controle) de íon ferro apresentou a concentração média máxima de clorofila-a no 35º dia do experimento, com valores de 1475,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabela 5.1 - Teores de clorofila-a de uma linhagem da cepa tóxica NPLJ-4 de *M. aeruginosa* sob o efeito de diferentes concentrações de ferro

Tratamento	Teor de clorofila a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante o crescimento				
	0 dia	10º dia	20º dia	30º dia	35º dia
0,5 μM	26,1	358,3	801,8	388,6	490,8
1 μM	26,1	413,7	1259,0	545,0	979,4
4 μM	32,6	344,6	836,0	824,7	1593,2
10 μM	30,4	420,9	1644,5	740,1	1475,6

As culturas apresentaram mudança de coloração ao longo do tempo, inicialmente com coloração verde-azulada intensa e adquiriram coloração amarelada à partir do 20º dia de crescimento (Figura 5.3), isso corrobora com o decaimento do teor de clorofila-a observado na maior parte dos tratamentos e controle (Tabela 5.1).

O tratamento de 0,5 μM , seguido das culturas tratadas com 1, 4 e 10 μM de ferro apresentaram coloração amarelada, respectivamente, entre 21º e 30º dia, justificando a redução das concentrações de clorofila-a em *M. aeruginosa* no mesmo período.

Culturas com déficit de ferro ($0,5 \mu\text{M}$) apresentaram menores valores de biomassa quando comparados às concentrações dos demais tratamentos e controle, além de um aumento repentino do teor de clorofila-*a* no 20º dia, indicando uma provável recuperação das células, todavia, sem sucesso a posteriori. Por outro lado, o conteúdo deste pigmento aumenta no intervalo entre 31º e 35º dia após aumento da densidade e biovolume de cianobactérias.

No que tange as diferentes concentrações de ferro, de maneira geral, os tratamentos com 1 e 4 μM foram os que obtiveram os maiores valores tanto de densidade numérica e biovolume celular (Figuras 5.1 e 5.2), enquanto que na quantificação pelo método espectrofotométrico utilizando a clorofila-*a*, os maiores valores aferidos foram nos tratamentos 4 e 10 μM , respectivamente (Tabela 5.1).

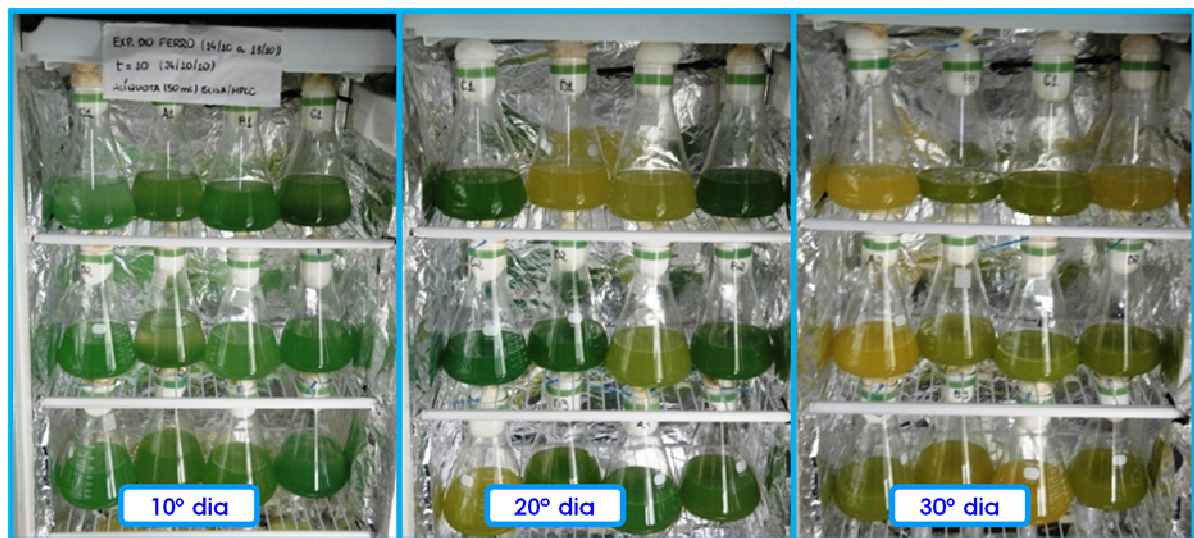


Figura 5.3 - *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) cultivada em meio ASM-1, modificado com diferentes concentrações de ferro: destaque para o 10º, 20º e 30º dia de crescimento.

Do ponto de vista estatístico, a análise de variância por medidas repetidas (GLM) pelo teste de Tukey, a 5% de significância ($n = 3$), não demonstrou diferenças significativas para os dados de densidade numérica, biovolume e clorofila-*a* entre as concentrações de ferro testadas. Além disso, as diferentes concentrações de íon ferro nas culturas acompanharam os dados de biomassa de *M. aeruginosa*.

Em contrapartida, a taxa de crescimento e o tempo de geração (ou duplicação) de *M. aeruginosa* apresentaram diferença significativa ao nível de 5% ($p = 0,05$; alfa = 5%) entre as concentrações analisadas. Observou-se a redução da taxa de crescimento e o aumento do tempo de duplicação com o aumento da concentração de ferro no meio de cultivo (Figura 5.4). Tais resultados indicam que concentrações elevadas do micronutriente ferro no meio de crescimento pode exercer um efeito negativo sobre a duplicação desta cianobactéria.

As cianobactérias possuem duplicação celular a uma taxa de 0,3 a 1,4 dia⁻¹ (CHORUS; BARTRAM, 1999). Nessa pesquisa obteve-se taxa de crescimento variando entre 0,24 a 0,37 dia⁻¹. Enquanto que o tempo de duplicação variou de 1,92 a 2,90.

Comparando os tratamentos e controle do 10^o, 20^o e 30^o dia, o tratamento com 10 µM de ferro registrou menor taxa de crescimento e maior tempo para a ocorrência de divisões celulares, enquanto culturas com 0,5 µM apresentaram maior taxa de crescimento e menor tempo de geração. Logo, as divisões celulares de *M. aeruginosa* ocorreram em maior quantidade quando o meio ASM- 1 continha maior concentração de ferro, reduzindo os valores à medida que o nível deste micronutriente ficava escasso (10, 4, 1 e 0,5 µM, respectivamente). Em contrapartida, a taxa de crescimento comportava-se de modo contrário (Figura 5.4).

Por conseguinte, o parâmetro taxa de crescimento (μ) do 10^o, 20^o e 30^o dia apontou significância estatística entre os tratamentos contendo 10 e 1 µM e 10 e 0,5 µM, ao nível de significância de 5% (95% de confiança com $p < 0,05$). Além de variação entre o controle (4 µM) e o menor nível de ferro. Esta taxa foi maior nos tratamentos de 0,5 e 1,0 µM ($p < 0,05$) em relação ao controle e ao tratamento de 10 µM, respectivamente.

Já no tempo de geração (G) ocorreram diferenças estatísticas entre as culturas tratadas com 10 e 1,0 µM; 10 e 0,5 µM; e 4,0 e 0,5 µM de ferro. Os tratamentos de 0,5 e 1,0 µM apresentaram menor tempo de geração ($p < 0,05$), em relação ao controle e o tratamento de 10 µM (menor G) ($p < 0,05$).

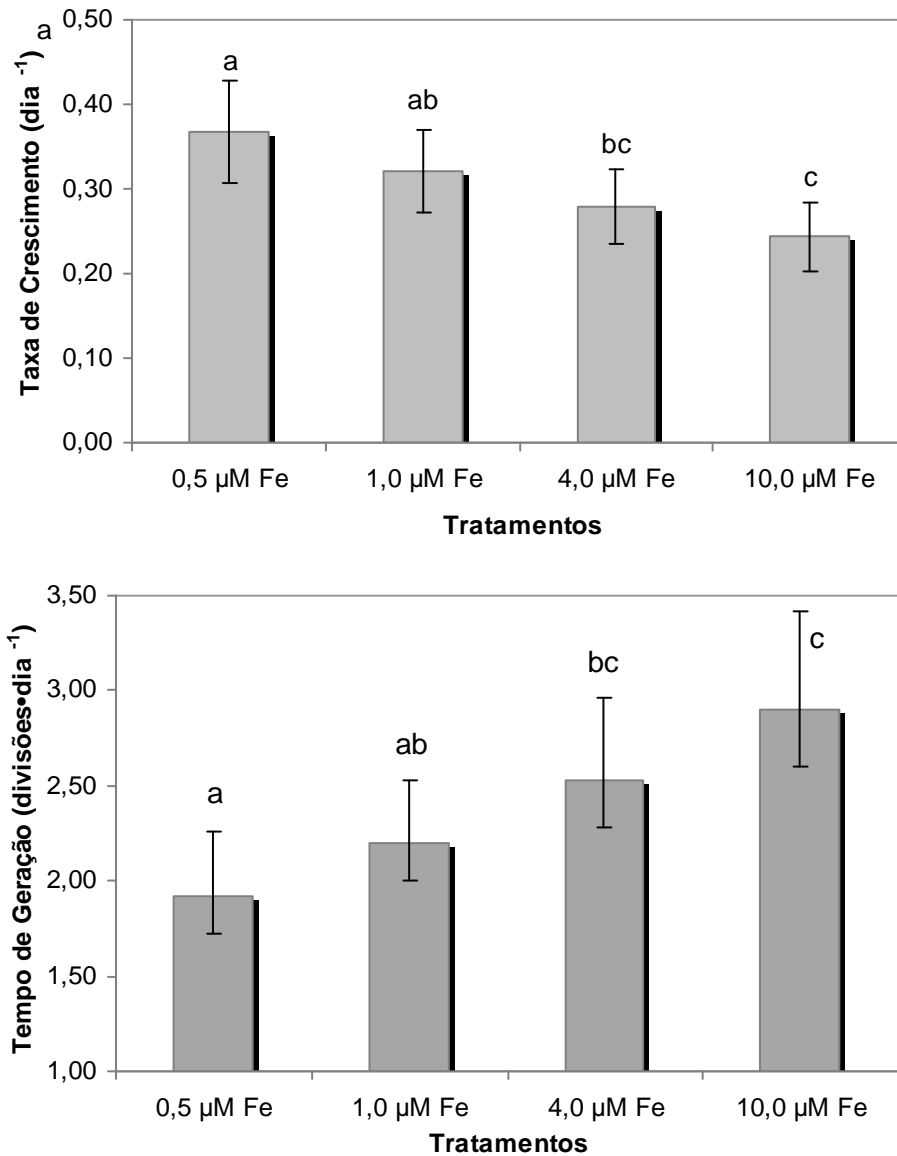


Figura 5.4 - Taxa de crescimento e o tempo de geração de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) sob o efeito de diferentes concentrações de ferro. Cada barra representa a média de três réplicas (n=3) de cada concentração de cloreto de ferro hexahidratado: 0,5, 1, 4 e 10 μM de ferro, respectivamente.

Segundo Lourenço (2006), a taxa de crescimento vai diminuindo linearmente com o aumento da densidade da população, de forma que em densidades próximas de zero, a população tende a apresentar um crescimento exponencial, mas à medida que a população aumenta, a taxa de crescimento diminui até chegar a zero, quando a população atinge a capacidade suporte do ambiente e tem seu crescimento cessado.

Lukač e Aegerter (1993) analisando o efeito de íons Fe^{2+} na taxa de crescimento e na produção de cianotoxina por *M. aeruginosa* em meio de cultura BG 11, registraram que as concentrações atóxicas deste micronutriente afetaram o crescimento e a produção de toxinas. No trabalho de Lukač e Aegerter (1993) a taxa de crescimento diminuiu para 0,68 em culturas com concentrações de Fe^{2+} de até 0,1 mM, indicando o envolvimento deste íon na fotossíntese e síntese de clorofila.

Os resultados obtidos na pesquisa em questão foram completamente opostos aos dados encontrados por Lukač e Aegerter (1993), ou seja, a taxa de crescimento de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) decresceu em culturas experimentais com maior concentração de ferro.

Portanto, os dados do trabalho em questão ilustraram um comportamento contrário ao descrito em literatura, onde o íon ferro possibilitaria maior produção de clorofila-a e maior taxa de crescimento. Contudo, nessa pesquisa foram observados que o aumento do tempo de divisão celular por dia é diretamente proporcional às culturas com maiores concentrações de ferro, enquanto que a taxa de crescimento de *M. aeruginosa* reduz aumentando-se a concentração deste micronutriente.

5.1.2 Exposição à radiação ultravioleta C (UV-C)

Sakai e colaboradores (2009) e Tao e coautores (2010) sugerem a radiação ultravioleta C (254 nm) como uma alternativa para atenuar florações de cianobactérias em lagos e reservatórios, tendo em vista que o crescimento de espécies de cianobactérias, inclusive de *Microcystis aeruginosa*, pode ser suprimido dentro de alguns dias através da exposição de 30 segundos a 10 minutos da radiação UV-C (SAKAI *et al.*, 2009; TAO *et al.*, 2010).

No experimento da pesquisa em questão, a UV-C provocou a redução da densidade numérica e do biovolume celular de todas as culturas de *Microcystis aeruginosa* Kützing (cepa tóxica NPLJ-4), em diferentes concentrações do micronutriente ferro (0,5; 1; 4 e 10 μM), a medida que o tempo de exposição à radiação ultravioleta aumentava, de forma gradativa, em horas (Figuras 5.5 e 5.6).

O número de células de *Microcystis aeruginosa* Kützing (cepa tóxica NPLJ-4) da cultura com 4 μM de ferro reduziu em 84,82% o número de células por mililitro inicial (concentração inicial), contrapondo-se aos 63,06% da cultura com déficit de ferro de 1 μM .

Já os tratamentos com 0,5 e 10 μM de ferro apresentaram redução da densidade com valores próximos (75,37% e 72,65%, respectivamente) com o aumento da exposição à UV-C (densidade de $8,95 \times 10^6$, $1,23 \times 10^6$, $1,36 \times 10^6$, $9,10 \times 10^6$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ nos teores de 0,5; 1; 4 e 10 μM de ferro).

Ademais, o decrescimento dos valores indicadores de biomassa foi maior nos tratamentos com teores de concentração de ferro, no caso desse experimento: 1 μM (micromolar).

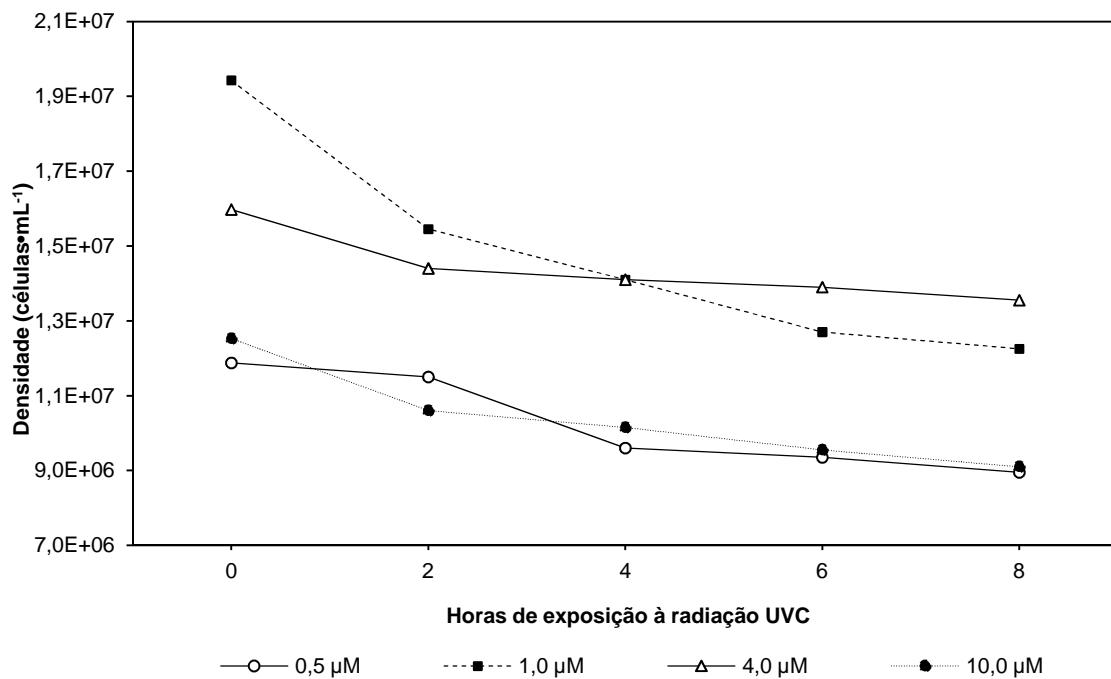


Figura 5.5 - Densidade de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e exposição à radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas: 0,5 (círculo aberto), 1 (quadrado preto), controle ou 4 (triângulo aberto) e 10 (círculo preto) μM de ferro, respectivamente.

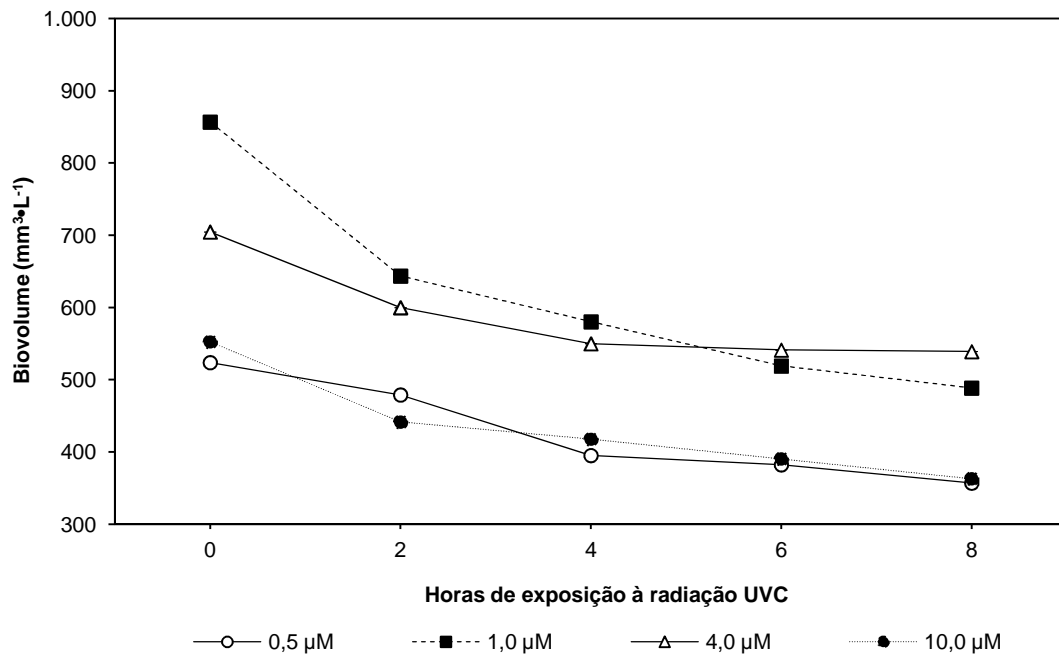


Figura 5.6 - Biovolume de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e sob exposição da radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas: 0,5 (círculo aberto), 1 (quadrado preto), controle ou 4 (triângulo aberto) e 10 (círculo preto) μM de ferro, respectivamente.

A concentrações de clorofila-*a* de *Microcystis aeruginosa* Kützing (cepa tóxica NPLJ-4) das culturas com 0,5 e 10 μM de ferro diminuíram de forma gradativa entre 2 e 8 horas de exposição à radiação UV-C. Ainda, entre 0 e 2 horas a redução foi menos gradual, ou seja, mais rápida, porém não impactante. Nos cultivos com 1 e 4 μM de ferro, a biomassa foi reduzida pela incidência da UV-C com o aumento do tempo de exposição da 4^a a 8^a hora (Figuras 5.7).

Em relação às concentrações de feopigmentos, as culturas apresentaram pequenos teores, sendo o valor máximo de $326 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ na cultura com 10 μM de ferro (Fe). Desta forma, a biomassa das células em fase de senescência era muito reduzida quando comparada ao conteúdo de clorofila-*a* das células com bom estado fisiológico (Figuras 5.8).

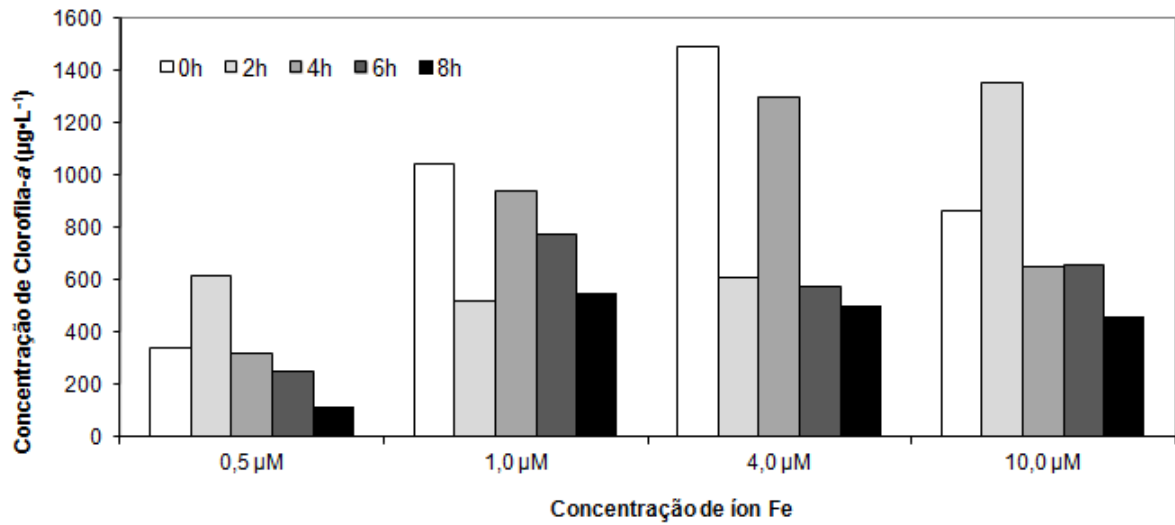


Figura 5.7 - Concentração de clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e sob exposição da radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas. Cada barra representa um horário, que aumenta de forma gradativa de zero hora ou sem exposição (branca) a 8 horas (preta).

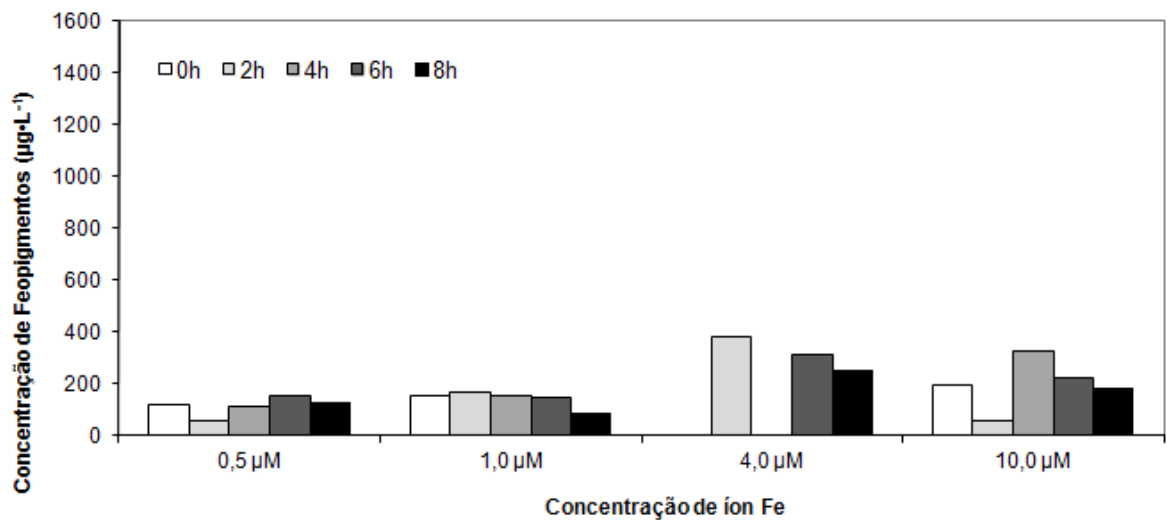


Figura 5.8 - Concentração de feopigmentos de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro e sob exposição da radiação ultravioleta C (UV-C) por 8 horas. Cada barra representa um horário, que aumenta de forma gradativa de zero hora ou sem exposição (branca) a 8 horas (preta).

Santos (2009) relata que a radiação UV-C pode afetar diretamente a taxa de crescimento da população de cianobactérias e até a sua sobrevivência. Ainda pode destruir constituintes celulares que possuem picos de absorção nessa região do espectro luminoso. A incidência de UV-C também pode afetar a fixação de nitrogênio e reduzir o conteúdo proteico total das células com o aumento do tempo de exposição à radiação. Lembrando que radiações UV-C possuem energia suficiente para quebrar a ligação mais forte (ligação covalente) e, por isso, provocam muitos danos à célula exposta à radiação.

Durante o tempo de exposição de *M. aeruginosa* Kützing (cepa NPLJ-4) à radiação ultravioleta C (UV-C), a morfologia apresentou várias diferenciações tais como comprometimento da divisão celular, danos ao formato e tamanho das células em divisão celular (maior e mais arredondado), na deformação dos aerótopos que ficaram dilatados e no decréscimo de células a medida que o tempo de incidência da radiação aumentava. O aumento dos danos foi diretamente proporcional ao tempo de exposição (Figura 5.9).

Desta forma, as células são diretamente afetadas pela incidência de luz ultravioleta, podendo resultar na alteração da estrutura de proteínas, DNA e outras moléculas relevantes além de alterações em processos fisiológicos (SANTOS, 2009). As células expostas à radiação UV-C foram negativamente afetadas do ponto de vista morfológico, contribuindo para redução do número de células e possível degradação da cianotoxina liberada no meio com o rompimento celular como discutido no item seguinte.

Ainda nada pode ser afirmado quanto a redução do número de aerótopos ao longo das 8 horas de exposição; uma vez que não foi realizado contagem destas vesículas gasosas. Todavia, as culturas sadias exibiam maior quantidade de aerótopos quando comparados às células tratadas por UV-C. Esta informação obteve-se através de análise qualitativa em microscópio óptico.

Santos (2009) alerta que a redução do número de aerótopos nas células com o aumento da dose de UV, prejudica a regulação da flutuabilidade exercida por estas vesículas gasosas, que permite a proximidade da cianobactéria junto a nichos mais adequados em termos de concentração de nutrientes, luminosidade e competição.

Além disso, *Microcystis aeruginosa* controla sua posição na coluna d'água pela mudança da gravidade específica das células. Os aerótopos permitem melhor posicionamento na captação de luz em ambientes como lagos e reservatórios (SANT'ANNA *et al.*, 2008).

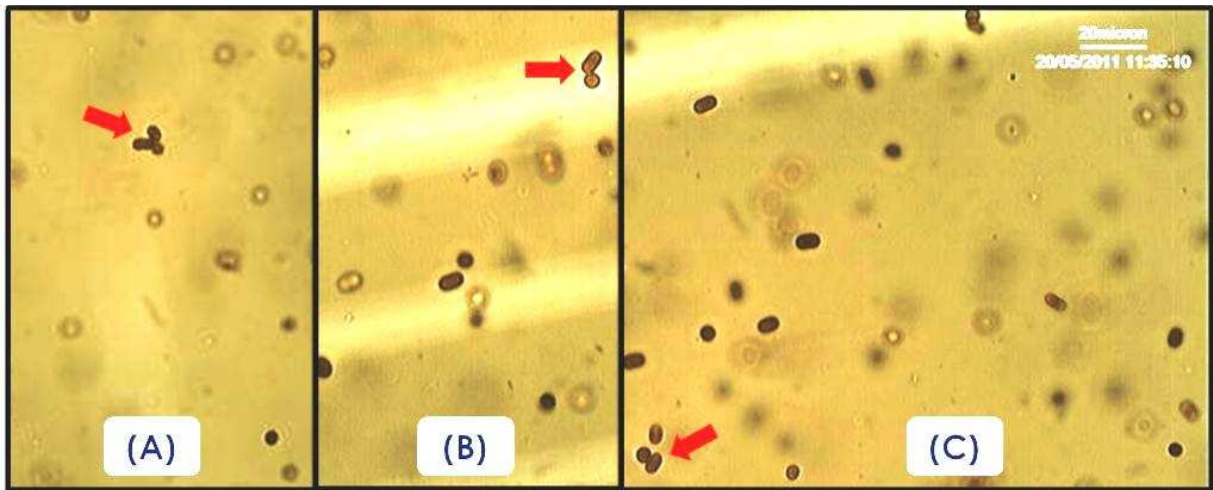


Figura 5.9 - Alterações na divisão celular de *Microcystis aeruginosa* (cepa tóxica NPLJ-4) depois da exposição ao UV-C. Esta cianobactéria foi cultivada em meio ASM-1, modificado com diferentes concentrações de ferro. Observação das células expostas à UV-C por 2h (A), 4h (B) e 6h (C) no microscópio óptico (aumento 400x).

5.2 EFEITOS QUALITATIVO E QUANTITATIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MICROCISTINA

5.2.1 Exposição a diferentes concentrações de íon ferro

As concentrações de microcistina-LR foram oriundas de células da fase exponencial (6^o ao 14^o dia) e da fase de estagnação do crescimento (16^o ao 35^o dia) das culturas de todos os tratamentos com micronutriente ferro (0,5; 1 e 4 μM) e do controle (4 μM – condições ótimas de crescimento). Na fase *log* ocorre um aumento numérico de células solitárias e de colônias ainda em divisão celular.

Os valores de concentração de microcistina-LR (MCY-LR) quantificados no 10^o, 20^o e 30^o dia foram somados para cálculo da média dos teores desta toxina em cada tratamento (Figura 5.10). Há uma tendência de maiores valores de toxina nos tratamentos com 1 e 0,5 e no controle (4 μM) de íon ferro.

A análise de variância por medidas repetidas (GLM) pelo teste de Tukey mostrou diferença significativa, ao nível de significância de 5% ($p = 0,05$; alfa = 5%, $n = 3$), entre as concentrações 1 μM e 10 μM de cloreto férrico hexahidratado, tanto para a área do pico cromatográfico quanto da concentração de microcistina, ambos da variante LR.

O tratamento de 1 μM de íon ferro apresentou picos cromatográficos de maior área e maiores concentrações de microcistina-LR em relação aos demais, seguido das culturas com 0,5 μM ; 4 μM e 10 μM do íon deste micronutriente (Figuras 5.10 e 5.11).

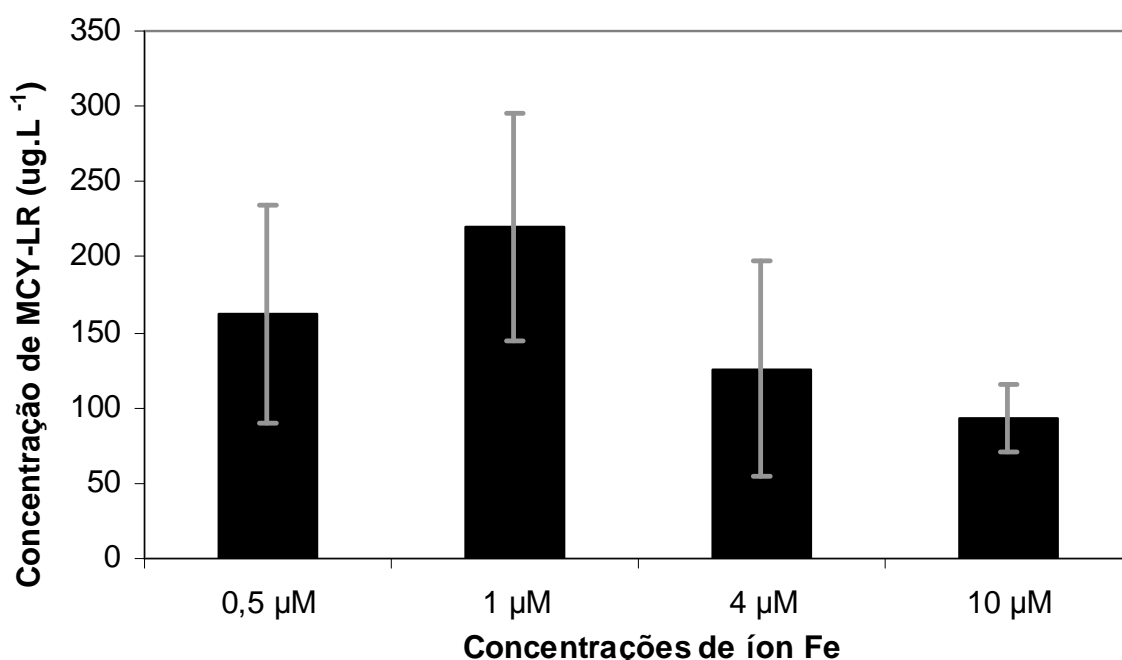


Figura 5.10 - Concentração média de microcistina-LR total produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) avaliada a partir dos teores do 10º, 20º e 30º dia de cultivo sob diferentes concentrações de ferro. As barras representam as médias dos três dias avaliados em termos de concentração de toxina, de cada tratamento e do controle: 0,5, 1, 4 e 10 μM de ferro, respectivamente.

As culturas de *Microcystis aeruginosa* Kützing (cepa NPLJ-4) desenvolvidas em diferentes concentrações de cloreto férrico hexahidratado apresentaram maiores valores de produção de microcistina-LR no 20º e 30º dia, respectivamente, quando comparado ao 10º dia de crescimento (Figura 5.11).

Além disso, não foi identificada a presença das variantes MCY-RR e MCY-LA, o que sugere que estas variantes não foram sintetizadas pelas células da linhagem da cepa NPLJ-4 que, segundo a literatura (SILVA-STENICO *et al.*, 2009), produz quatro variantes de microcistina.

Desta forma, os valores da toxina aumentaram do 10^o para o 20^o dia de crescimento de *M. aeruginosa* e tenderam a diminuir no 30^o dia de crescimento apenas nas culturas com 4 μM e 10 μM de íon ferro, enquanto que nas culturas com 0,5 μM e 1 μM , a concentração de microcistina aumentou do 20^o para o 30^o dia (Figura 5.11).

Em relação ao tempo, a análise de variância por medidas repetidas (GLM) pelo teste de Tukey indicou a existência de diferença significativa, ao nível de 5% ($p = 0,05$; alfa = 5%, $n = 3$), da área do pico cromatográfico e concentração de microcistina-LR entre os dias 10 e 20; e 10 e 30.

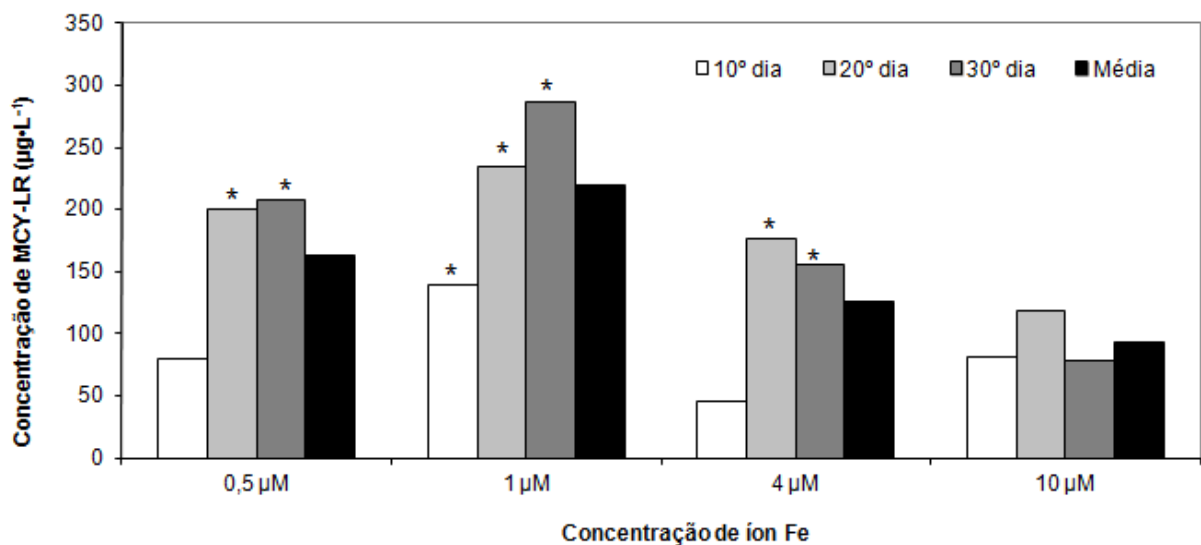


Figura 5.11 - Concentração de microcistina-LR total, produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4), avaliada no 10^o, 20^o e 30^o dia de cultivo, sob o efeito de diferentes concentrações de ferro. As barras representam as médias de três réplicas ($n = 3$) da concentração de toxina de cada tratamento e do controle: 0,5, 1, 4 e 10 μM de ferro, respectivamente. O asterisco* significa que a concentração é superior ao limite de quantificação da curva de calibração.

No que tange aos dados e conclusões referentes ao efeito do ferro, estudos prévios indicaram que a limitação deste micronutriente influencia na produção de microcistina, embora os resultados obtidos tenham sido conflitantes (LUKAČ; AEGERTER, 1993; UTKILEN; GJØLME, 1995).

Lukač e Aegerter (1993) avaliaram o efeito de vários elementos traços na produção de microcistinas por *M. aeruginosa* e descobriram que o ferro influencia significativamente na produção destas toxinas. Baixas concentrações de ferro, por sua vez, levaram a uma menor taxa de crescimento e estimulou e aumentava a produção de microcistinas.

Utkilen e Gjølme (1995), contudo, encontraram uma correlação direta entre as concentrações de ferro e de microcistinas, contrapondo-se aos resultados de Lukač e Aegerter (1993). Ademais, Utkilen e Gjølme (1995) constataram que cepas produtoras de microcistinas apresentavam um sistema mais eficiente para a absorção deste micronutriente e, portanto, as microcistinas poderiam desempenhar um papel de quelantes intracelulares, mantendo a concentração de ferro disponível mais baixa ao inativar o Fe^{+2} livre (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; SEVILLA et al., 2008; MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Já Sevilla e colaboradores (2008) destacam que a deficiência de ferro acarreta estresse em vários sistemas fisiológicos, enquanto que baixas concentrações de ferro implicam em crescimento celular retardado nas cianobactérias, o que leva ao aumento da concentração de microcistina.

Por outro lado, Molica e Azevedo (2009) ressaltam que a concentração intracelular de microcistinas é diretamente proporcional a taxa de crescimento e que expressar a concentração desta hepatotoxina em função da clorofila-*a* ou da fluorescência em *in vivo* pode levar a obtenção de resultados imprecisos.

Além disso, microcistina apresenta afinidade por íon ferro, quelando-se, devido a presença de moléculas sideróforas (quelantes), que proporciona absorção deste micronutriente pelas cianobactérias. Portanto, tendo-se baixa concentração de ferro no ambiente, conseqüentemente haverá pouco sideróforo extracelular e baixa produção de cianotoxina (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; SEVILLA et al., 2008; MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Em contrapartida, os sideróforos intracelulares causam efeitos negativos nas funções celulares uma vez que competem com metabólitos primários para limitação do ferro. Ainda, ocorre formação do complexo ferro-microcistina que manterá baixos níveis celulares de ferro livre (KAEBERNICK; NEILAN, 2001; SEVILLA et al., 2008; MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Sevilla e colaboradores (2008) discutem que a síntese de microcistina através de fatores ambientais e nutricionais ainda não é clara e ainda estão sendo debatidos pela comunidade científica. Estes autores, ainda, mencionam que muitos resultados ou conclusões contraditórias são reportados em estudos de campo e nos experimentos laboratoriais. Sendo assim, a ecoestratégia ou significado fisiológico da produção de microcistina é ainda desconhecido para comunidade científica.

5.2.2 Exposição à radiação ultravioleta C (UV-C)

A concentração de microcistina-LR total (intracelular mais extracelular) por unidade de volume de cultura (Figura 5.12, Apêndice B) e a área do pico cromatográfico (Figura 5.13, Apêndice B) desta toxina declinaram progressivamente em todas as culturas tratadas contendo diferentes níveis de ferro, a medida que aumentava-se o tempo de exposição da *Microcystis aeruginosa* Kützing (NPLJ-4) à radiação UV-C.

Tal declínio não era esperado, tendo em vista que na literatura é mencionada a liberação de toxina no meio aquoso quando as células sofrem *lise* ou são danificadas, ou então, por meio da estimulação de algum agente externo. Paralelamente, os valores da densidade numérica, biovolume e clorofila-a declinaram com o aumento da dosagem de UV-C ao longo do tempo (Apêndice B).

Desta forma, pode-se afirmar que a redução, tanto em nível dos fatores biológicos (densidade, biovolume e biomassa em termos de clorofila-a) quanto em nível da própria toxina, demonstrou que a radiação ultravioleta C possui um alto potencial de degradação de microcistinas em meio aquoso.

Tais afirmações são corroboradas com resultados de experimentos de exposição à UV-C, realizados anteriormente (dados não publicados) em laboratório. Deve-se ressaltar que a quantificação da microcistina total (intracelular mais extracelular) ultrapassou a curva analítica para as amostras.

As análises demonstraram maior eficiência de remoção da microcistina-LR nas duas primeiras horas de exposição à UV-C em todas as culturas com teor de ferro. As culturas com concentração de 0,5 e 1 μM de íon ferro apresentaram uma queda de 42,04% e 54,60% após exposição de duas horas de radiação UV-C, respectivamente, que se justifica pela grande densidade celular e dos inóculos.

Já nas culturas com concentrações de 4 e 10 μM de íon ferro, a degradação da toxina foi maior que 70% após duas horas de exposição, sendo 70,15% para o teor de 4 μM de íon ferro e 71,14% para 10 μM deste mesmo micronutriente.

As quedas nos tratamentos com déficit de ferro foram pequenas porque os inóculos possuíam o dobro da densidade numérica quando comparada aos valores após duas horas de exposição à radiação. Entretanto, esta situação não ocorreu nas culturas com 4 e 10 μM de íon ferro.

Os resultados de degradação de microcistina-LR e área do pico cromatográfico (Apêndice B) desta toxina apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, ocorreu decréscimo em termos de área, a medida que a concentração desta toxina era degradada com o aumento do tempo de exposição (Figuras 5.12 e 5.13).

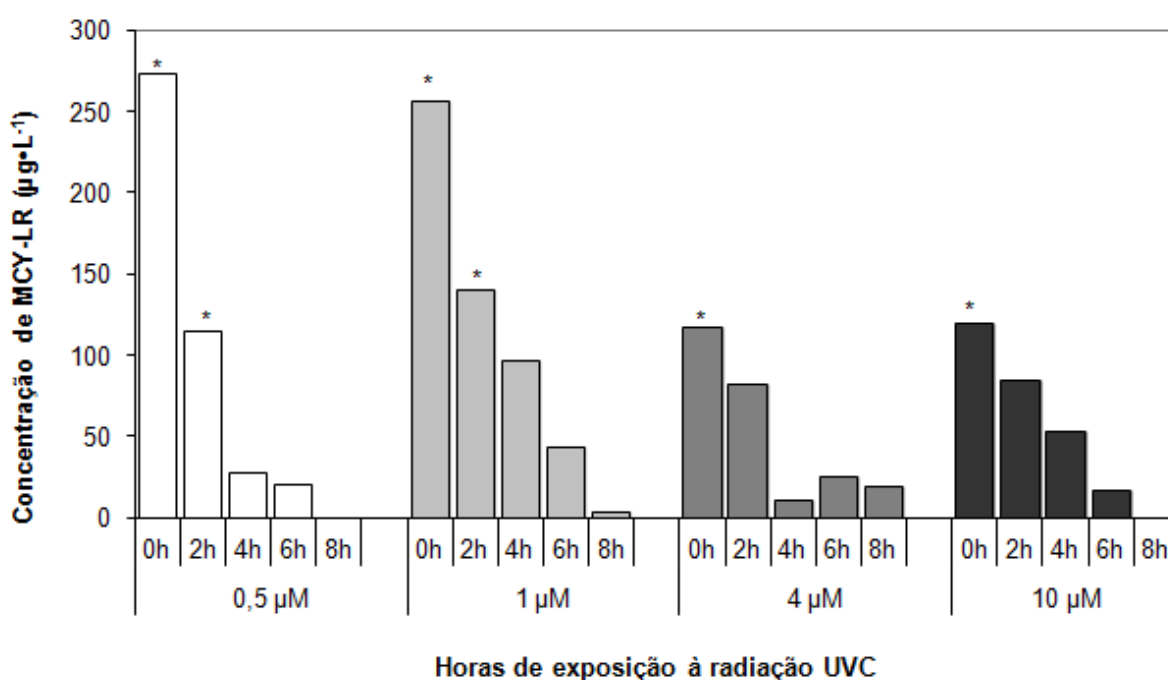


Figura 5.12 - Concentração de microcistina-LR total, produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) avaliada durante o tempo de exposição de culturas, com diferentes concentrações de ferro, à radiação UV-C. As barras representam as concentrações de toxina de cada horário do controle e dos tratamentos, 0, 2, 4, 6 e 8 horas, respectivamente. O asterisco* significa que a concentração é superior ao limite de quantificação da curva de calibração.

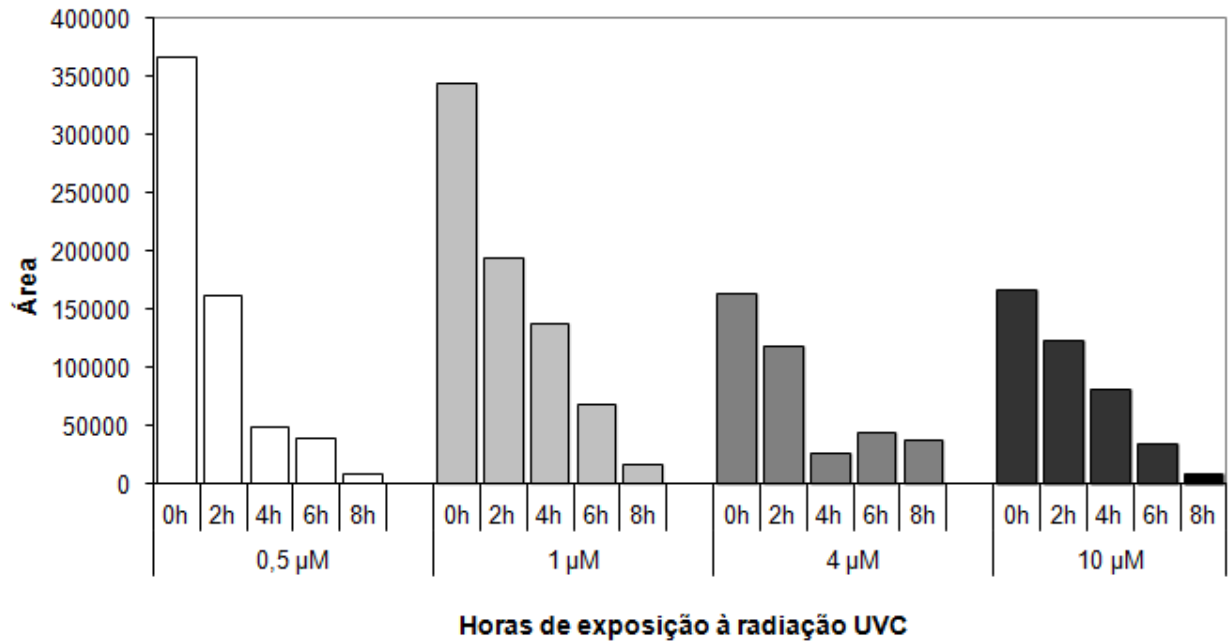


Figura 5.13 - Efeito da dosagem da radiação UV-C, ao longo de 8 horas, sobre a área do pico cromatográfico da microcistina-LR total, produzida pela linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) e submetida a diferentes concentrações de ferro.

Vale ressaltar que não existem exatidão e precisão nos valores de concentração de microcistina, uma vez que ultrapassaram o limite superior da linearidade (marcados com asterisco*), entretanto essas concentrações são notavelmente mais superiores que os demais valores (Figura 5.12).

Ademais, a variante LR não foi detectada nos cultivos de *M. aeruginosa* (NPLJ-4) com 0,5 e 10 µM de cloreto férrico hexahidratado após 8h de exposição à radiação UV-C, o que indica uma possível degradação da toxina.

Além da incerteza sobre a função das cianotoxinas, ainda não é claro qual o papel de fatores ambientais no controle da produção dessas toxinas. Florações em um mesmo corpo d'água podem variar na toxicidade em um curto espaço de tempo, ou até mesmo deixar de apresentar toxicidade. A explicação mais razoável para isso seria uma alternância na composição de cepas tóxicas e não tóxicas. Por outro lado, cepas de cianobactérias podem apresentar uma variação considerável na produção de toxinas quando cultivadas sob diferentes condições laboratoriais (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

6 CONCLUSÕES

- Maiores concentrações do íon ferro nas culturas provocaram um efeito negativo sobre a duplicação de *Microcystis aeruginosa* Kützing (NPLJ-4);
- Culturas com maior teor de ferro (10 μM) possuíram menor taxa de crescimento, mas com ocorrência de maior número de divisões celulares, proporcionando maiores valores de densidade e biomassa. Em contrapartida, culturas com déficit de ferro (0,5 μM), registraram: maior taxa de crescimento, menor tempo de duplicação, menor densidade e biovolume.
- O crescimento de *M. aeruginosa* nem sempre está atrelado aos maiores níveis de ferro e uma única célula pode ser responsável por produção de grande quantidade de toxina.
- Em todas as culturas contendo diferentes teores de ferro houve maior eficiência de remoção da microcistina-LR (> 50%) nas duas primeiras horas de exposição à UV-C.
- Maior degradação de MCY-LR total ocorreu nas primeiras horas, reduzindo a concentração com o aumento do tempo de exposição de UV-C.
- Em termos de simulação, a radiação UV-C mostrou-se eficaz na remoção completa (100%) da microcistina-LR em meio com floração de *M. aeruginosa*.
- Ocorreu redução dos valores da densidade numérica, biovolume e clorofila-a de *Microcystis aeruginosa* a medida que aumentava-se o tempo de exposição das culturas tratadas com radiação UV-C.
- Não ocorreu produção de microcistina LA e RR em nenhum dos experimentos.

7 RECOMENDAÇÕES

Considerando a importância desse tipo de pesquisa e suas inesgotáveis lacunas à respeito da ecofisiologia de cianobactérias e a produção, papel e dinâmica de seus metabólitos, bem como a remoção destas algas em águas destinadas ao abastecimento humano, sugere-se os seguintes aperfeiçoamentos e estudos na mesma linha de pesquisa:

- Isolamento e cultivo de espécies de cianobactérias tóxicas dos mananciais destinados ao abastecimento doméstico e eutrofizados, principalmente, e simulação de condições ambientais desfavoráveis que induzem ou aumentam a produção de microcistina, saxitoxina, anatoxina-a e cilindrospermopsina.
- Experimentos para verificar os efeitos da exposição de cianobactérias a mais de uma variável ambiental e a métodos físicos e químicos do sistema de tratamento de água na produção das cianotoxinas citadas na Portaria MS nº 2.914/2011.
- Experimentos de interação de culturas diferentes de cianobactérias tóxicas, principalmente de espécies isoladas dos reservatórios capixabas destinados ao abastecimento público, com coagulantes, cloro, ozonização, dentre outros, visando uma melhor compreensão da ação destes agentes químicos na produção de cianotoxinas (tipo e concentração).
- Estudos sobre a interação das cianotoxinas, principalmente as citadas na Portaria MS nº 2.914/2011, com o cloreto férrico e o policloreto de alumínio utilizado nos processo de tratamento.
- Averiguar o comportamento ecofisiológico de cianobactérias e a produção de seus metabólitos no lodo de ETA's, assim como alternativas adequadas de descarte que não ofereçam riscos ao meio ambiente e à saúde pública.
- Ensaios de bancada com espécies produtoras da toxina BMAA, seu processo de degradação, bioacumulação, remoção e estabilidade em ambientes aquáticos e em águas submetidas ao tratamento em ETA's.

-
- Detectar e analisar genótipos tóxicos em corpos d'água em risco através da técnica PCR (*polymerase chain reaction*) antes da ocorrência de florações de cianobacterias.
 - Estudos que envolvam a expressão do gene *mcyD* na síntese de microcistina e na falta de proteínas que resultem na ausência da produção desta toxina.
 - Sugerem-se novas análises com diluições das amostras dos experimentos para avaliação da produção e quantificação de toxina dentro da curva analítica. Devido à falta de tempo hábil e disponibilidade do equipamento tais diluições não puderam ser realizadas.
 - Ainda, pesquisas dos mecanismos de flutuação, que propiciam o movimento vertical das cianobactérias, oferecerão informações que possibilitarão o desenvolvimento de tecnologias com melhor eficiência no tratamento de águas de abastecimento.

8 REFERÊNCIAS

- ADWG – Australian Drinking Water Guidelines. **National Health and Medical Research Council and the Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand**, 1996.
- AGUJARO, L.F. **Subsídios para um plano de monitoramento de cianobactérias em reservatórios com vistas à balneabilidade. Estudo de caso: Reservatório Salto Grande, Americana, SP.** 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.
- ALBUQUERQUE JUNIOR, E.C. de; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. Use of solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [D-Leu1]MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, v. 52, n. 1, 2007.
- AMÉ, M.V.; 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, p. 235–248, 2005.
- APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WEF – Water Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 2005.
- ARAR, E.J.; COLLINS, G.B. Vitro determination of chlorophyll-a and phaeophytin a in marine and freshwater algae by fluorescence. In: Methods for the determination of chemical substances in marine and estuarine environmental samples. **United States Environmental Protection Agency (USEPA) Method 445.0-1**. 1997. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerlcwww/m445_0.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2010.
- AZEVEDO, S.M.F.O. Cianobactérias tóxicas: causas e consequências para saúde pública. **Revista Brasileira Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 3, n. 2, p. 81-94, 2001.
- AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina On Line: Revista Virtual de Medicina**. ano 1, v. 1, n. 3, jul./ago./set. 1998. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm>. Acesso em: 30 jan. 2009.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.; RINEHART, K.; LAU, S.; SHAW, G.; EAGLESHAM, G. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

- AZEVEDO, S.M.F.O.; MARINHO, M.M.; MAGALHÃES, V.F. de. **Ecotoxicologia de cianobactérias e qualidade de água**. Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, 2003.
- BEVILACQUA, P.D.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CERQUEIRA, D.A. Microrganismos Emergentes: protozoários e Cianobactérias. In: PÁDUA, V.L. de. (Coord.). **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico – PROSAB - Edital 05. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 2009, p. 44-108.
- BICUDO, C.E de M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas continentais do Brasil**. 2. ed. São Paulo: RiMa, 2006.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. do C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora: Aspectos toxicológicos e moleculares de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30. ed., 2003.
- BRANCO, S.M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 1986.
- BRANDÃO, C.C.S.; MONDARDO, R.I.; BASTOS, R.K.X.; TANGERINO, E.P. Tratamento de água e remoção de cianobactérias e cianotoxinas. In: PÁDUA, V.L. de. (Coord.). **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico – PROSAB - Edital 05. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 2009, p. 151-196.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 02 jun. 2003.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2003.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resoluções do Conama: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente (MMA), 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.
- BRASIL. Ministério da Saúde – MS. **Comentários sobre a Portaria MS 518/2004 subsídios para implementação**. Brasília: Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Saúde Ambiental, 2005.

- BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (MS). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.
- BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde (MS). . Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 239, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-52.
- BOX, J.D. A simple technique for washing microalgae preparation for laboratory culture experiments, with particular reference to *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. **European Journal of Phycology**, v. 15, p. 125-130, 1980.
- CALIJURI, M. do C.; ALVES, M.S.A.; DOS SANTOS, A.C.A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: RiMa, 2006.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **Journal of applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W.W. The toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n. 1, p. 78-86, 1994.
- CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.I.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M.J.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, p. 971-973, 1988.
- CAVATI, B.; SOUZA, B.D.; MACHADO, R.G.; COSTA, A.G. Lagoa Mãe-Bá (Guarapari-Anchieta, ES): Um Ecossistema com potencial de floração de cianobactérias? **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 366-381, 2009.
- CIÊNCIA VIVA. Politécnico do Porto. Agência Nacional para a Cultura Científica e Tecnológica. ESTSP. **Métodos de quantificação de fitoplâncton**. Disponível em: <<http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/1desafio/Cianobacterias%20-%20quantificacao.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2009.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999, p. 369-405.
- CHU, W.; LU, F.; ZHU, W.; KANG, C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, n. 1, p. 202-208, 2010.
- CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v. 16, p. 51-60, 2000.

- CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 264-272, 2005.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.
- CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. **Produção e liberação de microcistinas em ritmo circadiano em *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing**. 2012. 52f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2012.
- CORRÊA, D.M. **Potencial de cianobactérias na bioindicação e biodegradação e biodegradação de ambientes contaminados por naftaleno no Brasil e na Antártica**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- CYBIS, L.F.; BENDATI, M.M.; MAIZONAVE, C.R.M.; WERNER, V.R.; DOMINGUES, C.D. **Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso da represa Lomba de Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico PROSAB - Edital 4. Tema Água. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 2006.
- DAI, R.; LIU, H.; QU, J.; RU, J.; HOU, Y. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 470–477, 2008.
- DAVIS, T.W.; BERRY, D.L.; BOYER, G.L.; GOBLER, C.J. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. **Harmful Algae**, v. 8, p. 715-725, 2009.
- DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953-962, 1998.
- DITTMANN, E.; ERHARD, M.; KAEBERNICK, M.; SCHELER, C.; NEILAN, B.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Microbiology**, v. 147, p. 3119-3133, 2001.
- EDLER, L. Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea: phytoplankton and chlorophyll. **Baltic. Marine Biologist.**, v. 9, p. 5-38, 1979.
- ELLIOTT, J.A. Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1364-1371, 2012.
- ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência; 1998.

- FALCONER, I.R. An overview of problem caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. **Environ Toxicol.**, v. 14, p. 5-12, 1999.
- FERNANDES, V.O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L.B.; SOUZA, B.D. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 247-258, 2009.
- FERRÃO-FILHO, A.S.; MOLICA, R.; AZEVEDO, S.M.F.O. Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, n. 2, p. 225-8, 2009.
- FERREIRA, A.H.F.; MINILLO, A.; SILVA, L.M.; YUNES, J.S. Ocorrência de *Anabaena spiroides* (cianobactéria) no estuário da lagoa dos patos (RS, Brasil) no verão-outono de 1998. **Atlântica**, Rio Grande, v. 26, n.1, p. 17-26, 2004.
- FERREIRA, R.M. **Efeitos da limitação de fósforo na eficiência fotossintética, na morfologia e no crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii***. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.
- FOGG, G.E; THAKE, B. **Algae cultures and phytoplankton ecology**. 3. ed. Madison/London: University Wisconsin Press, 1987.
- GARCÍA-VILLADA, L.; RICO, M.; ALTAMIRANO, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; LÓPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* – characterization and future implications in the use of copper sulfate as algacide. **Water Research**, v. 38, 8. ed., p. 2207-2213, 2004.
- GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae**. Upper Saddle Rivers, New Jersey: Prentice-Hall Inc., 2000.
- GOMES, A.M.A; OLIVEIRA, A.C.P.; AZEVEDO, S.M.F.O. Efeito de diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de microcistinas (cianotoxina). **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 402-412, 2009.
- GOMES, A.M. da A.; SAMPAIO, P.L.; FERRÃO-FILHO, A. da S.; MAGALHÃES, V. de F.; MARINHO, M.M.; OLIVEIRA, A.C.P. de; SANTOS, V.B. dos; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S.M.F.O. Florações de cianobactérias tóxicas em uma lagoa costeira hipereutrófica do Rio de Janeiro/RJ (Brasil) e suas consequências para saúde humana. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 329-345, 2009.
- GORHAM, P.R.; MACLACHLAN, J.R.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verhandlungen - Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 15, p. 796-804, 1964.

- HARADA, K.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; OISHI, S.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W. Isolation and characterization of the minor componentes associated with microcystin LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). **Toxicon.**, v. 28, p. 55-64, 1990a.
- HARADA, K.; OGAWA, K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; ITEZONO, Y.; NAKAYAMA, N. Structural determination of geometrical isomers of microcystins-LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 3, p. 473-481, 1990b.
- HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.** London: E & FN Spon, p. 369-405, 1999.
- HARADA, K.I.; TSUJI, K.; WATANABE, M.F. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. **Phycology**, v. 35, n. 6, p. 83-88, 1996.
- HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C.D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 403-424, 1999.
- HUMPAGE; A.R.; MAGALHÃES, V.F.; FROSCIO, S.M. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Anal Bioanal Chem.**, v. 397, p. 1655–1671, 2010.
- HUSZAR, V.L.M.; SILVA, L.H.S. A estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudos. **Limnotemas.** Sociedade Brasileira de Limnologia. v. 2, p. 1-21, 1999.
- IMAI, H.; CHANG, K.; KUSABA, M.; NAKANO, S. Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 2, p. 171–178, 2009.
- JANČULA, D.; BLÁHOVÁ, L.; KARÁSKOVÁ, M.; MARŠÁLEK, B. Degradation of natural toxins by phthalocyanines - example of cyanobacterial toxin, microcystin. **Water Sci Technol.**, v. 62, n. 2, p.273-278, 2010.
- JANČULA, D.; MARŠÁLKOVÁ, E.; MARŠÁLEK, B. Organic flocculants for the removal of phytoplankton biomass. **Aquaculture International**, v. 19, n. 6, p. 1207-1216, 2011.
- JANČULA, D.; SUCHOMELOVÁ, J.; GREGOR, J.; SMUTNÁ, M.; MARSÁLEK, B.; TÁBORSKÁ, E. Effects of aqueous extracts from five species of the family Papaveraceae on selected aquatic organisms. **Environ Toxicol.**, v. 22, n. 5, p. 480-486, 2007.

- JACINAVICIUS, F.R. **Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.
- JIANG, Y.; BI, B.; WONG, R.N.S.; WONG, M.H. Statistical study on the effects of environmental factors on the grow and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium - *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 7, p. 127-136, 2008.
- JUNQUEIRA-MELGAÇO, M. **Efeitos da disponibilidade de luz e limitação de nutrientes sobre a competição entre cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa***. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.
- KAEBERNICK; M.; NEILAN, B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KAMOGAE, M.; HIROOKA, E.Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 5, p. 1189-1200, 2000.
- KOMÁREK, J. Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In: WEHR, J.D.; SHEATH, R.G. (Ed.). **Freshwater algae of North America: Ecology and Classification**. San Diego: Academic Press, 2003, p. 59-116.
- KOMÁREK, J.; KAMÁRKOVÁ, J., Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokariotes) from nature. **Czech Phycology**, v. 2, p. 1-24, 2002.
- KOMÁREK, J.; KLING, H.; KOMÁRKOVÁ, J. Filamentous Cyanobacteria. In: WEHR, J.D.; SHEATH, R.G. (Ed.). **Freshwater algae of North America: Ecology and Classification**. San Diego: Academic Press, 2003, p. 117-196.
- KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. **Freshwater Reviews**, v. 2, p. 31-50, 2009.
- LÁZARO, G.C.S. **Caracterização da comunidade de cianobactérias do rio Pequeno, manancial de abastecimento urbano da cidade de Linhares, ES**. 2008. 87f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Saneamento Ambiental) – Centro Federal de Educação Tecnológica do Espírito Santo, Vitória, 2008.
- LÁZARO, G.C.S.; MARTINS, C.F.; LUCAS-LEAL, P.S; F.C.O.; CASSINI, S.T.A. Avaliação da comunidade fitoplanctônica e de variáveis limnológicas em uma lagoa urbana no Estado do Espírito Santo (Lagoa Jacuném, Serra): Estimativa da qualidade ambiental – ES. In: Congresso Brasileiro de Ficologia (CBFic), 3., 2010. Paraty, RJ. **Anais...**, 2010.

- LAWTON, L.A.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. **Analyst**, v. 119, p. 1525-1530, 1994.
- LEMASSON, C.; DE MARSAC, N.T.; COHEN-BAZIRE, G. Role of allophycocyanin as a light-harvesting pigment in cyanobacteria. **Proceedings of National Academy of Sciences**. U.S.A., v. 70, p. 3130-3133, 1973.
- LORENZEN, C.J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, v. 12, p. 343-346, 1967.
- LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.
- LUKAČ, M.; AEGERTER, R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**., v. 31, n. 3, p. 293-305, 1993.
- MACHADO, R.G. **Caracterização da fluorescência da clorofila a, anatomia e histoquímica em folhas de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner e *Psidium guajava* L. colonizadas por algas do gênero *Cephaleuros* Kunze**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.
- MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (RJ, Brazil): Ecological implication and human health risk. **Toxicon**, v. 39, p. 1077–1108, 2001.
- MARGALEF, R. **Limnologia**. Barcelona: Omega, 1983.
- MARTINS, C.F. **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.
- MARSALEK, B.; JANČULA, D.; MARSALKOVA, E.; MASHLAN, M.; SAFAROVA, K.; TUCEK, J.; ZBORIL, R. Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 2316-2323, 2012.
- MARTINS, C.F.; ANTUNES, P.W.P.; CASSINI, S.T.A. Validação de método para avaliação de microcistinas por cromatografia líquida (CLAE). In: Simpósio em Ecologia: “Ecologia de Cianobactérias e Saúde Pública”, 4., 2009. Vitória, ES. Livro de Resumos. **Oecologia Brasiliensis**, 2009. v. 13. p. xxiii.
- MARTINS, C.F.; LÁZARO, G.C.S.; LUCAS-LEAL, P.S.; F.C.O.; CASSINI, S.T.A. Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas e de microcistina-LR em um manancial urbano eutrofizado (Lagoa Jacuném, Serra, Espírito Santo): Estimativa da qualidade ambiental – ES. In: Congresso Brasileiro de Ficologia (CBFic), 3., 2010. Paraty, RJ. **Anais...**, 2010.

- MANKIEWICZ, J.; TARCZYNSKA, M.; WALTER, Z.; ZALEWSKI, M. Natural toxins from cyanobacteria. **Acta Biologica Cracoviensia**. Series Botanica, v. 45, n. 2, p. 9–20, 2003.
- MOLICA, R.; AZEVEDO, S.M.F.O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.
- MÜLLER, C.C. **Avaliação da utilização de carvão ativado em pó na remoção de microcistina em água para abastecimento público**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- NICHOLSON, B.C.; BURCH, M.D. **Evaluation of analytical methods for detection e quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines**. Cooperative Research. Australia: Commonwealth of Australia, 2001.
- NISHIZAWA, T.; UEDA, A.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; OCHI, K.; SHIRAI, M. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. **J. Biochem.**, v. 127, p. 779-789, 2000.
- NUNES, T.S. **Caracterização espacial e temporal da comunidade fitoplanctônica de uma lagoa costeira da região norte fluminense: lagoa do Açú, Campos dos Goytacazes / São João da Barra – RJ**. 2003. 92f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos do Goytacazes, 2003.
- OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, p.149-194.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. WHO – World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 2011.
- PAERL, H.W.; MILLIE, D.F. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. **Phycologia**, v. 35, Supplement 6, p. 160-167, 1996.
- PÁDUA, V.L. de (Coord.). **Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano**. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico – PROSAB - Edital 04. Tema Água. Rio de Janeiro: ABES, 2006.
- PANOSSO, R.; COSTA, I.A.S.; SOUZA, N.R. de; ATTAYDE, J.L.; CUNHA, S.R. de S.; FERNANDO COSTA FERNANDES GOMES, F.C.F. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do Estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecol. Bras.**, v. 11, n. 3, p. 433-449, 2007.

- PINHO, G.L.L.; ROSA, C.M. da; YUNES, J.S.; LUQUET, C.M.; BIACHINI, A.; MONSERRAT, J.M. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part. C, v. 135, p. 459-468, 2003.
- RAPALA, J.; LAHTI, K.; SIVONEN, K.; NIEMELÄ, S.I. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. **Letters in Applied Microbiol.**, v. 19, n. 6, p. 423-428, 1994.
- RAVEN, P.H; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- SAKAI, H.; KATAYAMA, H.; OGUMA, K.; OHGAKI, S. Kinetics of *Microcystis aeruginosa* growth and intracellular microcystins release after UV irradiation. **Environ Sci. Technol.**, n. 43, p. 896-961, 2009.
- SÁ, J.C. **Influência das características em camada filtrante e da taxa de filtração na eficiência de remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina na filtração lenta em areia**. 2006. 186f. Tese (Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- SAMPAIO, G.F. **Cianobactérias como parâmetro de qualidade ambiental: um estudo do complexo lagunar de Jacarepaguá**. 2008. 160f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- SAMPAIO, J.; CARNEIRO, R., Leal.; PINTO, E. Potencial tóxico e farmacológico de Cianobactérias. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 2, p. 59-75, 2011.
- SANCHES, S.M.; VIEIRA, E.M.; PRADO, E.L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A.M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 32, p. 43-48, 2007.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T. de P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, n. 3/4, p. 359-385, 2000.
- SANT'ANNA, C.L. AZEVEDO, M.T. de P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M. do C.; CARVALHO, L.R. de; SOUZA, R.C.R. de **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia (SBFic), 2006.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T. de P.; WERNER, V.R.; DOGO., C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. de. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v. 126, p. 249-263, 2008.

- SANTOS, M.E.V. **Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de *Microcystis* sp.** 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- SEVILLA, E.; MARTIN-LUNA, B.; VELA, L.; BES, M.T.; FILLAT, M.F.; PELEATO, M.L. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, 2476–2483, 2008.
- SILVA, L.H.S. da; HUSZAR, V.L de M.; ROLAND, F. **Algas planctônicas em reservatórios de hidrelétricas brasileiras: Atlas.** Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2009.
- SILVA-STENICO, M.E.; CANTÚSIO NETO, R.; ALVES, I.R.; ALVES, I.R; MORAES, L.A.B.; SHISHIDO, T.K.; FIORE, M.F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 3, p. 535-542, 2009.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de Organismos Aquáticos.** São Carlos: Rima/FAPESP, 2003.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.** Londres: E & FN Spon., 1999, p. 42-111; 369-405.
- SNATURAL. Design JG. **Tratamento de água, efluentes, aquicultura e paisagismo. Controle de Algas Verdes por Radiação Ultravioleta (UV).** 1989-2011. Disponível em: <<http://www.snatural.com.br/Tratamentos-Agua-Lagos-Alga-Verde.html>>. Acesso em: 30 jan. 2012.
- SOARES, R.C. Toxicologia de cianotoxinas: microcistinas. As estrelas do tema. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 259-271, 2009.
- SOARES, R.M.; YUAN, M.; SERVAITES, J.C.; DELGADO, A.; MAGALHÃES, V.F.; HILBORN, E.D.; CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.O. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 95-103, 2006.
- SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDIA, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* — Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry. Elsevier B.V.**, v. 41, n. 9, p. 2017-2023, 2006.
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R.A practical handbook of seawater analysis. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 2, p.167, 1972.
- SUN, J.; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 25, n. 11, p. 1331-1346. 2003.

- TAO, Y.; ZHANG, X.; AU, D.W.T.; MAO, X.; YUAN, K. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. **Chemosphere**, n. 78, p. 541-547, 2010.
- TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. **Bulletin of PAHO**, v. 27, n. 3, p. 244-253, 1993.
- TEIXEIRA, M.R.; ROSA, M.J. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*: Part I: The key operating conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 52, ed. 1, p. 84-94, 2006.
- UTKILEN, H.; GJØLME, N. Iron-Stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 797-800, 1995.
- VADRUCCI, M.R.; CABRINI, M.; BASSET, A. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystem of Mediterranean Ecoregion. **Transit. Waters Bull.**, v. 2, p. 83-102, 2007.
- VICENT, W.F.; MUELLER, D.R.; BONILLA, S. Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. **Cryobiology**, v. 48, p. 103-112, 2004.
- VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. v. 1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA); Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2005.
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, v. 48, p. 627-640, 2006.
- YUNES, J.S.; SALOMON, P.S.; MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K.A.; RAGGETT, S.L.; CODD, G.A. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, v. 5, 4. ed., p. 223-229, 1996.
- ZURAWELL, R.W.; CHEN, H.; BURKE, J.; PREPAS, E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1-37, 2005.

APÊNDICE Aa – BIOVOLUME ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) DE *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) SOB O EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE 0,5 μM e 1 μM DE FERRO

Dias	0,5 μM					1 μM				
	Média	DPad	Mínimo	Máximo	CF(%)	Média	DPad	Mínimo	Máximo	CF(%)
0	1,693	0,242	1,429	1,905	57,735	2,061	0,658	1,465	2,767	57,735
2	4,392	0,485	3,968	4,921	57,735	3,418	0,587	2,767	3,906	57,735
4	4,127	1,563	2,381	5,397	57,735	6,184	2,128	3,743	7,649	57,735
6	19,366	13,984	9,683	35,399	57,735	21,482	9,910	10,741	30,271	57,735
8	44,764	29,762	21,906	78,417	57,735	66,888	13,905	52,241	79,908	57,735
10	86,671	41,143	59,209	133,975	57,735	114,410	16,179	96,020	126,453	57,735
12	154,876	52,320	115,720	214,297	57,735	179,183	18,212	167,628	200,177	57,735
14	157,680	69,624	91,751	230,488	57,735	259,417	47,356	208,640	302,381	57,735
16	238,742	109,011	143,817	357,796	57,735	351,422	54,578	292,942	401,005	57,735
18	300,333	100,083	204,455	404,147	57,735	460,570	48,524	419,884	514,276	57,735
20	304,248	142,559	170,167	453,991	57,735	475,109	77,334	417,931	563,100	57,735
22	332,927	110,285	216,995	436,530	57,735	481,456	83,479	403,609	569,610	57,735
24	328,218	132,281	186,994	449,229	57,735	495,995	15,419	482,215	512,649	57,735
26	290,914	137,148	144,293	416,053	57,735	347,082	72,655	276,342	421,511	57,735
28	375,363	166,802	183,184	482,564	57,735	536,518	34,383	514,276	576,120	57,735
30	412,508	180,751	226,361	587,331	57,735	613,822	42,613	582,629	662,375	57,735
35	570,505	297,489	251,124	839,725	57,735	757,852	103,367	671,326	872,317	57,735

APÊNDICE Ab – BIOVOLUME ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) DE *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) SOB O EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE 4 μM e 10 μM DE FERRO

Dias	4 μM					10 μM				
	Média	DPad	Mínimo	Máximo	CF(%)	Média	DPad	Mínimo	Máximo	CF(%)
0	2,968	0,989	1,979	3,957	57,735	3,066	0,409	2,830	3,538	57,735
2	5,331	1,238	4,617	6,760	57,735	4,717	1,672	2,830	6,015	57,735
4	5,111	4,858	2,144	10,718	57,735	6,310	3,339	2,654	9,199	57,735
6	7,969	8,540	2,473	17,808	57,735	13,681	11,520	3,184	26,005	57,735
8	49,521	35,223	29,020	90,193	57,735	57,494	14,721	40,688	68,108	57,735
10	100,416	54,347	58,864	161,918	57,735	114,988	63,193	55,017	180,973	57,735
12	155,432	56,848	117,399	220,782	57,735	166,349	61,995	95,174	208,570	57,735
14	238,865	100,727	179,396	355,164	57,735	261,582	110,935	134,093	336,118	57,735
16	294,376	78,195	217,649	373,961	57,735	414,545	236,717	146,830	596,166	57,735
18	422,658	149,441	303,390	590,292	57,735	430,938	223,512	173,012	567,862	57,735
20	432,880	184,609	284,923	639,757	57,735	443,557	220,298	189,641	583,783	57,735
22	441,619	168,808	297,619	627,391	57,735	433,120	234,358	167,174	609,434	57,735
24	464,099	142,786	368,355	628,215	57,735	478,584	259,695	183,273	671,351	57,735
26	372,532	133,061	269,259	522,688	57,735	352,098	193,291	128,963	468,088	57,735
28	537,528	123,708	443,543	677,681	57,735	467,027	279,239	159,214	704,078	57,735
30	544,123	127,922	400,673	646,353	57,735	478,230	294,370	146,830	709,385	57,735
35	673,339	325,367	376,929	1021,468	57,735	641,454	412,010	186,280	988,893	57,735

APÊNDICE B – DADOS FISIOLÓGICOS E DE MICROCISTINA-LR DE *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO E EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UV-C POR 8 HORAS

Tempo de Exposição à UV-C (horas)	Tratamento por Ferro	MCY-LR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Área do Pico de MCY-LR (adimensional)	Densidade (células $\cdot\text{mL}^{-1}$) ($\times 10^3$)	Biovolume ($\text{mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$)	Clorofila-a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Feopigmentos ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
0	0,5 μM	273,30	366.353	11.875	523,8315	339,11	121,68
2		114,93	161.499	11.500	479,0904	616,85	59,63
4		27,57	48.510	9.600	395,1744	319,16	113,70
6		20,68	39.600	9.350	382,3215	251,80	154,96
8		ALDQ	8.793	8.950	357,0315	117,93	129,72
0	1 μM	256,57	344.713	19.425	856,8781	1041,68	155,27
2		140,15	194.121	15.450	643,6475	518,64	165,57
4		96,99	138.301	14.100	580,4123	937,54	151,60
6		43,58	69.219	12.700	519,303	774,78	147,21
8		2,99	16.710	12.250	488,6744	546,75	91,12
0	4 μM	116,64	163.713	15.975	704,69127	1493,74	0,00
2		81,80	118.648	14.400	599,90446	610,97	378,04
4		10,79	26.806	14.100	549,93944	1298,31	0,00
6		24,81	44.939	13.900	541,19984	572,79	309,30
8		19,28	37.786	13.550	539,0658	503,61	255,68
0	10 μM	119,22	167.051	12.525	552,5044	864,79	194,58
2		84,83	122.572	10.600	441,5963	1356,45	53,86
4		53,48	82.027	10.150	417,8146	649,16	326,49
6		16,88	34.680	9.550	390,4995	658,57	222,75
8		ALDQ	8.400	9.100	363,0153	458,23	183,29

Nota: ALDQ = Abaixo do nível de detecção e quantificação da curva de calibração.